

GLÁUCIA MORAES DIAS TAGLIACOZZO

**FRUTANOS DE *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby :  
VARIAÇÕES EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA  
E DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA**

exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Gláucia Moraes Dias Tagliacozzo*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL  
DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

*23/06/95 Sonia M.-C. Dietrich*

ORIENTADOR: Dra. SONIA MACHADO DE CAMPOS DIETRICH

CAMPINAS

1995



UNICAMP

UNIDADE	70C
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	T128f
V.º	1
T.º	25744
PROC.	433/95
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DABA	29/09/95
N.º CPD	

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Tagliacozzo, Glaucia Moraes Dias  
T128f Frutanos de Vernonia herbacea (Vell.) Rusby : variacoes em  
funcao da temperatura e da disponibilidade de agua / Glaucia  
Moraes Dias Tagliacozzo. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Sonia Machado de Campos Dietrich.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1.\* Frutanos. 2. Carboidratos. 3. Inulina. 4. Cerrados.  
5.\* Estresse hidrico. 6. Baixas temperaturas. 1. Dietrich,  
Sonia Machado de Campos. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Titulo.

"O cerrado que hoje vem sendo largamente devastado, ocupava até há algumas décadas, uma extensão territorial estimada em 1,8 milhão de quilômetros quadrados. Tal dimensão sub-continental já constitui, por si só, razão suficiente para reconhecermos a importância dos cerrados como um dos principais biomas brasileiros. Aliado a isto têm-se enorme diversidade biológica, potencial em plantas medicinais, espécies forrageiras nativas e espécies frutíferas.

Recursos naturais como esses aguardam ainda um maior interesse do povo e governo brasileiro pela pesquisa científica e pelo desenvolvimento de tecnologias adequadas para sua utilização racional. É uma insensatez destruir os cerrados, em troca de algumas toneladas a mais de soja, toda uma flora e fauna que ainda mal conhecemos. Ali podem estar presentes, além de plantas forrageiras já identificadas, espécies de excelente valor alimentar para o homem e outras cujo estudo fitoquímico permitiria a pesquisa de medicamentos contra o câncer, a AIDS e tantas doenças que afligem a humanidade e ameaçam o seu futuro.

Porque desperdiçar todo esse potencial gênico elaboradíssimo, que levou milhões de anos para evoluir .....

Coutinho (1990)

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich, pela orientação durante a realização deste trabalho, por sempre acreditar e motivar o "pensar cientificamente".

A Dra. Rita de Cassia Leone Figueiredo Ribeiro, pela colaboração neste trabalho e sugestões na fase de pré-banca.

A Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pela sugestões durante o planejamento experimental e redação da tese.

A Dra. Margarida de Mello Aires, por orientar a parte do trabalho referente a inulina na função renal e permitir a utilização dos equipamentos e instalações do Laboratório de Biofísica Renal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Ivany Marques Válio, pelos primeiros ensinamentos de fisiologia vegetal e sugestões na fase de pré-banca.

A Dra. Lillian Beatriz Penteado Zaidan, pelo incentivo e sugestões na fase de pré-banca.

Ao MSc. Edison Paulo Chu, pelos ensinamentos de computação e paciência infinita.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pelas facilidades oferecidas, e aos funcionários das seções de Publicações e Ilustração Botânica e do setor de Fotografia, que contribuíram para a forma final da tese.

A todos os colegas da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos meus pais Maria Aparecida e Antonio, e à minha irmã Glauciléa pelo carinho e incentivo durante toda a minha carreira.

A Paulo Vinícius Tagliacozzo, por compartilhar os momentos de calma e tempestade, e sempre apoiar e acreditar na minha "capacidade científica".

# ÍNDICE

## INTRODUÇÃO

1. FRUTANOS .....	1
1.1. Características .....	1
1.2. Biossíntese e Degradação .....	5
1.3. Ocorrência .....	7
1.4. Importância Econômica .....	8
2. FRUTANOS E O AMBIENTE	
2.1. Considerações Gerais sobre o Ambiente e Estresse Fisiológico ..	10
2.2. Frutanos e Temperatura Baixa .....	14
2.3. Frutanos e Déficit Hídrico .....	16
2.4. Frutanos em Plantas do Cerrado .....	19
OBJETIVOS .....	23

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Biológico .....	24
2. Métodos	
2.1. Cultivo de Plantas .....	25
2.2. Experimentos com Temperatura Baixa .....	26
2.2.1. Temperatura Baixa em Plantas Intactas .....	26

2.2.2. Temperatura Baixa em Fragmentos de Rizóforos .....	27
2.3. Experimentos de Déficits Hídricos .....	27
2.3.1. Determinação do Conteúdo de Água no Solo .....	29
2.3.2. Determinação do Conteúdo Relativo de Água .....	29
2.3.3. Estimativa da Área Foliar .....	30
2.4. Determinação da Massa de Matéria Seca .....	30
2.5. Extração de Frutanos .....	31
2.6. Análises Quantitativas dos Frutanos .....	33
2.7. Caracterização dos Frutanos .....	33
2.7.1. Cromatografia Camada Delgada (TLC) de Alta Resolução e Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) .....	33
2.7.2. Estimativa do Grau de Polimerização Médio .....	35
2.8. Medida do Ritmo de Filtração Glomerular .....	35
2.9. Análises Estatísticas .....	38

## RESULTADOS

1. Efeito de Temperatura Baixa no Metabolismo de Frutanos de <b>V. herbacea</b> .....	39
1.1. Características das Plantas no Tratamento de Frio .....	39
1.2. Análises Quantitativas dos Frutanos .....	39
1.2.1. Experimentos com Plantas Intactas .....	39
1.2.2. Experimentos com Fragmentos de Rizóforos .....	40
1.3. Caracterização dos Frutanos .....	45
1.3.1. Oligofrutanos .....	45
1.3.1.1. Experimentos com Plantas Intactas .....	45

1.3.1.2. Experimentos com Fragmentos de Rizóforos .....	46
1.3.2 . Polifrutanos .....	57
2. Efeito do Déficit Hídrico no Metabolismo	
de Frutanos de <b>V. herbacea</b> .....	60
2.1. Conteúdo Relativo de Água nos Rizóforos e	
Conteúdo de Água no Solo durante o Déficit Hídrico .....	60
2.2. Característica das Plantas durante o Déficit Hídrico .....	60
2.3. Análises Quantitativas dos Frutanos .....	62
2.4. Caracterização dos Frutanos .....	64
2.4.1. Oligofrutanos .....	64
2.4.2. Polifrutanos .....	65
3. Inulina de <b>V. herbacea</b> na Função Renal .....	72
 DISCUSSÃO	
1. Efeito de Baixas Temperaturas no Metabolismo	
de Frutanos de <b>V. herbacea</b> .....	76
2. Efeito do Déficit Hídrico no Metabolismo	
de Frutanos de <b>V. herbacea</b> .....	81
3. Importância do Metabolismo dos Frutanos em <b>V. herbacea</b> .....	85
4. Inulina de <b>V. herbacea</b> na Função Renal .....	89
 CONCLUSÕES .....	91
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94



# INTRODUÇÃO

## 1. FRUTANOS

### 1.1. CARACTERÍSTICAS

Os frutanos são conhecidos como uma classe de carboidratos de reserva há aproximadamente 200 anos e, depois do amido e da sacarose, são os de maior ocorrência em plantas (Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Frutanos são polímeros de D-frutose que consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, onde cada membro da série contém um resíduo a mais de frutose que o membro anterior (Edelman & Jefford, 1968). Esses polímeros de frutose carregam um resíduo de D-glicose unido por uma ligação  $\alpha$  1,2 que geralmente está localizado na extremidade da cadeia (Kandler & Hopf, 1980).

O frutano mais simples é o trissacarídeo monofrutosil-sacarose. Três isômeros deste trissacarídeo foram identificados (Figura 1); estes são a base de três séries homólogas de frutanos que diferem entre si pelos tipos de ligação.

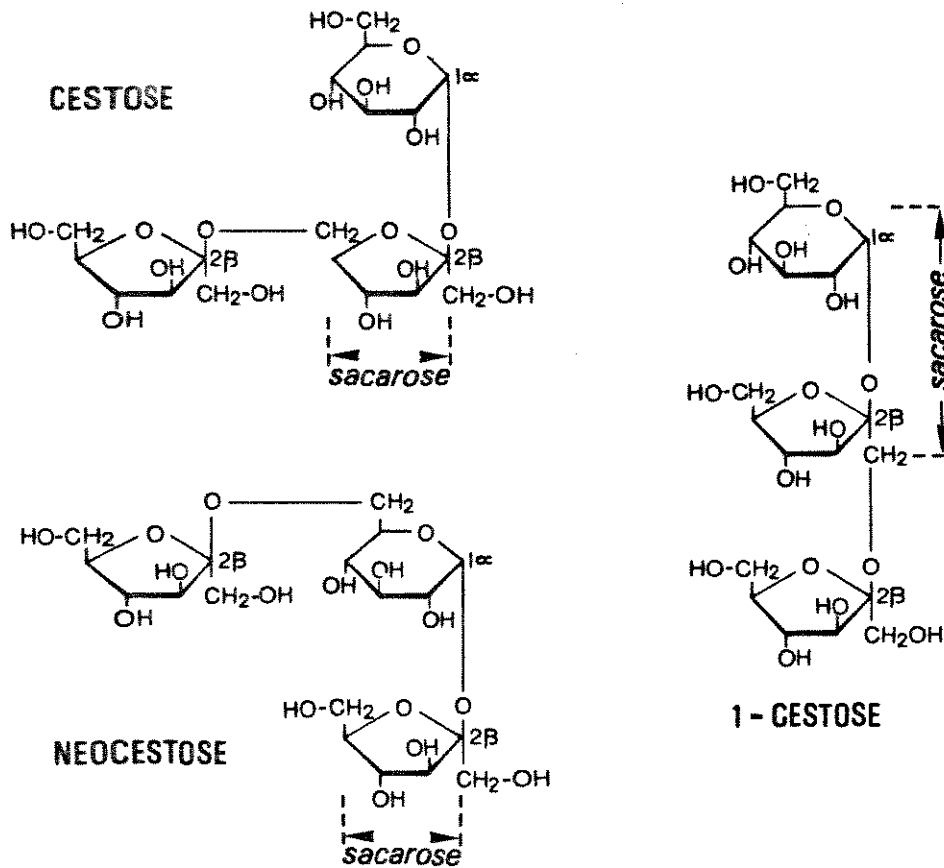
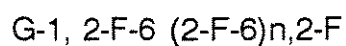


Figura 1 - Estruturas de monofrutosil-sacaroses extraídas de vegetais superiores

A série da Cestose consiste de cadeias lineares, contendo um resíduo de frutose na extremidade da cadeia e ligações do tipo  $\beta$  2,6 entre os resíduos de frutose (Albon **et al.**, 1953 in Klandler & Hoff, 1980), assim representada:



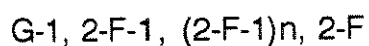
Frutanos com este tipo de ligação são comumente encontrados em gramíneas e denominados de fleanos, por associação com o gênero **Phleum** do qual foram inicialmente extraídos (Pollock **et al.**, 1979).

A série da Neocestose é baseada no trisacarídeo de mesmo nome, que difere dos outros dois isômeros por ter a glicose ligada a duas frutoses através dos carbonos 1 e 6 (Gross **et al.**, 1954). O alongamento da cadeia, neste caso, pode se dar pelos dois resíduos de frutose, uma vez que o resíduo de glicose está no interior do polímero. A série é assim representada:



Frutanos deste tipo foram purificados e caracterizados estruturalmente a partir de **Asparagus officinalis** (Shiomi, 1981).

A série da 1-Cestose, também designada Isocestose, consiste de cadeias lineares, contendo um resíduo de glicose na extremidade da cadeia e ligações  $\beta$  2,1 entre resíduos de frutose (Edelman & Jefford, 1968), assim representada:



Polifrutanos desta série são frequentemente chamados de inulina em referência ao gênero **Inula** do qual foram originalmente extraídos (Rose, 1804 in Meier & Reid, 1982). Inulinas já foram extraídas de diversas espécies de Asteraceae, Boraginaceae e Iridaceae (Klander & Hopf, 1980) (Figura 2).

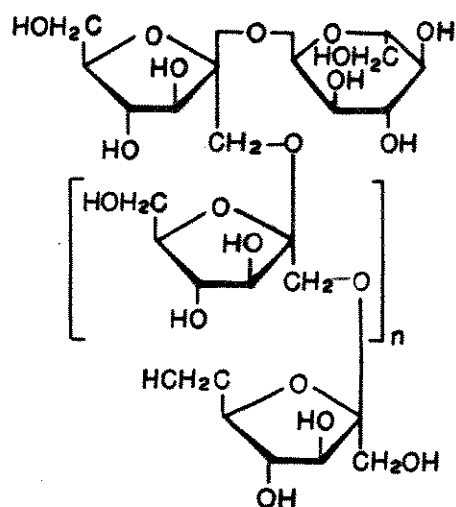


Figura 2 - Estrutura geral da inulina

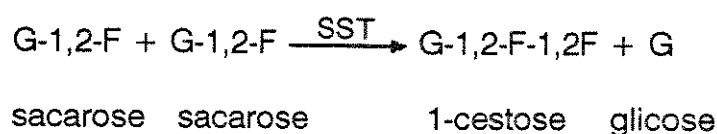
Além desses três tipos básicos de frutanos, também foram encontrados outros tipos, contendo ligações mistas na mesma cadeia e outros com estruturas ramificadas (Aspinall & Das Gupta, 1959; Medcalf & Cheung, 1971; Meier & Reid, 1982).

Os diversos componentes de uma série homóloga aparecem nos tecidos, em concentrações relativas diferentes, dependendo da época do ano e da espécie estudada (Darbyshire & Henry, 1978). A massa molecular média depende do estágio fenológico da planta e das condições ambientais em que essa se encontra, mas o tamanho máximo do polifrutano parece ser determinado geneticamente (Pollock & Chatterton, 1988).

## 1.2. BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO

A biossíntese dos frutanos difere da dos demais polissacarídeos. Os frutanos não são sintetizados a partir de nucleotídeos de açúcares (intermediários), sendo formados a partir da sacarose através da ação conjunta de duas transferases, a sacarose-sacarose-frutosil transferase (SST) e a frutano-frutano-frutosil transferase (FFT) (Edelman & Jefford, 1968; Shiomi *et al.*, 1979; Henry & Darbyshire, 1980; Meier & Reid, 1982 ; Pollock, 1986).

A SST cataliza a reação irreversível para formação da 1-kestose, a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma molécula de glicose (Scott, 1968).



A glicose liberada pode ser subsequentemente fosforilada e utilizada na síntese de sacarose.

A SST apresenta alta especificidade pela sacarose (Scott, 1968) e também foi detectada em espécies que apresentam frutanos de estrutura diferente da 1-kestose (Henry & Darbyshire, 1980 ; Shiomi & Izawa, 1980).

A constante de Michaelis-Menten da SST para a sacarose é elevada (Shiomi & Izawa, 1980), quando comparada com a de enzimas de síntese de polissacarídeos dependentes de nucleotídeos de açúcar (Pollock & Preiss, 1980). Isto indica que o fluxo de carbono no sentido da síntese de frutano é relacionado diretamente à concentração de sacarose livre no local de atuação da enzima (Pollock & Chatterton,

1988).

A FFT é responsável pelo alongamento da cadeia do frutano. Esta enzima cataliza a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora (Pollock & Chatterton, 1988 ; Wienken **et al.**, 1986):



Nessa reação a sacarose atua apenas como receptora de resíduos de frutose, enquanto a menor molécula doadora desses resíduos é a 1-cestose. Esta, por sua vez, da mesma forma que as moléculas maiores, atua tanto como doadora quanto como receptora de resíduos de frutose (Pollock & Chatterton, 1988).

Dois tipos de enzimas estão envolvidos no processo de degradação dos frutanos: as frutanotransferases (FFT), através de sua atividade (reversível) de transferência de resíduos de frutose e as frutanoexoidrolases (FEH), pela remoção sequencial e irreversível de resíduos terminais de frutose (Edelman & Jefford, 1964):



Através dessa reação o polímero acaba sendo convertido de maneira irreversível a uma mistura de frutose e sacarose, uma vez que esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Visto que os açúcares na planta são translocados sob a forma de sacarose, parte da frutose liberada através dessa reação deve ser convertida a glicose, possibilitando a formação de novas moléculas de sacarose que serão translocadas para fora da célula (Carvalho, 1991).

As exoidrolases são fortemente inibidas pela sacarose (Edelman & Jefford, 1964).

Edelman & Jefford (1968) sugeriram um modelo hipotético de compartimentação do metabolismo de inulina dentro das células. Segundo esse modelo a FFT estaria localizada no vacúolo ou no tonoplasto, sendo o vacúolo o local de síntese e de armazenamento dos frutanos, enquanto a SST agiria no citoplasma. Trabalhos realizados na década de 1980, com células isoladas e fragmentadas de **Hordeum vulgare** (Wagner *et al.* 1983 ; Wagner & Wiemken, 1986) e de tubérculos de **Helianthus tuberosus** (Fhener *et al.*, 1984), mostraram que os frutanos, as enzimas relacionadas com a sua síntese e degradação e grande parte da sacarose estão localizados internamente ao tonoplasto, no vacúolo.

### 1.3. OCORRÊNCIA

Nos vegetais superiores os frutanos são encontrados em órgãos subterrâneos de reserva, não sendo porém restritos a essas estruturas. São encontrados, em menores quantidades em caules, folhas, inflorescências, frutos e sementes (Meier & Reid, 1982). Os frutanos também são encontrados em bactérias, fungos, algas e briófitas (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1992).

Hendry (1987) estimou a presença de frutanos em 12% das espécies vegetais superiores, sendo a maioria membros de 10 famílias pertencentes a 5 ordens: Cyperales, Liliales, Asterales, Campanulales e Lamiales.

Devido a limitações das técnicas de análise usadas no passado e à falta de um teste simples para detecção de frutanos em tecidos, torna-se, entretanto, difícil

afirmar com precisão a distribuição de frutanos em plantas superiores (Pollock & Chatterton, 1988).

Entre as famílias mencionadas por Hendry (1987) somente algumas têm sido estudadas com detalhes; as investigações se concentram em Poaceae entre as Cyperales e Asteraceae entre as Asterales (Pollock & Chatterton, 1988).

#### 1.4. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A importância econômica dos frutanos é grande, pois podem ser usados na indústria alimentícia, em pesquisa e prática médica, além de servirem de fonte de carbono para vários processos de fermentação.

O polifrutano é uma alternativa para a produção de xarope rico em frutose (Vandame & Derycke, 1983; Kosaric *et al.*, 1984; Ettalibi, 1990), pois em uma só etapa produz-se xarope com aproximadamente 95 % de frutose, ao contrário da hidrólise de sacarose em que o teor de frutose no xarope é de aproximadamente 50 % (Kosaric *et al.*, 1984 e Lacerda, 1987). O interesse em se produzir xaropes de frutose é devido ao fato desta ser 1,3 vez mais doce que a sacarose (contendo portanto menos calorias por equivalente de adoçante), possuir maior solubilidade, menor viscosidade e ainda ser menos cariogênica que a sacarose. Além disso, baixos níveis de frutose podem ser metabolizados por seres humanos sem a necessidade de insulina para entrar nas células, podendo assim ser utilizada como adoçante alternativo em dieta para diabéticos (Kosaric *et al.*, 1984).

Outra utilidade dos frutanos consiste na sua fermentação a álcool etílico (Magaritis & Bajapai, 1982). Esse processo pode ser acionado nas usinas nos



períodos de entre-safra da cana-de-áçúcar ou utilizado em regiões impróprias para o seu cultivo , nas quais plantas como **H. tuberosus**, que possuem frutanos como carboidratos de reserva, podem ser cultivadas (Lacerda, 1987).

Recentemente, a produção enzimática de vários oligossacarídeos tem sido realizada em escala industrial, devido ao fato de os fruto-oligossacarídeos possuírem características específicas que promovem o aumento da flora intestinal (Muramatsu **et al.**, 1988). Farinha de **H. tuberosus** rica em frutanos tem sido usada diretamente na alimentação ou adicionada a alimentos, com função de estimular a bífido bactéria; essa bactéria tem o efeito de inibir a proliferação de outras bactérias causadoras de infecção no trato intestinal (Muramatsu **et al.**, 1992).

A inulina tem papel ímpar nas pesquisas e na prática médica, visto ser considerada a substância ideal para a medida do ritmo de filtração glomerular renal. Tal propriedade da inulina decorre do fato de ser filtrada livremente pelos glomérulos, sem sofrer reabsorção ou secreção tubular, o que levaria a sub ou superestimar a filtração (Smith, 1951; Jorgensen **et al.**, 1972; Brenner **et al.**, 1986; Aires, 1991). Sendo inerte e não tóxica e não induzindo alterações na função renal, na circulação e nas demais funções do organismo, é considerada a substância mais adequada na análise da função renal nos seres humanos e em animais de laboratório ( Smith, 1951; Brenner, 1986). No Brasil, a inulina comercial é importada e de custo elevado, inviabilizando seu uso rotineiro em pacientes nefropatas e nas pesquisas em fisiologia e farmacologia renal.

## 2. FRUTANOS E O AMBIENTE

### 2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AMBIENTE E ESTRESSE FISIOLÓGICO

O ambiente é tudo que circunda os seres vivos; neste existem fatores que podem ou não afetar as plantas. Os fatores ambientais que podem ser transferidos diretamente através da barreira que existe entre o organismo e o ambiente são chamados de operacionais; incluindo-se nesta categoria luz, água, elementos minerais e substâncias orgânicas. Temperatura, força gravitacional, pressão parcial dos gases, potencial da água e diferença de potencial elétrico não são fatores operacionais, pois apenas possibilitam a transferência mas não são transportados através das barreiras ser vivo-ambiente. Por exemplo: diferentes potenciais de água indicam a possibilidade para transferência de água. (Salisbury & Ross, 1992).

Um princípio fundamental da resposta da planta ao ambiente é o da saturação. O organismo responde a algum fator ambiental de acordo com um padrão comum. No início o fator aumenta gradualmente sem provocar resposta do organismo; posteriormente, atinge um limiar no qual começa a haver resposta proporcional do organismo até que o sistema fique saturado. Após a saturação, conforme a concentração do fator ambiental vai aumentando, a resposta do organismo permanece constante ou começa a declinar, caso os níveis do fator se tornem tóxicos.

Além de quantificadas, as respostas das plantas ao ambiente podem ser

classificadas em :

direta - A resposta é quase imediata às mudanças ambientais (ex.: fotossíntese em resposta à luz);

desencadeada - A resposta ocorre mesmo que o fator ambiental desencadeante retorne ao nível original (ex.: germinação em resposta a fatores ambientais como luz e baixas temperaturas);

modulada - A intensidade da resposta é determinada pela quantidade do fator ambiental aplicado (ex.: gravitropismo, fotoperiodismo, vernalização);

homeostática - Em resposta ao ambiente, a planta tende a manter relativamente constantes suas condições internas (ex.: interações entre as concentrações internas dos reguladores de crescimento ).

Mudanças graduais na planta em resposta à contínua exposição a alguma condição ambiental são consideradas como efeitos condicionados (ex.: desenvolvimento de resistência ao frio e à seca através de diminuição do potencial da água) (Salisbury & Ross, 1992).

Mudanças nas condições ambientais que levem a uma resposta menor que a ótima, pela planta, podem ser consideradas estressantes. Qualquer fator ambiental potencialmente capaz de induzir injúrias no organismo vivo causa um estresse biológico, e este pode causar efeito elástico ou plástico (Levitt, 1980b).

O efeito biológico elástico ocorre quando há o retorno das funções do organismo ao nível ótimo, após as condições ambientais retornarem ao normal, ou seja, quando o estresse é removido o efeito desaparece (Salisbury & Ross, 1992).

O efeito biológico plástico ocorre quando as funções do organismo não retornam ao normal, apesar das condições ambientais retornarem; portanto, o efeito

permanece quando o estresse é removido (Salisbury & Ross, 1992).

Os estresses ambientais são principalmente de dois tipos, os bióticos e os físicoquímicos. Oito tipos de estresses são conhecidos como capazes de induzir mecanismos de resistência nas plantas (Figura 3). O mecanismo de resistência, quando a planta é submetida a algum tipo de estresse, depende de sua capacidade para impedi-lo ou tolerá-lo (Levit, 1980b).

Fisiologistas vegetais têm enfatizado que os efeitos biológicos plásticos são causados por estresses devidos a baixas ou altas temperaturas, déficit hídrico e altas concentrações de sais (Salisbury & Ross, 1992).

Plantas expostas a vários tipos de estresses ambientais desenvolvem mecanismos para tolerá-los. Alguns dos mecanismos de tolerância são: perda ou enrolamento das folhas, alteração do metabolismo, mudança nos níveis de solutos intracelulares para manutenção do potencial osmótico, etc. (Morgan, 1984).

Os solutos envolvidos na osmorregulação são principalmente aminoácidos e carboidratos solúveis (Meyer & Boyer, 1981). O efeito de carboidratos solúveis no potencial osmótico depende da distribuição e do tamanho das moléculas (Thomas, 1990). Os frutanos são compostos solúveis, cujo metabolismo leva a modificações rápidas no tamanho médio de suas cadeias e no número de moléculas, podendo causar alterações no potencial osmótico da célula. Muitas espécies vegetais que armazenam frutanos atravessam períodos de frio e/ou seca intensos durante uma fase do seu ciclo anual, sugerindo que os frutanos possam estar envolvidos na resistência das plantas ao congelamento ou dessecação, através de sua contribuição nas mudanças de potencial osmótico (Eagles, 1967; Edelman & Jefford, 1968)

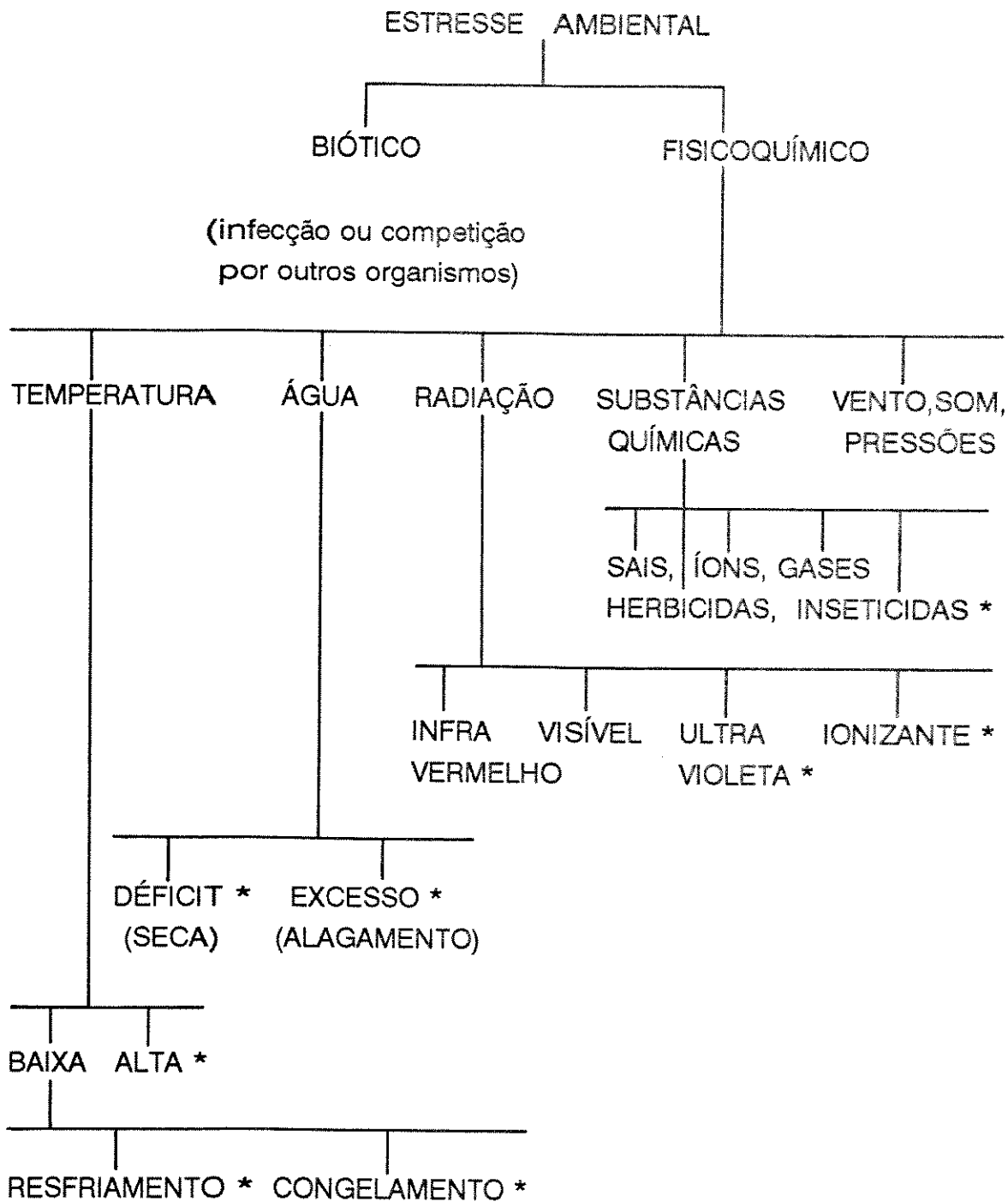


Figura 3 - Tipos de estresses ambientais a que a planta está sujeita (Adaptado de Levitt, 1980b). \* estresses capazes de induzir mecanismos de resistência na planta.

## 2.2. FRUTANOS E TEMPERATURA BAIXA

É difícil estabelecer relações entre a temperatura ambiental e os processos fisiológicos que ocorrem na planta, pois a temperatura das folhas e caules está normalmente próxima à do ar, enquanto que a temperatura nas raízes é semelhante à do solo.

Por outro lado, as temperaturas ambientais variam constantemente, afetando o metabolismo e o crescimento das plantas. Além destas variações, plantas em diferentes estádios de desenvolvimento podem apresentar diversas temperaturas ótimas para os diferentes processos fisiológicos (Fitter & Hay, 1983).

Muitas plantas desenvolvem mecanismos de adaptação que lhes permitem resistir a períodos de temperaturas baixas; entre estes destacam-se a redução dos processos metabólicos e da taxa de crescimento e a dormência (Fitter & Hay, 1983).

Outra adaptação que ocorre em consequência do resfriamento é o acúmulo de carboidratos, que coincide com o aumento da tolerância dos tecidos vegetais ao congelamento. O acúmulo de carboidratos solúveis afeta o equilíbrio osmótico das células, fazendo com que baixe o ponto de congelamento do citosol (Levitt, 1980a).

Eagles (1967) sugeriu que, nos períodos de temperaturas baixas, a atividade osmótica dos frutanos poderia aumentar a resistência da planta ao congelamento. A favor desta hipótese existe o fato de gramíneas e cereais de inverno (trigo, aveia, e cevada) acumularem grandes quantidades de frutano durante essa estação (Meier & Reid, 1982; Pontis & Del Campillo, 1985; Pollock, 1986; Chatterton *et al.*, 1989; Prud'home *et al.*, 1993).

A acumulação de sacarosil-oligossacarídeos é frequentemente associada a

plantas submetidas ao frio intenso. Acredita-se que os oligossacarídeos possam ter um papel crioprotetor, embora o mecanismo envolvido ainda não seja conhecido (Wienken **et al.**, 1986 ; Pollock & Chatterton, 1988).

Efeitos específicos da temperatura sobre o metabolismo de frutanos foram medidos em folhas intactas de **Lolium temulentum** mantidas a 5 °C. Nessas condições ocorreu estímulo da síntese de frutanos, através do aumento na acumulação de sacarose, mudanças nas interações metabólicas entre os oligossacarídeos e o "pool" de frutanos e alterações na especificidade catalítica das enzimas de síntese dos frutanos (Pollock, 1989).

Prud'home **et al.**( 1993) consideraram que a presença de frutanos em folhas de gramíneas pode ser uma vantagem adaptativa pois, na estação fria, a sacarose produzida em excesso pode ser "sequestrada" para síntese de frutanos nos vacúolos.

Pressman **et al.** (1989) constataram que, em aspargo, o frio induz senescência da parte aérea. Verificaram igualmente que, no início do tratamento com temperaturas baixas, ocorre diminuição e subsequente aumento dos frutanos nas raízes devido, provavelmente, à translocação de fotoassimilados provenientes da parte aérea em senescência.

Plântulas de **Lolium temulentum**, submetidas a 5 °C, apresentam aumento de fruto-oligossacarídeos, acompanhado de acúmulo e aumento do grau de polimerização de fruto-polissacarídeos (Simpson **et al.**, 1991). No entanto, em **Helianthus tuberosus** temperaturas baixas promovem a redução do grau de polimerização médio dos frutanos (Jefford & Edelman, 1963).

Além das variações encontradas entre diferentes espécies, o efeito do frio nas plantas não é somente determinado pela magnitude das quedas de temperatura, mas

depende da estação do ano em que isso ocorre, do estágio de desenvolvimento da planta e do período de exposição à temperatura baixa. (Pollock, 1984; Alberdi & Corcuera, 1991).

Em temperaturas baixas, a acumulação característica de carboidratos não estruturais em regiões fonte e dreno é devida à redução do crescimento (processo mais sensível ao frio que a fotossíntese) e à sensibilidade diferencial que as enzimas do metabolismo dos carboidratos apresentam à temperatura (Farrar, 1988). A acumulação de frutanos nos vacúolos das células de raízes facilita o fluxo de carboidratos para essa região, possibilitando o contínuo transporte de sacarose e mantendo os gradientes de água entre as folhas e as raízes (Prud'home et al., 1993).

Pollock & Lloyd (1987), estudando plantas de *Lolium temulentum* submetidas a temperaturas baixas, verificaram que a sacarose e os frutanos de reserva podem facilitar a utilização de fotoassimilados intermediários e portanto reciclar o fosfato. Sabe-se que as enzimas do metabolismo dos frutanos permanecem ativas em baixas temperaturas e que a redução do crescimento, nestas condições, gera um excesso de carboidratos (Wagner et al., 1983; Pollock & Lloyd, 1987; Cairns & Pollock, 1988; Farrar, 1988; Pollock et al., 1989; Chatterton et al., 1989; Tognetti et al., 1990); no entanto, não está completamente esclarecido se os frutanos desempenham papel osmorregulador nas plantas que os armazenam e toleram temperaturas baixas (Carvalho, 1991).

## 2.3. FRUTANOS E DÉFICIT HÍDRICO

Existem poucas e divergentes informações referentes ao efeito de estresse



hídrico no metabolismo de frutanos. Blacklow et al. (1984) sugeriram que os frutanos presentes no colmo de trigo podem contribuir para a tolerância ao estresse hídrico, através do abaixamento do potencial de água na célula. No entanto, Thomas (1991) sugeriu que o acúmulo de frutanos, em condições de estresse hídrico, possa ser um mecanismo através do qual os carboidratos solúveis são estocados sem causar excessiva redução no potencial osmótico vacuolar.

Hendry & Wallace (1993) sugeriram que há 20 milhões de anos, a expansão global da flora que acumula frutanos coincidiu com o estabelecimento da sazonalidade no regime de chuvas, e com a redução gradual da água ambiental.

Considerando que muitas espécies que suportam períodos de seca durante seu ciclo de vida contêm frutanos, Eagles (1967) sugeriu que a atividade osmótica desses açúcares possa contribuir para o aumento da resistência ao dessecamento.

Segundo Figueiredo-Ribeiro (1993), a localização dos frutanos nas proximidades dos tecidos vasculares condutores de água, seu metabolismo rápido (em comparação a outros compostos de reserva) e sua ampla ocorrência em plantas adaptadas a ambientes com restrição hídrica temporária reforçam a suposição de que os frutanos estejam envolvidos nos processos de osmorregulação.

O ajuste osmótico ocorre nas folhas e raízes de muitas espécies submetidas à falta de água (Munns, 1988). Entretanto, as evidências comprovam que as alterações que ocorrem nas plantas submetidas ao déficit hídrico não podem ser interpretadas como simples respostas a mudanças no potencial de água da célula.

Segundo Hsiao et al. (1976), a resposta da planta ao estresse hídrico pode ser correlacionada com acúmulo de carboidratos no citosol. Thomas & Evans (1989) verificaram que o ajuste osmótico em plantas submetidas ao déficit hídrico é devido

à acumulação de solutos, entre eles os carboidratos que são usados no crescimento. Johnson *et al.* (1984) observaram que folhas de trigo submetidas a estresse hídrico apresentam um aumento no conteúdo de açúcares livres, quando comparadas com as não submetidas a esse tratamento.

O grau de osmorregulação é afetado pela intensidade do estresse hídrico e pelo pré-condicionamento ao mesmo (Morgan, 1984).

Plantas submetidas a estresse moderado apresentam diminuição na taxa de respiração, mas se este se tornar severo esta taxa aumenta e finalmente declina em condições de estresse extremo (Hsiao, 1973).

Mudanças nas atividades enzimáticas ocorrem em plantas submetidas a déficit hídrico e frequentemente os níveis de enzimas envolvidas em reações de hidrólises e degradações aumentam (Hsiao, 1973).

O ajuste osmótico durante o déficit hídrico é um mecanismo que muitas plantas dispõem para manter o turgor; no entanto, a complexidade estrutural e funcional das plantas superiores dificulta a identificação de quais processos (bioquímicos, biofísicos ou fisiológicos) são ou não pertinentes à osmorregulação (Hellebust, 1976; Morgan, 1984; Thomas & Evans, 1990).

Segundo Hendry (1993), o aparecimento e a expansão da flora que contém frutanos podem estar situados entre 15 e 30 milhões de anos atrás. Angiospermas adaptadas a climas secos se espalharam durante o Oligoceno (32-25 milhões de anos) e o início do Mioceno (24-15 milhões de anos). A grande diversidade da vegetação que surgiu nessa época pode ser interpretada como uma adaptação a uma redução estacional da disponibilidade de água em altas latitudes. Só após a expansão da flora que contém frutanos, no final do Mioceno, é que a temperatura

começou a declinar marcadamente.

Existem evidências de que no Terciário a flora contendo frutanos se expandiu territorialmente, em resposta à diminuição de água. Esta flora é atualmente mais abundante e rica de variedades em regiões de campos secos temperados, savanas secas ( similares aos cerrados) e em regiões semiáridas (Hendry, 1993).

Em plantas de *Lolium perene* em crescimento o efeito dos carboidratos solúveis em água no potencial osmótico depende da sua distribuição e do seu tamanho molecular, os quais são afetados pelo déficit hídrico (Thomas, 1990). Virgona & Barlow (1991) verificaram em colmo de trigo que durante o déficit hídrico, o aumento da concentração de moléculas de baixo peso molecular (incluindo os oligofrutanos) é parcialmente responsável pelo declínio do potencial osmótico.

Em raízes de aspargo submetidas a déficit hídrico, o conteúdo de frutanos decai, apesar da parte aérea (fonte de assimilados para parte subterrânea) senescer; Presman **et al.** sugeriram que esse decréscimo é devido ao aumento da respiração nestas condições adversas.

## 2.4. FRUTANOS EM PLANTAS DO CERRADO

A maioria dos trabalhos sobre frutanos foi realizada com espécies nativas ou adaptadas a climas temperados, sujeitas a invernos rigorosos. Pouco se sabe sobre o acúmulo desses compostos em espécies de regiões mais quentes, como as do cerrado, onde as temperaturas de inverno não chegam abaixo de seis graus celsius, mas sempre ocorrem em períodos de seca (Figueiredo **et al.**, 1992).

O cerrado possui vegetação com fisionomia própria, caracterizada pela

cobertura pouco densa e porte irregular de suas plantas. Nos períodos secos, as temperaturas do solo e do ar em geral são elevadas e o grau de umidade no solo mostra-se baixo, por efeito da insolação direta (Camargo, 1971).

A vegetação do cerrado é composta, em sua maioria, por plantas perenes. Pequenas árvores e arbustos possuem raízes que atingem regiões mais profundas do solo, conseguindo assim água para suprirem suas partes aéreas. As herbáceas e subarbustivas sobrevivem à estação seca de inverno passando por um período de dormência (Rachid, 1947; Rawitcher, 1948 e Mantovani, 1988).

Cerca de 50% da vegetação herbácea e subarbustiva do cerrado apresenta órgãos subterrâneos espessados, o que sugere a importância ecológica destas estruturas (Mantovani, 1988).

Durante o seu ciclo anual de desenvolvimento, as espécies herbáceas do cerrado entram em dormência no final do outono, quando geralmente perdem os ramos aéreos e rebrotam vigorosas na primavera seguinte (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1992).

Nas regiões de cerrado, os períodos mais chuvosos estão compreendidos entre janeiro e março e os períodos mais secos entre os de junho e agosto. Portanto, os períodos de seca coincidem com os de baixa temperatura (Rachid, 1947; Reis, 1971; Pimentel *et al.*, 1977; De Vuono *et al.*, 1986; Coutinho, 1990; Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1992; Figueiredo, 1993).

Na Reserva Biológica de Moji Guaçu, no estado de São Paulo, a família Asteraceae encontra-se amplamente distribuída na região de cerrado, onde 89 espécies desta família foram detectadas (Mantovani, 1988).

Triagens realizadas em espécies herbáceas da família Asteraceae no cerrado

acima citado (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993) mostraram que os frutanos estão acumulados nos órgãos de reserva de aproximadamente 60 % das espécies. Em 80% dessas espécies esses polímeros foram detectados histologicamente, estando distribuídos principalmente no parênquima de reserva (espécies da tribo Vernonieae) ou concentrados no parênquima do xilema (espécies da tribo Heliantheae), conforme Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993). Em todas essas espécies predominam frutanos do tipo inulina, entretanto os conteúdos totais de frutanos e a distribuição das diferentes classes de pesos moleculares variam de forma muito ampla (de 2,4 % do peso seco de **Vernonia brevifolia** a 30 % em **Vernonia oxylepis**, 55 % em **Calea platylepis** e cerca de 70 % em **Vernonia herbacea** e **Viguiera discolor**) (Figueiredo-Ribeiro 1993).

O alto conteúdo de frutanos e as variações no tamanho das suas cadeias no decorrer do desenvolvimento de plantas da família Asteraceae do cerrado sugerem que estes compostos não têm função só de reserva, mas também contribuem para a adaptação destas plantas a fatores ambientais desfavoráveis ao seu crescimento (Carvalho, 1991; Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1991).

**Vernonia herbacea** é uma das 22 espécies do gênero **Vernonia** que ocorre na reserva acima citada. Essa espécie apresenta órgãos subterrâneos com estrutura caulinar espessada, denominados rizóforos, através do qual a planta se reproduz vegetativamente (Carvalho, 1991).

Rizóforos de **Vernonia herbacea** atuam também como órgãos de reserva para a planta, armazenando em seus tecidos grandes quantidades de frutanos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986 ; Carvalho & Dietrich, 1993). O frutano encontrado em **Vernonia herbacea** possui a série homóloga semelhante à encontrada em tubérculos

de **Helianthus tuberosus**, a qual é baseada no trissacarídeo isocestose (Carvalho, 1991).

**Vernonia herbacea** apresenta um padrão de crescimento sazonal que envolve brotação das gemas dos rizóforos na primavera, seguida de um período rápido de crescimento da parte aérea, que continua no verão até o início do outono. Nesta época o crescimento do caule cessa e nas folhas começam a aparecer sinais de senescência, seguidos de abscisão da parte aérea e entrada de dormência da planta. No fim do inverno, outras gemas brotam novamente do rizóforo, com a quebra da dormência, completando-se um ciclo anual de desenvolvimento (Carvalho & Dietrich, 1993).

Variações nas concentrações de frutanos observadas nos rizóforos de **V. herbacea** indicam processos de síntese e degradação desses compostos durante o ciclo fenológico, evidenciando o papel de reserva destes compostos (Carvalho & Dietrich, 1993).

Figueiredo-Ribeiro (1993) sugere que além do papel inquestionável de reserva, os frutanos podem estar relacionados com mecanismos de resistência a condições ambientais desfavoráveis (solos pobres, déficit hídrico e baixas temperaturas), pois em asteráceas do cerrado o conteúdo de frutanos é muito alto, excedendo as necessidades metabólicas da planta.

# OBJETIVOS

Considerando que:

- a maioria dos trabalhos sobre frutanos foi realizada com espécies nativas ou adaptadas a climas temperados, sujeitas a invernos rigorosos,
- pouco se sabe sobre as relações entre variação nos conteúdos de frutanos e a variação nas condições climáticas e edáficas em regiões tropicais,
- **Vernonia herbacea** armazena em seus rizóforos polifrutanos do tipo inulina.

Os objetivos deste trabalho foram:

- primordialmente, verificar o efeito de temperatura baixa e do déficit hídrico no conteúdo e na composição dos frutanos presentes em rizóforos de **Vernonia herbacea**, uma planta nativa do cerrado.
- paralelamente, determinar se a inulina isolada e purificada de **Vernonia herbacea** pode ser usada para avaliar o ritmo de filtração glomerular em substituição à inulina importada, tão necessária para as pesquisas básicas e para as práticas médicas relacionadas com a fisiologia renal.

# MATERIAL E MÉTODOS

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas plantas ou órgãos subterrâneos (rizóforos) de **Vernonia herbacea** (Vell.) Rusby, SP 169567, (Figura 5).

Nos experimentos onde se utilizaram rizóforos, estes foram obtidos de plantas adultas coletadas no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu ( 22° 18' S e 47° 11' W), SP. Quando plantas inteiras foram utilizadas, estas foram obtidas através de multiplicação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos, coletados no cerrado acima citado, cultivadas em vasos na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo ( 23° 38' S e 46° 38' W).

As plantas utilizadas estavam nos seguintes estádios de desenvolvimento: início de dormência (a parte aérea começa a perder folhas e ficar amarelada), dormência (período de repouso, no qual apesar de receber suprimento hídrico adequado ocorre redução do crescimento dos rizóforos e a parte aérea está ausente), brotação (após período de repouso ocorre novamente formação de parte aérea) e vegetativo (apresenta crescimento da parte aérea e subterrânea).





Figura 5 - Planta de **Vernonia herbacea** com 21 meses de idade.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. CULTIVO DE PLANTAS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e laboratórios da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo ( 23° 38' S e 46° 38' W)., entre os anos de 1989 a 1994.

Fragmentos de rizóforos de **Vernonia herbacea** medindo 3 cm de comprimento foram inicialmente plantados em caixas de 30 cm x 50 cm x 8 cm, contendo terra de canteiro, num total de 30 fragmentos por caixa. Após a brotação, as novas plantas foram transferidas individualmente para vasos de 2 dm<sup>3</sup>, com terra de mesma procedência, irrigadas diariamente com água de torneira e mantidas em casa de vegetação ou ripado.

## 2.2. EXPERIMENTOS COM TEMPERATURA BAIXA

### 2.2.1. Temperatura Baixa em Plantas Intactas

Três lotes, cada um contendo cinco plantas em início de dormência, foram mantidos por 7 dias em câmaras de crescimento (me-ca-lor) com fotoperíodo de 8 horas, intensidade luminosa de 15  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nas seguintes condições térmicas: 5 °C e 25 °C constantes ou temperatura alternada de 25/5 °C (dia/noite). Cinco plantas (controle) permaneceram em ripado pelo mesmo período, em condições ambientais do inverno de 1989 (temperatura média máxima do ar de 21 °C e média mínima de 8 °C, fotoperíodo de 10 horas). No início e final do experimento, 3 plantas de cada tipo de tratamento foram reunidas e a seguir 3 amostras de 5 g de rizóforos foram coletadas para realização das análises bioquímicas.

Um outro experimento foi realizado, visando acompanhar dia a dia o

metabolismo de frutanos em plantas submetidas a baixas temperaturas. Vinte e quatro plantas em fase de dormência (sem a parte aérea), foram mantidas por 5 dias em câmaras de crescimento, no escuro, a 5 °C ou a 25 °C. Todos os dias, 4 plantas de cada tratamento foram reunidas e a seguir foram retiradas 3 amostras de 5g de rizóforos para a realização das análises bioquímicas.

### 2.2.2. Temperatura Baixa em Fragmentos de Rizóforos

Plantas em fases de dormência e de brotação, coletadas no cerrado na época do inverno e da primavera, respectivamente, tiveram seus rizóforos cortados em fragmentos de 3 cm. De cada fase, 80 fragmentos foram selecionados e submetidos a temperaturas de 5 ou 20 °C, no escuro, por quatro semanas. Semanalmente eram retirados 20 fragmentos de cada tratamento, reunidos e a seguir coletadas 3 amostras de 5g, para realização das análises bioquímicas.

Todas as temperaturas citadas nos itens 2.2.1. e 2.2.2 apresentaram variações de mais ou menos dois graus celsius..

## 2.3. EXPERIMENTOS DE DÉFICIT HÍDRICO

Cinquenta e seis vasos, contendo cada um 1 planta com 2 anos de cultivo em vaso, em estágio vegetativo, foram irrigados até que a terra neles contida estivesse em capacidade de campo.

Em seguida, os vasos foram divididos em 6 lotes que receberam os seguintes regimes de irrigação:

lote 1 - 4 plantas, em terra em capacidade de campo (controle)

lote 2 - 12 plantas, irrigadas a cada 7 dias

lote 3 - 12 plantas, irrigadas a cada 15 dias

lote 4 - 12 plantas, irrigadas a cada 30 dias

lote 5 - 8 plantas, 60 dias sem rega

lote 6 - 8 plantas, 90 dias sem rega

Durante o déficit hídrico a temperatura média máxima do ar foi de 35 °C e a média mínima de 20 °C.

Semanalmente, os vasos eram pesados e eram registrados a altura e o número de folhas de cada planta.

As plantas do lote 1 foram coletadas no primeiro dia do experimento. Foram coletadas 4 plantas, nos lotes 2, 3 e 4, após 30 e 60 dias e, nos lotes 5 e 6, após 60 e 90 dias respectivamente. Depois de 60 dias, as 4 plantas remanescentes dos lotes 2 a 5 foram irrigadas diariamente pelo período de 30 dias e as 4 plantas remanescentes do lote 6 receberam este tratamento após 90 dias, com o propósito de se verificar se ocorreria rebrota depois desses tratamentos.

Após 30, 60 e 90 dias primeiramente foram realizadas as coletas das plantas e a seguir os lotes foram irrigados. Assim sendo, até 30 dias o lote 2 recebeu 3 regas, o lote 3 recebeu 1 rega e os lotes 4, 5 e 6 não receberam irrigação. Até 60 dias o lote 2 recebeu 7 regas, o lote 3 recebeu 3 regas, o lote 4 recebeu 1 rega e o lote 5 não recebeu irrigação. O lote 6 ficou sem irrigação até 90 dias .

A cada coleta, as plantas foram desenterradas, sendo separadas suas partes

aéreas das subterrâneas, nas quais foram determinadas a massa fresca e a seca. Paralelamente foi determinada a área foliar de cada planta.

Para realização das análises bioquímicas, amostras de 3g foram retiradas dos rizóforos de 4 plantas, uma amostra por planta, em cada tratamento.

Para determinar a porcentagem de água no solo, a terra contida em cada vaso foi mantida em estufa a 105 °C, até a estabilização de sua massa.

### 2.3.1. Determinação do Conteúdo de Água no Solo

Ao final da tarde que precedeu o início dos experimentos de déficit hídrico, todos os vasos foram irrigados 3 vezes com intervalos de uma hora entre as irrigações. Após o excesso de água ser escoado, considerou-se que todos os vasos estavam em capacidade de campo.

O conteúdo de água no solo foi determinado por método gravimétrico, calculando-se a diferença entre o peso do solo irrigado ao máximo (início do experimento) e o peso do solo seco (secado a 105 °C); a diferença entre esses pesos consistiu o conteúdo de água no solo.

Ao longo dos experimentos de déficit hídrico os vasos foram pesados, e em cada ponto de coleta foram determinadas as massas das matérias secas dos solos.

O conteúdo de água no solo em cada ponto de coleta foi convertido em porcentagem do conteúdo de água no primeiro dia do experimento (100 %).

### 2.3.2. Determinação do Conteúdo Relativo de Água

O conteúdo relativo de água (CRA), foi calculado segundo a fórmula (Thomas 1991):

$$\text{CRA} = \text{H}_2\text{O tratado} \times 100 / \text{H}_2\text{O T0}$$

$\text{H}_2\text{O tratado}$  = massa seca subtraída da massa fresca dos rizóforos coletados nos diferentes regimes hídricos.

$\text{H}_2\text{O T0}$  = massa seca subtraída da massa fresca dos rizóforos coletados no início do experimento.

### 2.3.3. Estimativa da Área Foliar

A área foliar foi estimada utilizando-se a equação de regressão linear:  $y = 0,2737 + 0,7158 (x)$ , coeficiente de correlação igual a 0,9658 ; onde  $y$  = área foliar e  $x$  = o produto das medidas de comprimento e largura (C X L) de folhas de *Vernonia herbacea* (Carvalho 1991).

## 2.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA DA MATÉRIA SECA

Para a determinação da massa da matéria seca da parte subterrânea, 3 amostras de 3g de rizóforos foram coletadas, de cada tratamento. Depois de pesadas em balança de precisão foram mantidas a 80 °C, até a estabilização do peso. A parte aérea recém coletada de cada planta, quando presente, foi pesada integralmente e constituiu uma única amostra.

## 2.5. EXTRAÇÃO DE FRUTANOS

Os frutanos foram extraídos de amostras de 3 g de rizóforos coletadas em cada tratamento, segundo o método de Pollock & Jones (1979). O procedimento, esquematizado na figura 7, consistiu das seguintes etapas:

A - Inicialmente, as amostras de material fresco foram lavadas, segmentadas e imersas em etanol 80 % a 80 °C, por 5 minutos, para inativação das enzimas. A seguir foram armazenadas a - 20 °C até prosseguirem-se as extrações.

B - Homogeneização, em homogeneizador tipo liquidificador, e centrifugação das amostras. Os resíduos da centrifugação foram re-extraídos, por 5 minutos, em etanol 80% a 80 °C e novamente centrifugados.

C - O resíduo obtido após a separação do segundo sobrenadante foi extraído em água destilada a 60 °C por 30 minutos, duas vezes. Após cada extração, foram filtrados em funil de Büchner.

D - Os filtrados e sobrenadantes dos extratos etanólicos e aquosos foram então reunidos, constituindo o extrato total de frutanos, o qual foi concentrado em evaporador rotatório, a 37 °C até 0,1 do volume inicial.

E - Os extratos concentrados foram congelados a - 20 °C, durante uma noite.

F - Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e centrifugados a 13000 x g, por 10 minutos, a 5 °C.

G - O precipitado foi ressuspenso em água destilada e constituiu parte da fração dos polifrutanos.

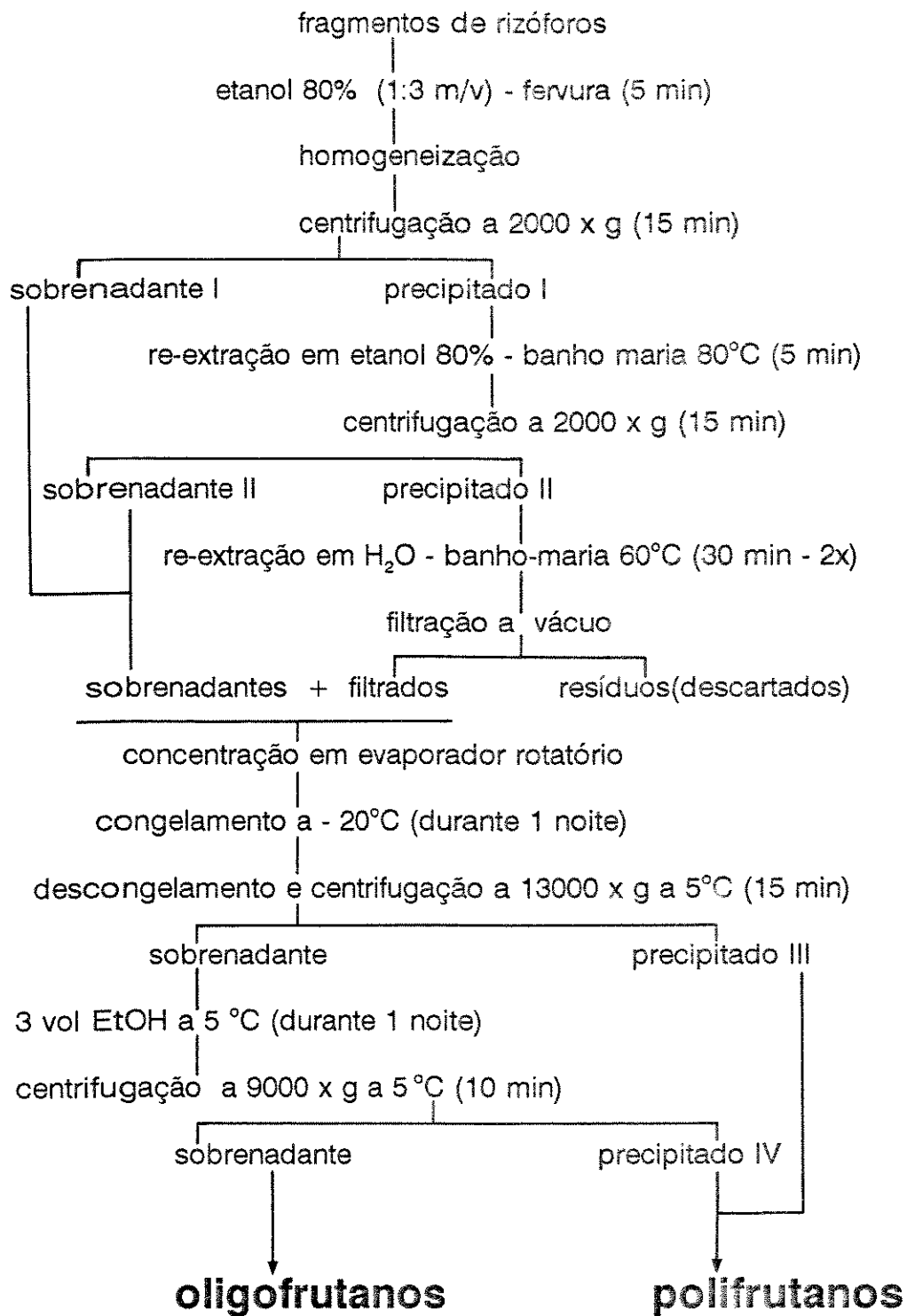


Figura 7 - Fluxograma do procedimento de extração de frutanos.



H - O sobrenadante foi concentrado em rotoevaporador e a seguir foram acrescentados 3 volumes de etanol absoluto. Essa mistura permaneceu a 5 °C, durante uma noite, e depois foi centrifugada a 9000 x g, por 10 minutos, a 5 °C.

I - O precipitado foi acrescentado à fração de polifrutanos e o sobrenadante constituiu a fração de oligofrutanos.

## 2.6. ANÁLISES QUANTITATIVAS DOS FRUTANOS

Tanto a frutose livre como a combinada foram estimadas pela reação de antrona, modificada especificamente para cetoses (Jermyn, 1956). O padrão utilizado foi inulina recristalizada de **Helianthus tuberosus** e o reagente foi antrona 0,2 %, em ácido sulfúrico 76 % . Alíquotas dos diferentes extratos foram completadas para o volume de 0,25 ml. A cada amostra foram adicionados 2,5 ml de reagente. Em seguida, as amostras foram incubadas por 45 minutos a 37 °C. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 620 nm, em espectrofotômetro ( Mod. 35 - Perkin-Elmer Coleman Instruments, E.U.A.).

## 2.7. CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTANOS

2.7.1. Cromatografia em camada delgada (TLC) de alta resolução e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

Os oligofrutanos foram parcialmente purificados através de coluna de troca

iônica (10 x 1 cm), constituída de proporções iguais de resina catiônica (Amberlite IR 120) e aniônica (Amberlite IR 400). Após a aplicação da amostra, os extratos foram eluídos com água destilada (10 vezes o volume da amostra). A seguir, os eluatos tiveram o pH ajustado para 7,0, utilizando-se hidróxido de amônio (25%), e foram concentrados, em rotoevaporador, até seus respectivos volumes iniciais.

Quantidades de oligofrutos parcialmente purificados, equivalentes a 80  $\mu\text{g}$  de frutose, foram cromatografados em placas de sílica-gel resistentes a ácido (TLC readyfoils F1500, da Schleicher & Schuell), com desenvolvimento duplo, por 7 horas, em n-butanol:2-propanol:água (3:12:4 v/v) (Kanaya *et al.*, 1955), e reveladas pelo reagente uréia / ácido fosfórico (Wise *et al.*, 1955). Utilizou-se como padrão uma mistura de oligofrutos extraídos de tubérculos de **Helianthus tuberosus**, preparados conforme Cairns & Pollock (1988). As placas foram fotografadas imediatamente após a revelação. Através desses procedimentos, foi possível a separação de componentes da série homóloga de frutos com cadeias de até 13 resíduos de frutose.

Após a análise em TLC algumas amostras foram selecionadas e suas frações de oligofrutos semipurificadas foram concentradas até a secura e retomadas em água deionizada na concentração de 400  $\mu\text{g}$  de frutose/ml e a seguir centrifugadas em microcentrífuga por 5 minutos a 13000 x g; esses extratos foram filtrados em membrana de nylon, específica para HPLC, de 0,45  $\mu\text{m}$  (Spartan-3, da Aldrich). Os extratos filtrados foram analisados em um cromatógrafo de íons (Dionex DX-300) acoplado a um detector amperométrico pulsado (HPAEC/PAD), em coluna Carbo Pack PA1, conforme a técnica de Shiomi *et al.* (1991) modificada, na qual se utilizam como eluentes um gradiente de hidróxido de sódio 150 mM (eluente A) e acetato de

sódio 500 mM em hidróxido de sódio 150 mM (eluyente B). A programação usada foi: 0-1 min, 25 mM; 1-2 min, 25mM a 50 mM; 2-14 min, 50 mM a 500 mM; 14-22 min, 500 mM; 22-30 min, 25 mM.. Os potenciais aplicados ao PAD foram: T1 = 540 ms, E1 = - 0,10; T2 = 120 ms, E2 = - 0,60; T3 = 60 ms, E3 = - 0,60.

A concentração em  $\mu\text{g/ml}$  da frutose, glicose, sacarose e isocestose foi determinada em HPLC com base nas curvas de calibrações, nas quais utilizaram-se padrões autênticos destas substâncias, adquiridos da Sigma (USA). O padrão de 1-cestose foi gentilmente cedido pelo Dr. Norio Shiomi, da Rakuno Gakuen University (Japão).

### 2.7.2. Estimativa do grau de polimerização médio

Alíquotas de 1 ml das frações de polifrutanos (contendo o equivalente a 5 mg de frutose), dialisadas por uma noite contra água corrente à temperatura ambiente, foram fracionadas em coluna de Bio Gel P-10 (Bio Rab, E.U.A.), com fluxo de 0,3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  e eluídas com bicarbonato de amônio 10mM contendo azida sódica (50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Nas frações coletadas (2,3ml cada) foi determinado o conteúdo de frutose total (método descrito no item 2.8.). A fim de determinar a massa molecular média aparente dos polímeros analisados, a coluna foi calibrada com dextranos lineares de massas moleculares de 1,15 ; 5,5 e 10,4 kDa (Andrews, 1965).

## 2.8. MEDIDA DO RÍTMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Foram utilizados rizóforos retirados de plantas adultas de **Vernonia herbacea**,

coletadas no cerrado, para extração de inulina conforme descrito no item 2.8. A fração utilizada para a medida do ritmo de filtração glomerular corresponde à do precipitado IV do fluxograma de extração de frutanos, descrito na figura 7 (polifrutanos).

Foram estimadas as variações das massas moleculares da inulina extraída de **Vernonia herbacea** e da inulina importada (Sigma, USA) obtida de **Dahlia** sp . Ambas inulinas foram utilizadas para as medidas do ritmo de filtração glomerular pelo método de clearance. Por definição, clearance de uma substância corresponde ao volume de plasma que é depurado da substância em um determinado tempo. Como a inulina é uma substância que é apenas filtrada, não sendo reabsorvida nem secretada pelos túbulos renais, seu clearance indica o quanto de plasma está sendo filtrado, ou seja, o ritmo de filtração glomerular (Aires, 1991).

O ritmo de filtração glomerular foi determinado no Laboratório de Biofísica Renal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram utilizados 15 ratos Wistar, machos, anestesiados com inactin (100 mg/kg de massa de rato), mantidos em mesa cirúrgica aquecida a 37 °C. Com o intuito de levar o conteúdo plasmático de inulina a uma concentração considerada adequada para a dosagem, foi injetada, pela jugular, uma dose inicial ("prime") de 30 mg de inulina para cada 100 g de massa de rato, dissolvida em 1 ml de solução fisiológica (9 g NaCl:1 l H<sub>2</sub>O). Devido às perdas urinárias, a concentração plasmática foi mantida por infusão de 0,5 mg de inulina/ 100 g de rato / minuto, dissolvida em solução fisiológica acrescida de 3 % de manitol, para aumentar a diurese do animal. O fluxo utilizado na bomba de infusão foi de 0,055 ml.min<sup>-1</sup>.

Para determinação da concentração urinária de inulina coletou-se urina através

de sonda vesical e, para a plasmática, retirou-se sangue da carótida, o qual foi centrifugado em seguida. Ambas coletas foram realizadas em intervalos de 30 minutos.

As determinações do conteúdo de inulina foram realizadas conforme descrito no item 2.6., após prévia diluição da urina (1:100, em água destilada) e desproteinização plasmática (1:10 em ácido perclórico 5%).

O fluxo urinário foi determinado dividindo o volume de urina coletado pelo intervalo (em minuto) de cada coleta

No decorrer do experimento a pressão arterial média do animal foi avaliada por meio de cateter colocado na carótida, conectado a um transdutor de pressão.

As medidas de clearance de inulina de *V. herbacea* e da Sigma foram calculadas segundo a fórmula geral de clearance (Aires, 1991):

$$C_i = U_i V / P_i$$

em que:

$C_i$  = depuração plasmática da inulina (ml / min)

$U_i$  = concentração urinária de inulina (mg / ml)

$P_i$  = concentração plasmática da inulina (mg / ml)

$V$  = fluxo urinário (ml / min)

A carga filtrada foi obtida multiplicando-se a concentração plasmática de inulina pelo ritmo de filtração glomerular (clearance) e a carga excretada, multiplicando-se a concentração de inulina na urina pelo fluxo urinário.

## 2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados bioquímicos obtidos para os diferentes pontos de amostragem foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média. Os dados referentes ao crescimento foram submetidos a análise de variância, através do teste de Tukey. Para estas análises utilizou-se o programa para microcomputador P.C., fornecido pelo Prof. Dr Ladaslav Sodek (Departamento de Fisiologia Vegetal-UNICAMP).

Nos experimentos de medida do ritmo de filtração glomerular os resultados foram analisados através do teste t de Student.

# RESULTADOS

## 1 - EFEITO DE TEMPERATURA BAIXA NO

### METABOLISMO DE FRUTANOS DE *V. herbacea*

#### 1.1. Características das plantas no tratamento de frio

As partes aéreas das plantas em início de dormência, que já apresentavam no início do experimento sinais de senescência (algumas folhas amarelas), ao serem submetidas a 5 °C e 25/5 °C (dia/noite) por sete dias secaram totalmente e se desprenderam da planta. As plantas mantidas a 25 °C e em ripado mantiveram suas partes aéreas.

Plantas em fase de dormência não apresentavam parte aérea desde o início do experimento.

#### 1.2. Análises quantitativas dos frutanos

##### 1.2.1. Experimentos com plantas intactas

Nos rizóforos de plantas em início de dormência submetidas a 5 °C e a 25/5 °C ocorreu aumento significativo do conteúdo de oligo e polifrutanos, em comparação aos frutanos dos rizóforos das plantas mantidas a 25 °C contantes e aos teores dos tratamentos controles no tempo 0 e 7 dias (T0 e T7 ; Figura 8).

Rizóforos de plantas submetidas à alternância de temperatura (25/5 °C) apresentaram conteúdo de oligo e polifrutanos intermediário aos observados nos rizóforos das plantas mantidas a 5 e 25 °C (Figura 8).

Plantas em fase de dormência, após 5 dias a 5 °C apresentaram em seus rizóforos uma diminuição de oligofrutanos em relação ao início do experimento, enquanto que os mesmos aumentaram nos rizóforos das plantas mantidas a 25 °C durante este período (Figura 9 A).

Nos rizóforos das plantas em fase de dormência, mantidas a 5 °C, o conteúdo de polifrutanos diminuiu no segundo dia e a seguir foi aumentando gradativamente até o quarto dia. Nos rizóforos das plantas mantidas a 25 °C a diminuição do conteúdo dos polifrutanos ocorreu logo no primeiro dia, aumentando só após o terceiro dia. Nas duas temperaturas utilizadas o conteúdo de polifrutanos não ultrapassou os valores iniciais do dia 0 (Figura 9 B).

### 1.2.2. Experimentos com fragmentos de rizóforos

Os conteúdos de oligofrutanos foram mais elevados nos fragmentos de rizóforos de plantas em fase de brotação do que nos rizóforos em fase de dormência; isso ocorreu independentemente da temperatura em que os fragmentos foram mantidos (Figuras 10 A e 11 A).



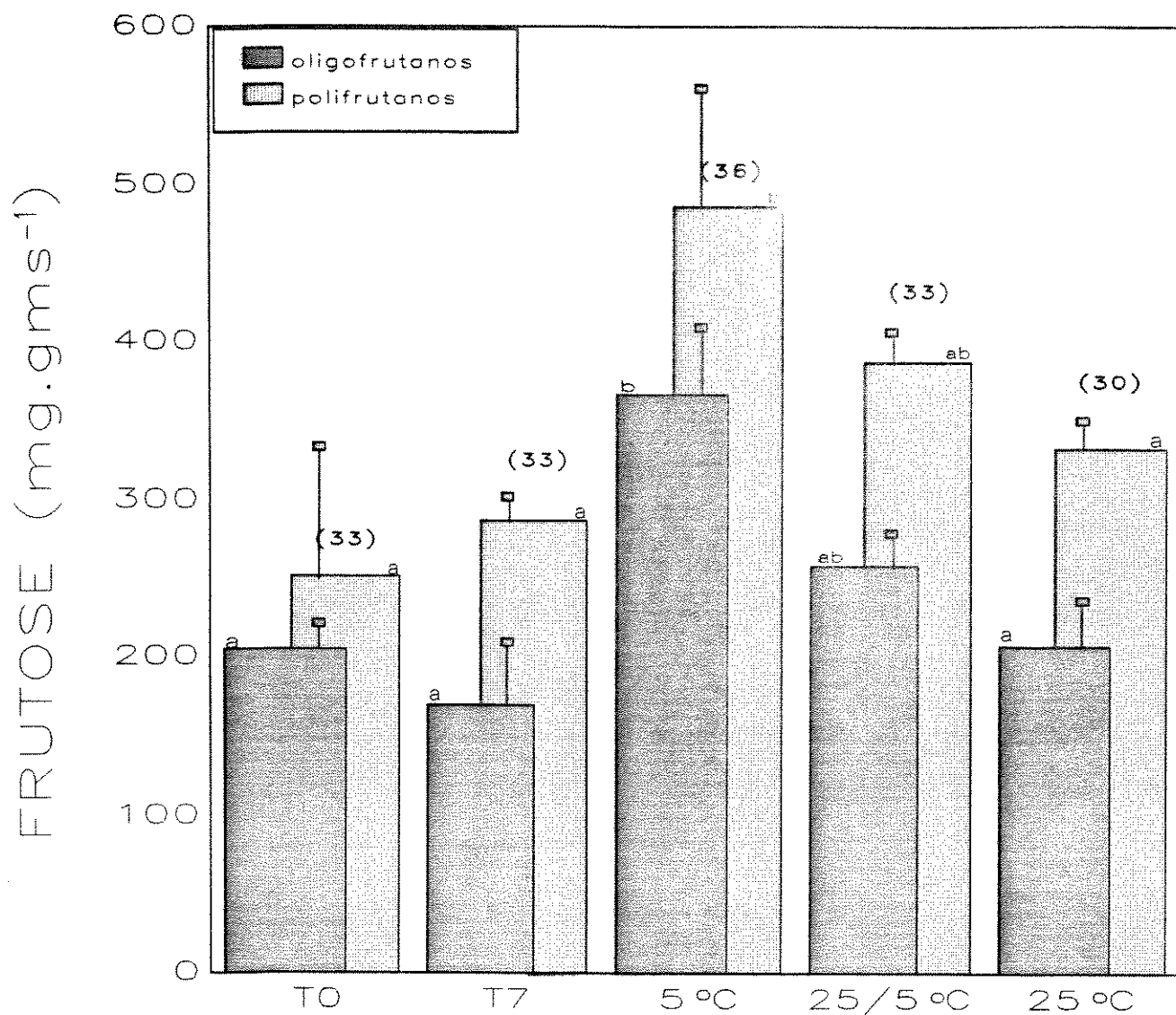


Figura 8 - Conteúdo dos frutanos presentes rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em início de dormência, submetidas a 5 °C, 25 °C, 25/5 °C (dia/noite) e ripado (T7), durante 7 dias (T0 - início do experimento). Os números entre parênteses representam o grau de polimerização médio dos polifrutanos. Barras verticais representam o erro padrão. Dados expressos em micrograma de frutose por grama de massa fresca. As letras representam comparações entre os diferentes tratamentos.

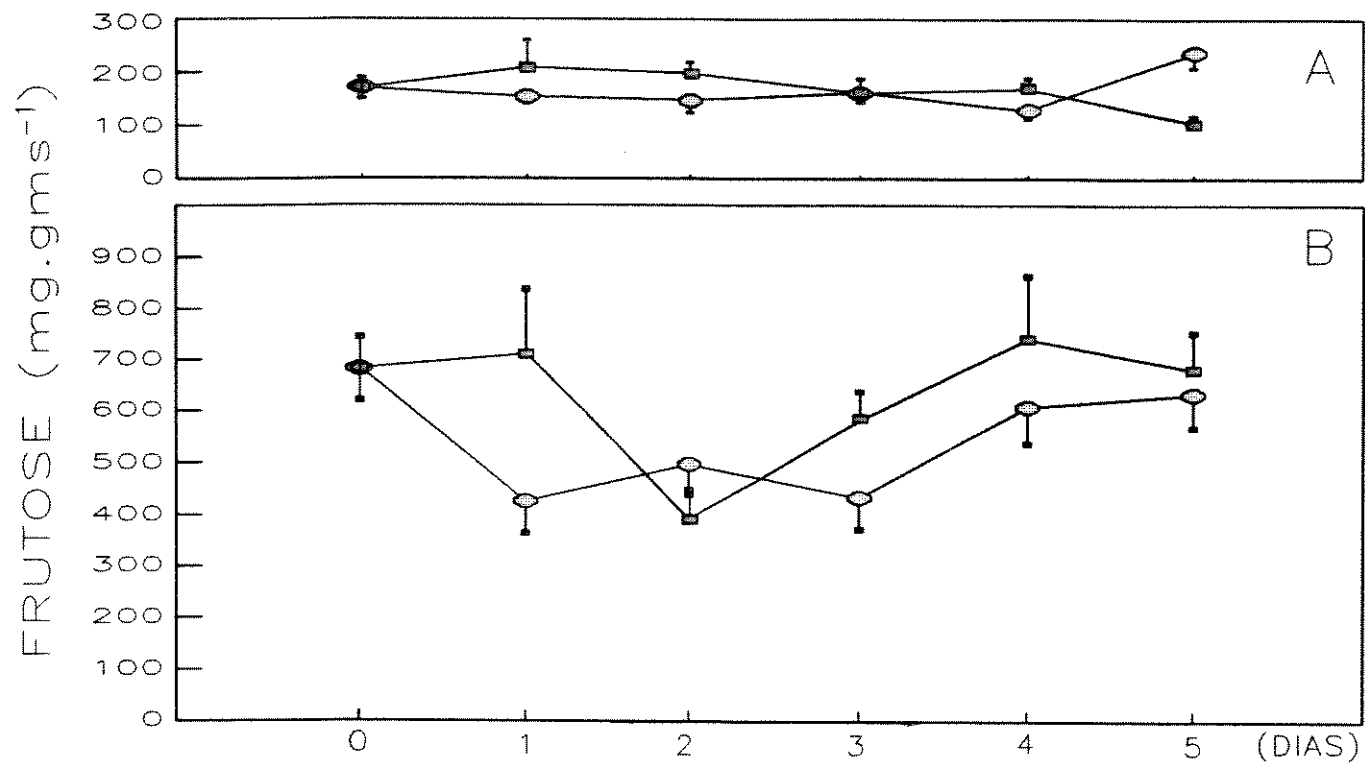


Figura 9 - Conteúdo dos frutanos em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidas a  $\square$  5 °C e  $\circ$  25 °C durante 5 dias.

A - Oligofrutanos , B - Polifrutanos. Barras verticais representam o erro padrão.

Dados expressos em micrograma de frutose por grama de massa fresca.

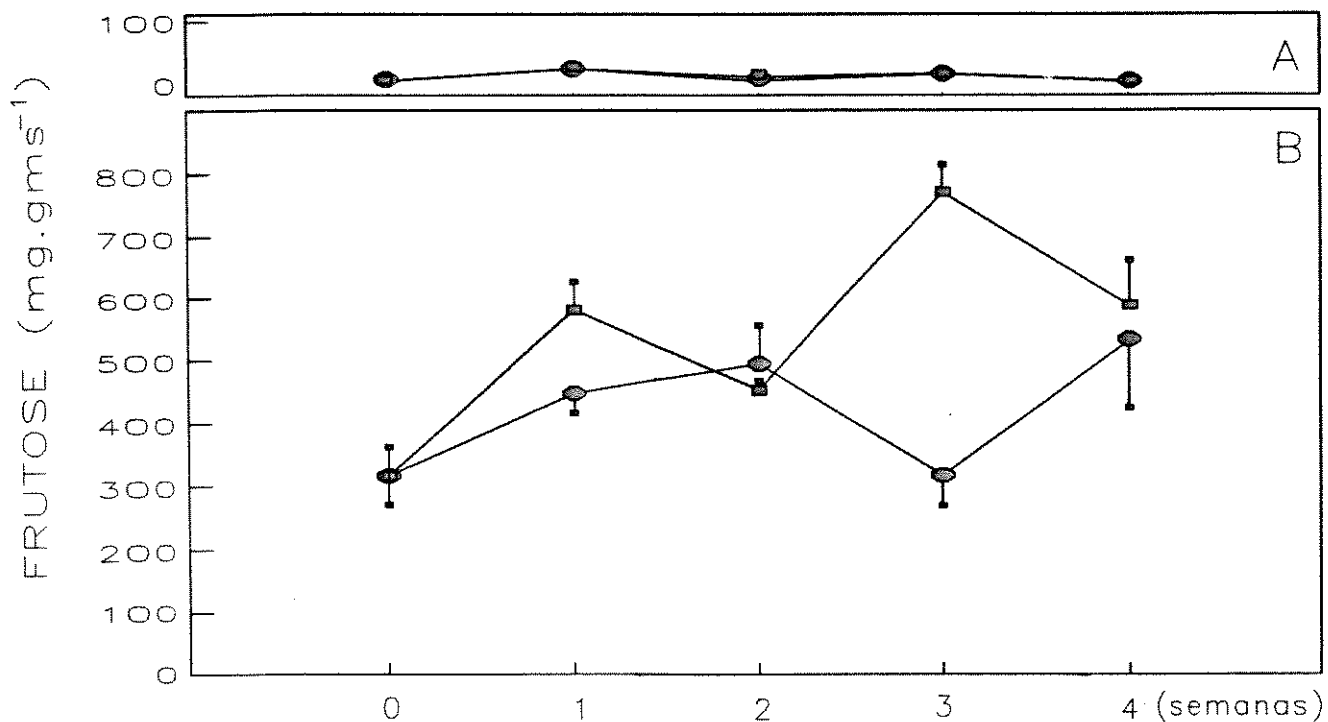


Figura 10 - Conteúdo dos frutanos em fragmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidas a  $\square$  5 °C e  $\circ$  20 °C durante 4 semanas. A - Oligofrutanos, B - Polifrutanos. Barras verticais representam o erro padrão. Dados expressos em micrograma de frutose por grama de massa fresca.

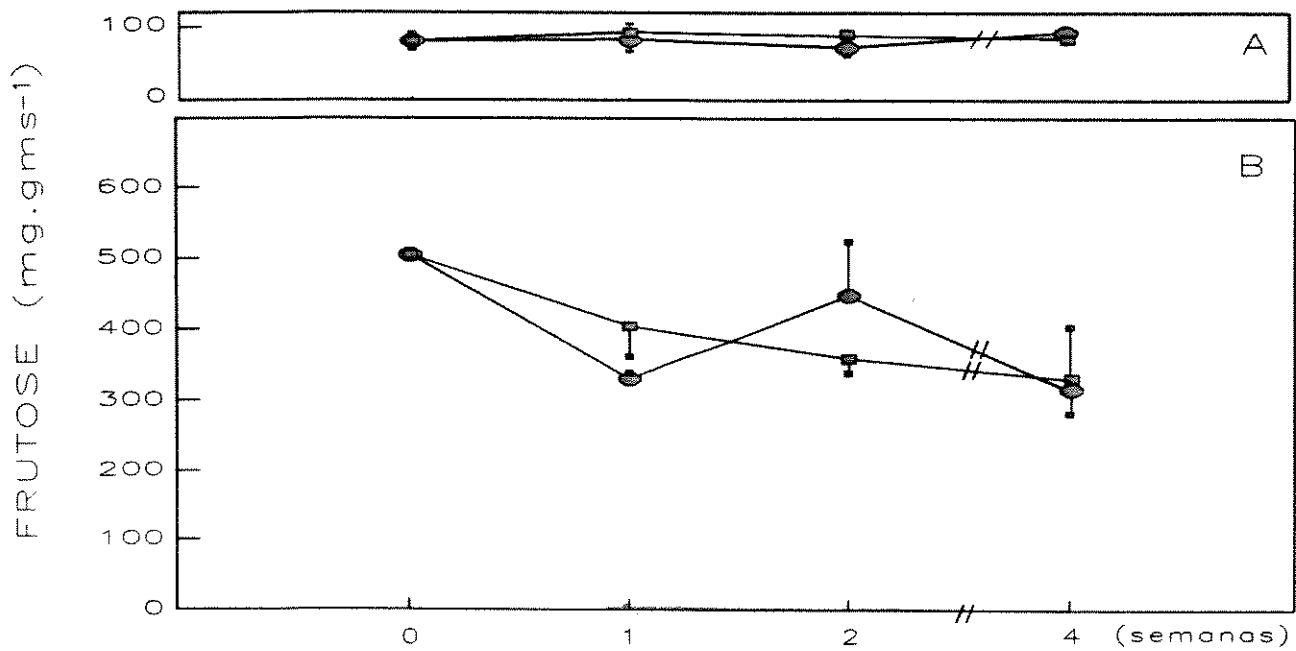


Figura 11 - Conteúdo dos frutanos em fragmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de brotação, submetidas a  $\square$  5 °C,  $\circ$  20 °C durante 4 semanas. A - Oligofrutanos , B - Polifrutanos. Barras verticais representam o erro padrão. Dados expressos em micrograma de frutose por grama de massa fresca.

O conteúdo de polifrutanos em fragmentos de rizóforos de plantas em fase de dormência aumentou quando estes foram mantidos a 5 °C por 3 semanas (Figura 10B). Ao final de 4 semanas este conteúdo diminuiu, ficando em nível semelhante tanto nos fragmentos mantidos a 5 °C quanto nos mantidos a 20 °C. A tendência em ambos tratamentos foi aumentar o conteúdo de polifrutano em relação ao início do experimento.

Os conteúdos de polifrutanos em fragmentos de rizóforos em fase de brotação, nas plantas mantidas em 5 °C e 20 °C por 4 semanas tenderam a diminuir ao longo do tempo (Figura 11 B).

## 1.3. Caracterização dos frutanos

### 1.3.1. Oligofrutanos

#### 1.3.1.1. Experimentos com plantas intactas

A relação sacarose:frutose foi maior em rizóforos de plantas em início de dormência (Figura 12) e em dormência (Figuras 13, 14 e Tabela 1) no final do tratamento a 5 °C (constante ou alternado) em comparação aos dos obtidos em plantas mantidas a 25 °C (constante).

Nos rizóforos das plantas em fase de dormência, sempre a quantidade de sacarose foi maior que a de frutose; isto ocorreu desde o início do experimento e independente das temperaturas a que as plantas foram submetidas (Figura 13). As análises em HPLC, que permitem determinar as concentrações absolutas de cada

açúcar nos extratos, revelaram que nas plantas mantidas a 5 °C o conteúdo de sacarose foi aumentando proporcionalmente ao tempo de exposição à temperatura baixa. Do terceiro para o quinto dia observou-se que o conteúdo de frutose diminuiu nas plantas mantidas a 5 °C, enquanto que nas plantas mantidas a 25 °C ocorreu diminuição de sacarose e aumento de frutose (Tabela 1).

#### 1.3.1.2. Experimentos com fragmentos de rizóforos

Os oligofrutanos presentes em segmentos de rizóforos, extraídos de plantas em fase de dormência (Figuras 15 , 16 e Tabela 2) e fase de brotação (Figuras 17, 18 e tabela 3), armazenados por 4 semanas a 5 °C e 20 °C apresentaram um teor de frutose alto em comparação aos presentes em plantas intactas. A relação sacarose:frutose foi maior nos segmentos de rizóforos de plantas em fase de dormência mantidos a 5 °C em comparação aos mantidos a 20 °C principalmente no final do tratamento (Figuras 15 , 16 e Tabela 2).

Os oligofrutanos de maior grau de polimerização (4 a  $\geq 10$ ) apresentam coloração mais intensa (TLC) ou maiores áreas (HPLC) nos fragmentos mantidos a 20 °C, indicando uma concentração maior destes nesse tratamento (Figuras 15 a 18).

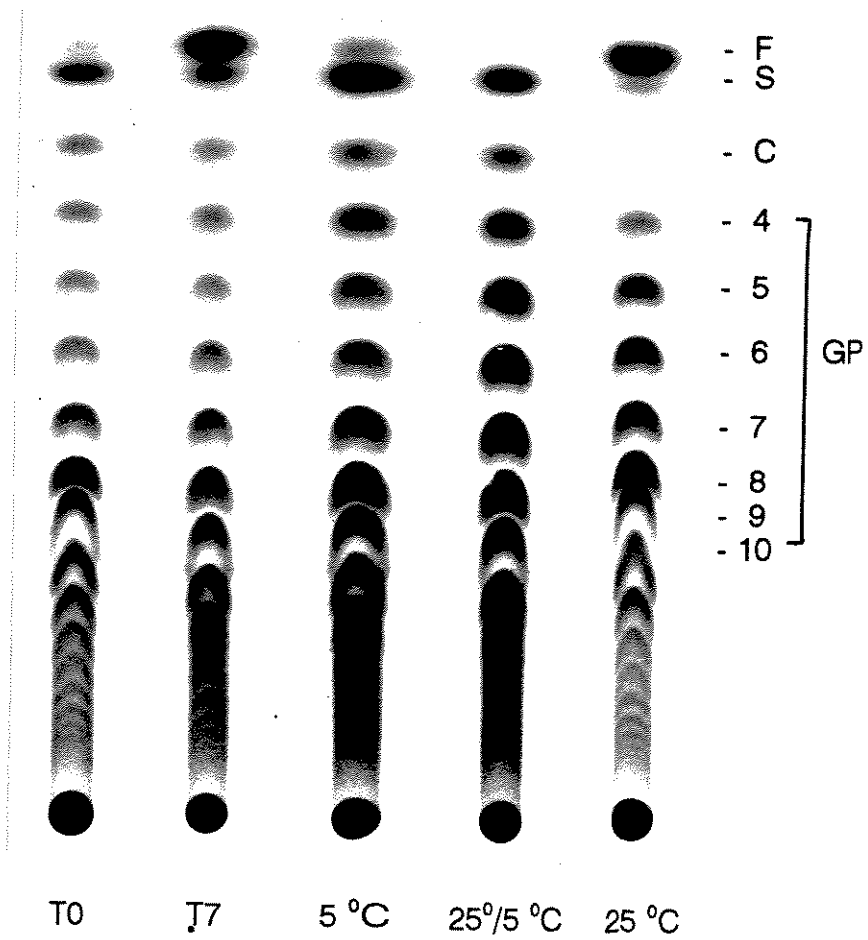


Figura 12 - Cromatografia em camada delgada de alta resolução dos oligofrutanos presentes em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em início de dormência, submetidas a 5 °C, 25 °C e 25/5 °C (dia/noite), durante 7 dias. (T0-início do experimento, T7-plantas em temperatura ambiente por 7 dias, F-frutose S-sacarose C-1-cellobiose, GP- grau de polimerização).

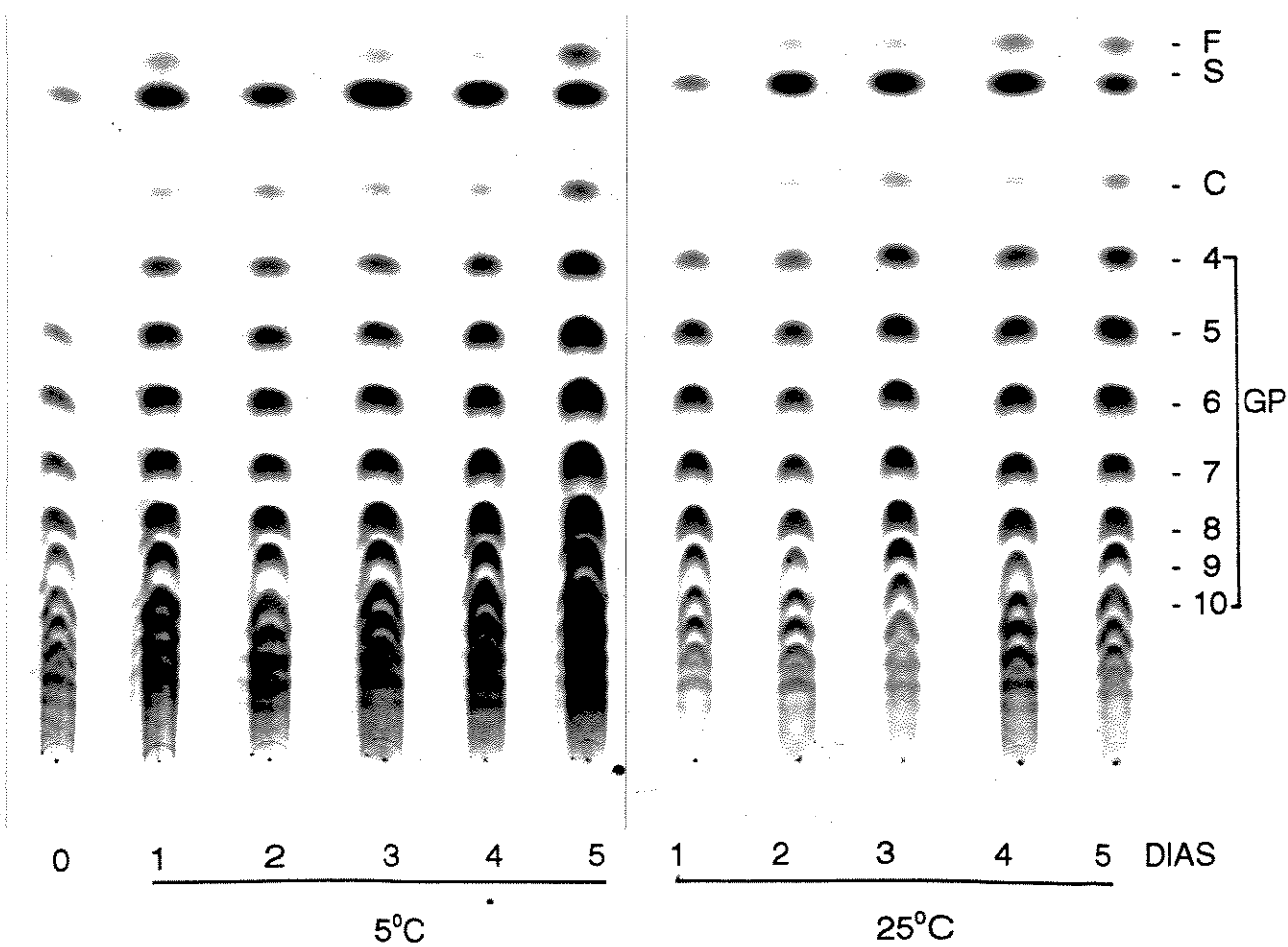


Figura 13 - Cromatografia em camada delgada de alta resolução dos oligofrutanos presentes em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidas a 5 °C e a 25 °C durante 5 dias ( F-frutose S-sacarose C-1-cestose, GP- grau de polimerização).



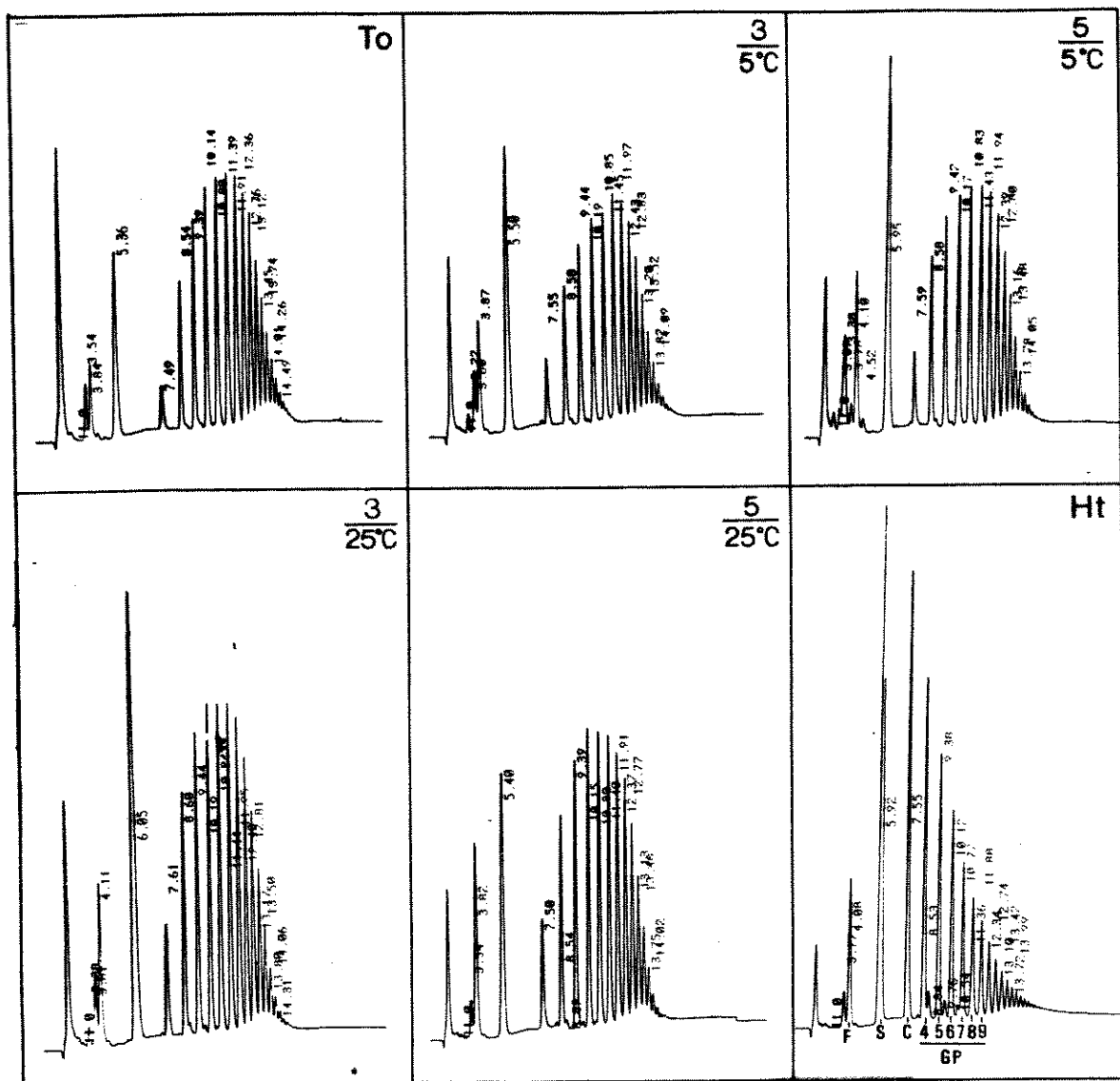


Figura 14 - HPLC dos oligofrutanos presentes em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidas a 5 °C e a 25 °C durante 5 dias. Os números superiores indicam a duração em dias e os inferiores as temperaturas (°C) de cada tratamento; To dia do início do experimento e Ht- oligofrutanos de **Helianthus tuberosus** (F- frutose, S- sacarose, C- 1-cestose, GP- grau de polimerização). Os números localizados ao lado de cada pico cromatográfico indicam o tempo (minutos) de retenção de cada membro da série da 1-cestose.

Tabela 1 - Concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ) de mono-, di- e trissacarídeos em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea** em dormência submetidas a 5 °C e 25 °C , durante 5 dias. A concentração inicial de açúcar total injetado no HPLC foi de 400 $\mu\text{g/ml}$  de equivalente de frutose. Nos tratamentos, os números anteriores às barras indicam sua duração em dias e os posteriores as temperaturas (°C) de cada tratamento; To dia do início do experimento.

AÇÚCARES	TRATAMENTOS (n° de dias / temperatura)				
	To	3/5°C	5/5°C	3/25°C	5/25°C
GLICOSE	1,44	1,78	3,20	0,42	0,94
FRUTOSE (F)	3,54	5,86	0,94	3,86	10,26
SACAROSE (S)	16,23	25,47	37,89	41,83	23,04
1-CESTOSE	3,91	7,37	8,07	13,71	12,89
Total	25,12	40,48	50,10	59,82	47,13
S:F	4,58	4,34	10,83	40,30	2,24

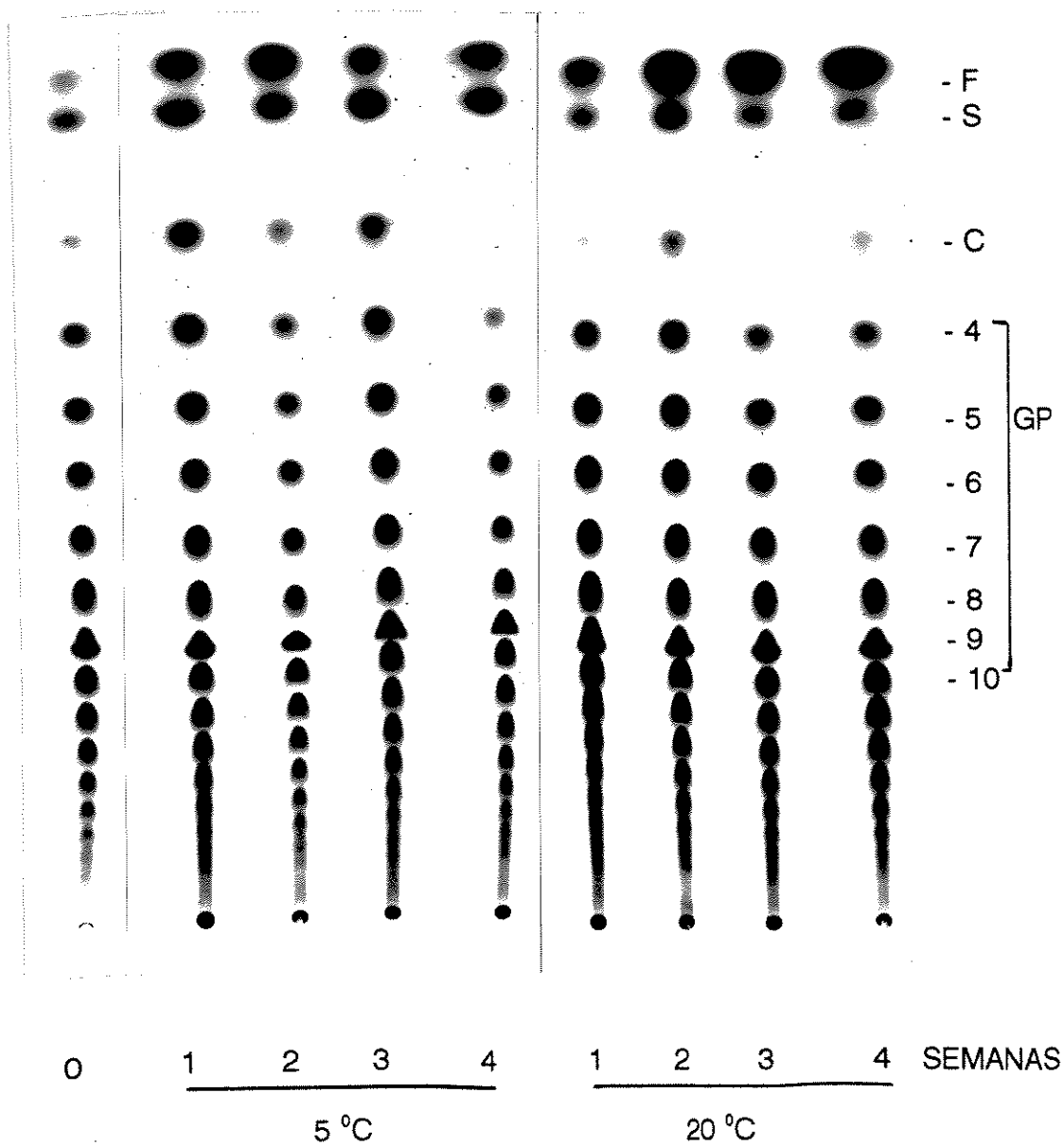


Figura 15 - Cromatografia em camada delgada de alta resolução dos oligofrutanos presentes em fragmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidos a 5 °C e a 20 °C durante 4 semanas ( F-frutose S-sacarose C-1-cestose, GP- grau de polimerização).

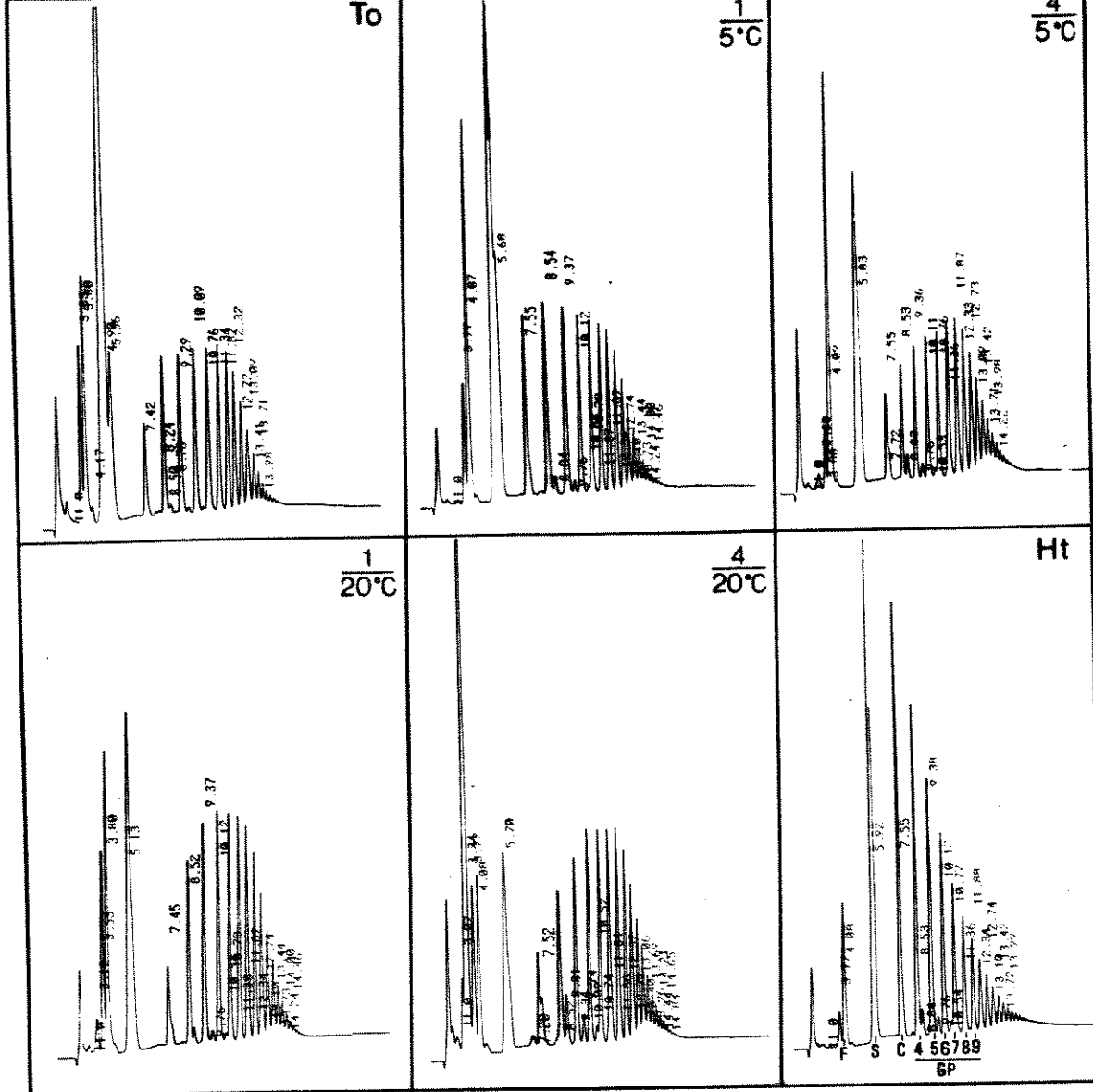


Figura 16 - HPLC dos oligofrutanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidos a 5 °C e a 20 °C durante 4 semanas. Os números superiores indicam a duração em dias e os inferiores as temperaturas (°C) de cada tratamento; To dia do início do experimento e Ht- oligofrutanos de **Helianthus tuberosus** ( F- frutose S- sacarose C- 1-cestose, GP- grau de polimerização). Os números localizados ao lado de cada pico cromatográfico indicam o tempo (minutos) de retenção de cada membro da série da 1-cestose.

Tabela 2 - Concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ) de mono-, di- e trissacarídeos em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência, submetidas a 5 °C e 20 °C durante 4 semanas. A concentração inicial de açúcar total injetado no HPLC foi 400  $\mu\text{g/ml}$  de equivalente a de frutose. Nos tratamentos, os números anteriores às barras indicam sua duração em semanas e os posteriores as temperaturas (°C) de cada tratamento; To dia do início do experimento.

AÇÚCARES	TRATAMENTOS (n° de semanas / temperatura)				
	To	1/5°C	4/5°C	1/20°C	4/20°C
GLICOSE	4,46	-	0,49	5,09	24,92
FRUTOSE (F)	12,19	5,67	2,91	15,60	7,44
SACAROSE (S)	17,37	102,60	42,35	49,75	28,40
1-CESTOSE	12,99	24,98	9,69	11,33	0,34
Total	47,00	133,25	55,44	81,77	61,10
S:F	1,42	18,09	14,55	3,19	3,82

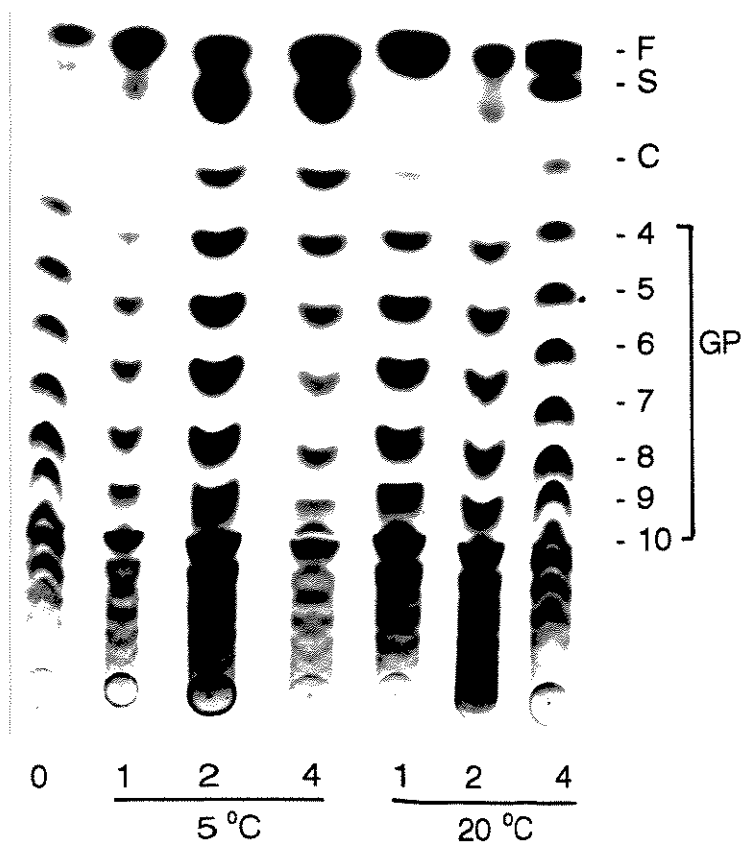


Figura 17 - Cromatografia em camada delgada de alta resolução dos oligofruktanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de brotação, submetidos a 5 °C e a 20 °C durante 4 semanas (F-frutose, S-sacarose C-1-cestose, GP- grau de polimerização).

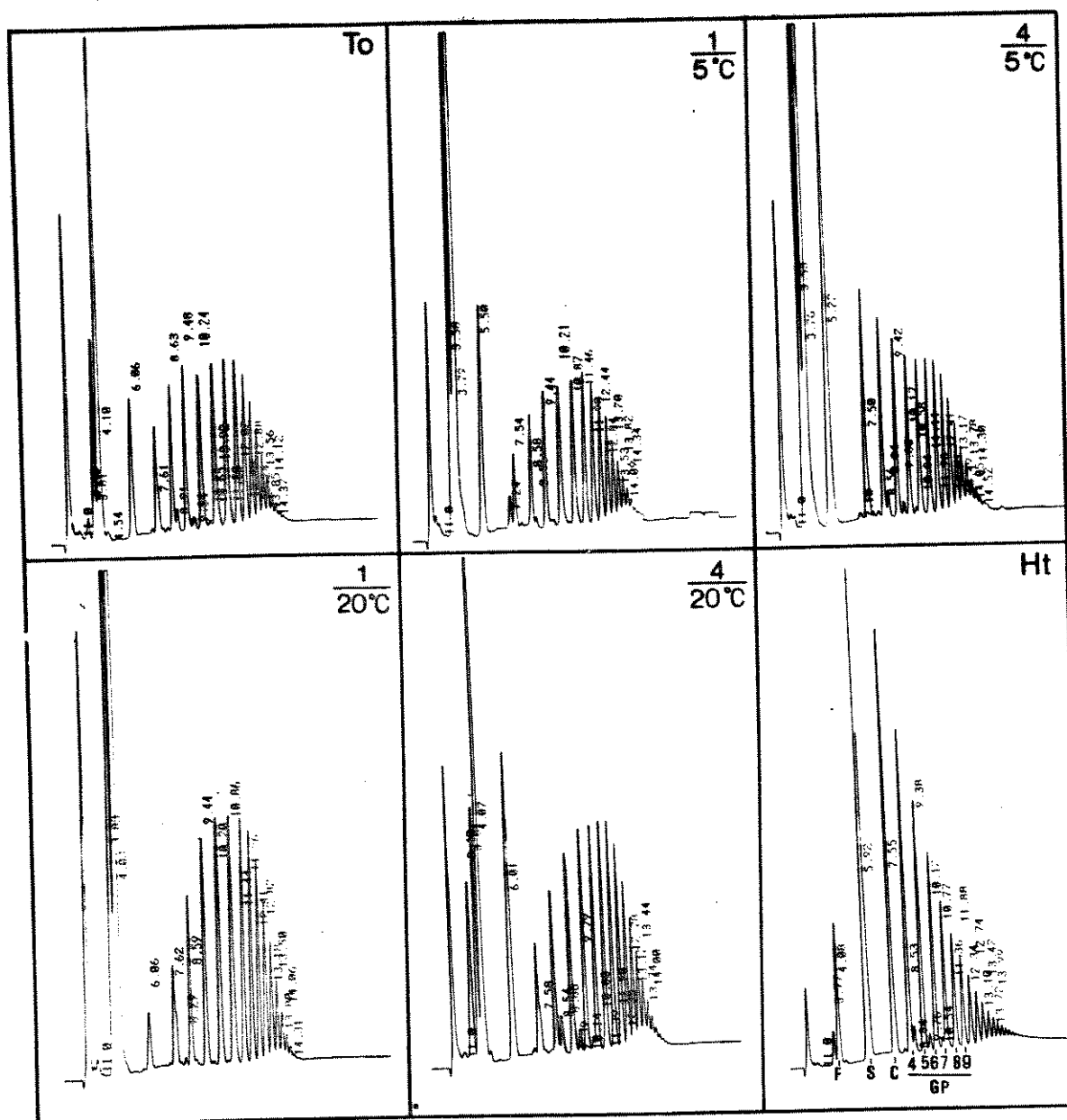


Figura 18 - HPLC dos oligofrutanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de brotação, submetidos a 5 °C e a 20 °C durante 4 semanas. Os números superiores indicam a duração em dias e os inferiores as temperaturas (°C) de cada tratamento; To dia do início do experimento e Ht-oligofrutanos de **Helianthus tuberosus** ( F- frutose S- sacarose C- 1-cestose, GP- grau de polimerização). Os números localizados ao lado de cada pico cromatográfico indicam o tempo (minutos) de retenção de cada membro da série da 1-cestose.

Tabela 3 - Concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ) de mono-, di- e trissacarídeos em rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de brotação, submetidas a 5 °C e 20 °C durante 4 semanas. A concentração inicial de açúcar total injetado em HPLC foi de 400  $\mu\text{g/ml}$  de frutose. Nos tratamentos, os números anteriores às barras indicam sua duração em semanas e os posteriores as temperaturas (°C) de cada tratamento. To dia do início do experimento.

AÇÚCARES	TRATAMENTOS (n° de semanas / temperatura)				
	To	1/5°C	4/5°C	1/20°C	4/20°C
GLICOSE	0,69	13.42	15.76	-	6.12
FRUTOSE (F)	10,40	58.41	60.01	39,16	12.39
SACAROSE (S)	13,08	4.21	55.57	5,30	24.49
1-CESTOSE	17,62	3.40	0.25	17,14	19.93
Total	41,79	79,44	131,59	61,60	62,93
S:F	1,25	0,07	0,92	0,13	1,97



### 1.3.2. Polifrutanos

Conforme assinalado anteriormente, observou-se que os rizóforos das plantas intactas em início de dormência mantidas a 5 °C durante 7 dias apresentaram um maior grau de polimerização médio dos polifrutanos quando comparadas com os das plantas mantidas nos demais tratamentos (Figura 8).

Rizóforos de plantas em fase de dormência mantidas por 5 dias a 5 °C apresentaram, durante o período, oscilações no grau de polimerização médio dos polifrutanos, porém sem ultrapassar o valor inicial. Nas plantas mantidas a 25 °C ocorreu um aumento no grau de polimerização médio no primeiro dia e este permaneceu constante até o final das observações (Tabela 4).

O grau de polimerização médio dos polifrutanos em fragmentos de rizóforos mantidos a 5 e a 20 °C apresentou flutuações, e essas foram maiores nos rizóforos em fase de dormência em relação aos da fase de brotação. Contudo, os rizóforos em fase de brotação apresentaram os maiores valores médios, independente do tempo e da temperatura (Tabela 5).

Observando-se tanto a figura 8 como as tabelas 4 e 5 verifica-se que o grau de polimerização médio no início dos tratamentos é maior nos rizóforos de plantas em fase de brotação do que naqueles de plantas em fase de início de dormência e de dormência .

Tabela 4 - Variação no grau de polimerização médio de polifrutanos presentes em rizóforos de plantas intactas de **Vernonia herbacea**, em início de dormência, submetidas a 5 °C e 25 °C durante 5 dias.

TEMPERATURA	Duração do tratamento (dias)					
	0	1	2	3	4	5
5 °C	25	21	21	25	25	21
25 °C	25	28	28	28	28	28

Tabela 5 - Variação no grau de polimerização médio de polifrutanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, em fase de dormência e brotação, submetidas a 5 °C e 25 °C durante 4 semanas.

TEMPO (SEMANAS)	TEMPERATURA (°C)			
	5		20	
	DORMÊNCIA		BROTAÇÃO	
0	28	28	43	43
1	25	25	43	43
2	34	28	39	39
3	22	38	-	-
4	25	31	39	43

## 2 - EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NO METABOLISMO DE FRUTANOS DE *V. herbacea*

### 2.1. Conteúdo relativo de água nos rizóforos e conteúdo de água no solo durante o déficit hídrico

No início do experimento, o solo estava em capacidade de campo ( 100% irrigado), a água correspondia a 42 % da massa fresca do solo e o conteúdo relativo de água nos rizóforos era de 100%.

O conteúdo relativo de água (CRA) nos tecidos manteve-se inalterado (100 %) em todos os tratamentos, até 30 dias, apesar do conteúdo de água no solo declinar nos diferentes tratamentos (Figura 19).

Após 60 dias o conteúdo de água nos tecidos foi menor nos tratamentos com os maiores intervalos de irrigação; somente no tratamento em que as plantas eram irrigadas a cada sete dias o CRA foi de 100% (Figura 19).

Nas plantas que ficaram 90 dias sem irrigação o conteúdo relativo de água tanto nos tecidos como no solo foi de 14% (figura 19).

### 2.2. Características das plantas durante o déficit hídrico

Após 60 dias, as plantas irrigadas a cada 7 dias apresentaram número de folhas significativamente maior do que as plantas mantidas sem irrigação. As plantas

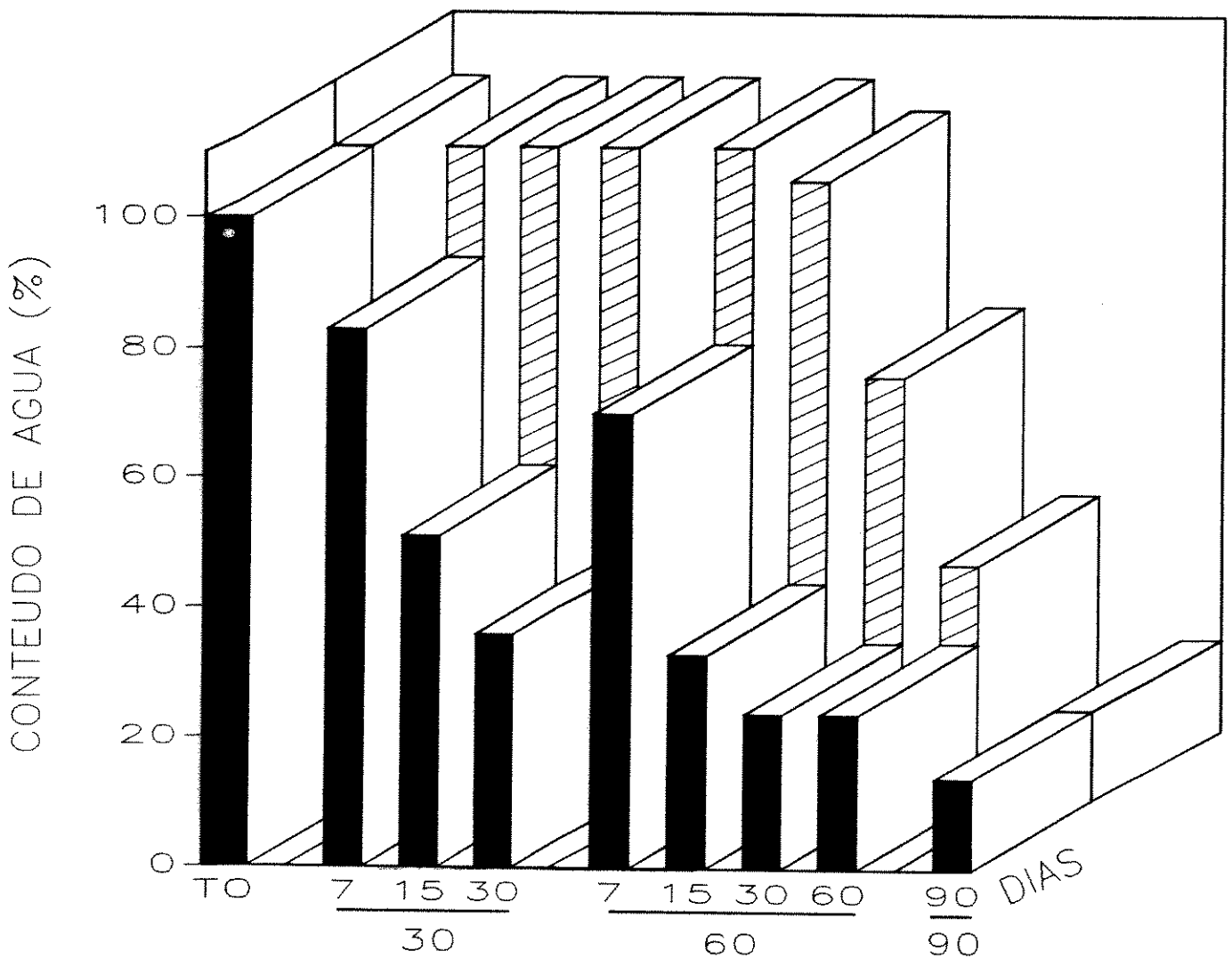


Figura 19 - Conteúdo relativo de água nos tecidos ▨ (expresso em porcentagem da massa fresca) de rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea** submetidas a déficit hídrico por 90 dias e conteúdo de água no solo ■ . Os números superiores localizados na abscissa indicam a periodicidade da irrigação e os inferiores a duração dos tratamentos. T0 dia do início do experimento.

irrigadas a cada 15 dias apresentaram valores intermediários entre esses dois tratamentos (Figura 20 A).

A área foliar total das plantas submetidas a diferentes regimes hídricos por 30 dias, diminuiu em relação ao início do experimento somente nas plantas que ficaram sem irrigação. Após 60 dias a área foliar das plantas irrigadas a cada 7 dias foi semelhante ao das plantas irrigadas a cada 15 dias e as plantas sem irrigação não apresentavam folhas neste período (Figura 20 B).

Não foram observadas diferenças significativas quando se analisou o parâmetro altura das plantas. (Figura 20 C).

As plantas que ficaram sem irrigação, após 30 dias apresentaram uma diminuição de massa fresca, a qual se manteve constante até 60 dias. Após 60 dias as plantas irrigadas a cada 7 dias apresentaram quantidades maiores de massa fresca em relação às não irrigadas e as plantas irrigadas a cada 15 dias, apresentaram valores intermediários entre esses dois tratamentos (Figura 20 D).

As plantas submetidas aos diferentes regimes hídricos, ao tornarem a receber irrigação diária, apresentaram as seguintes porcentagens de sobrevivência : plantas que ficaram 7, 15 e 30 dias sem irrigação - 100%, plantas mantidas 60 dias sem irrigação - 50% e nenhuma planta sobreviveu após 90 dias sem irrigação.

### 2.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS DOS FRUTANOS

Apesar de terem sido observadas variações nos teores de frutanos no rizóforos de plantas submetidas aos diferentes regimes hídricos durante o período analisado, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre si, pois, devido à

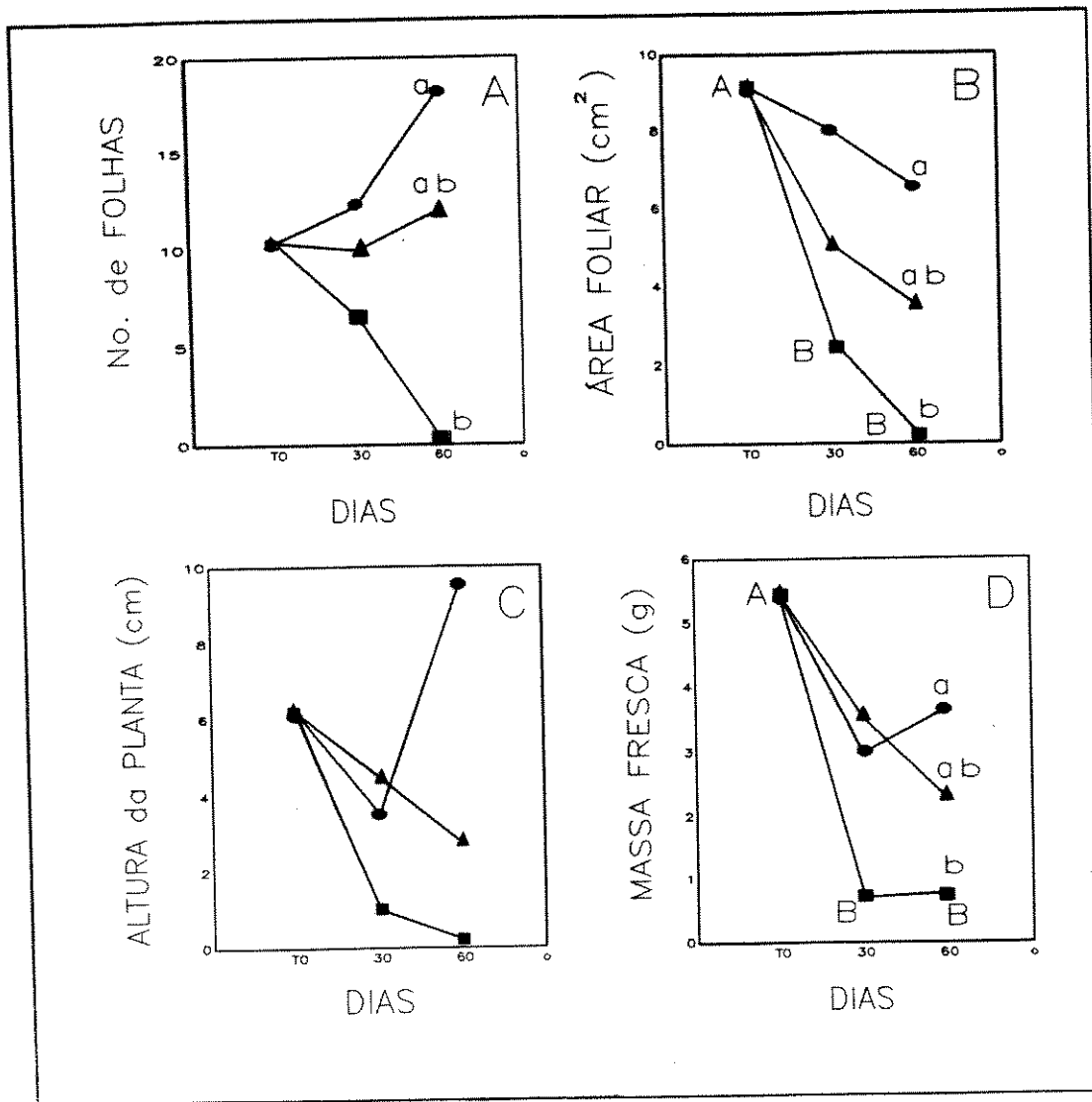


Figura 20 - Características das plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes tratamentos de déficit hídricos (plantas irrigada a cada 7 ● e 15 ▲ dias; sem irrigação ■). Nas abscissas estão os dias em que foram realizadas as amostragens. As letras minúsculas representam as comparações entre os tratamentos num mesmo tempo e que apresentaram diferenças significativas. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas que ocorreram num mesmo tratamento ao longo do tempo.

heterogeneidade das amostras, os erros padrões foram elevados.

Observou-se uma tendência de aumento no conteúdo médio dos oligofrutos presentes nos rizóforos das plantas que ficaram 30 dias sem irrigação (Figura 21 A). Plantas sem irrigação por 60 e 90 dias não apresentaram entre si diferenças nos conteúdos de oligofrutos; contudo, estes valores foram menores do que nos rizóforos das plantas que ficaram 30 dias sem irrigação (Figura 21A).

Após 30 dias, os rizóforos das plantas que não receberam irrigação também apresentaram quantidades maiores de polifrutos do que os rizóforos das plantas irrigadas a cada 7 e 15 dias, que mantiveram o conteúdo inicial. Após 60 dias com ou sem irrigação e independentemente da periodicidade, o conteúdo de polifrutos diminuiu e se manteve nesse nível nas plantas com 90 dias sem irrigação (Figura 21B).

## 2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTANOS

### 2.4.1. Oligofrutos

As plantas que ficaram sem irrigação por 30 dias foram as que apresentaram maiores quantidades de frutose e sacarose (Figuras 22 e 23; Tabela 6).

Através das análises das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por HPLC observou-se que as plantas que ficaram 30, 60 e 90 dias sem irrigação possuíam proporcionalmente quantidades maiores de oligofrutos do que as plantas irrigadas a cada 7 e 15 dias. Nessas condições surgiram outros picos intermediários (não pertencentes à série da inulina) não identificados (Figura 23).



relacionadas com os intervalos de irrigação (Tabela 6).

#### 2.4.2. Polifrutanos

Após 30 dias os frutanos dos rizóforos das plantas irrigadas a cada 7 e 15 dias apresentaram uma diminuição no grau de polimerização médio e os das não irrigadas até aquele momento mantiveram o mesmo grau de polimerização médio do início do experimento (Tabela 7).

Após 60 dias, em todos os regimes de fornecimento de água ocorreu aumento no grau de polimerização médio, especialmente nas plantas mantidas até 60 dias sem irrigação e nas que receberam apenas uma rega aos 30 dias. Após 90 dias sem irrigação o grau de polimerização médio foi o mesmo das plantas que ficaram 60 dias sem irrigação (Tabela 7).

Ao analisarem-se os resultados obtidos por HPLC, observou-se que existe uma tendência dos polifrutanos de menor grau de polimerização (tempo de retenção menor que 12 minutos) irem diminuindo à medida que aumenta o intervalo de irrigação (Figura 24).

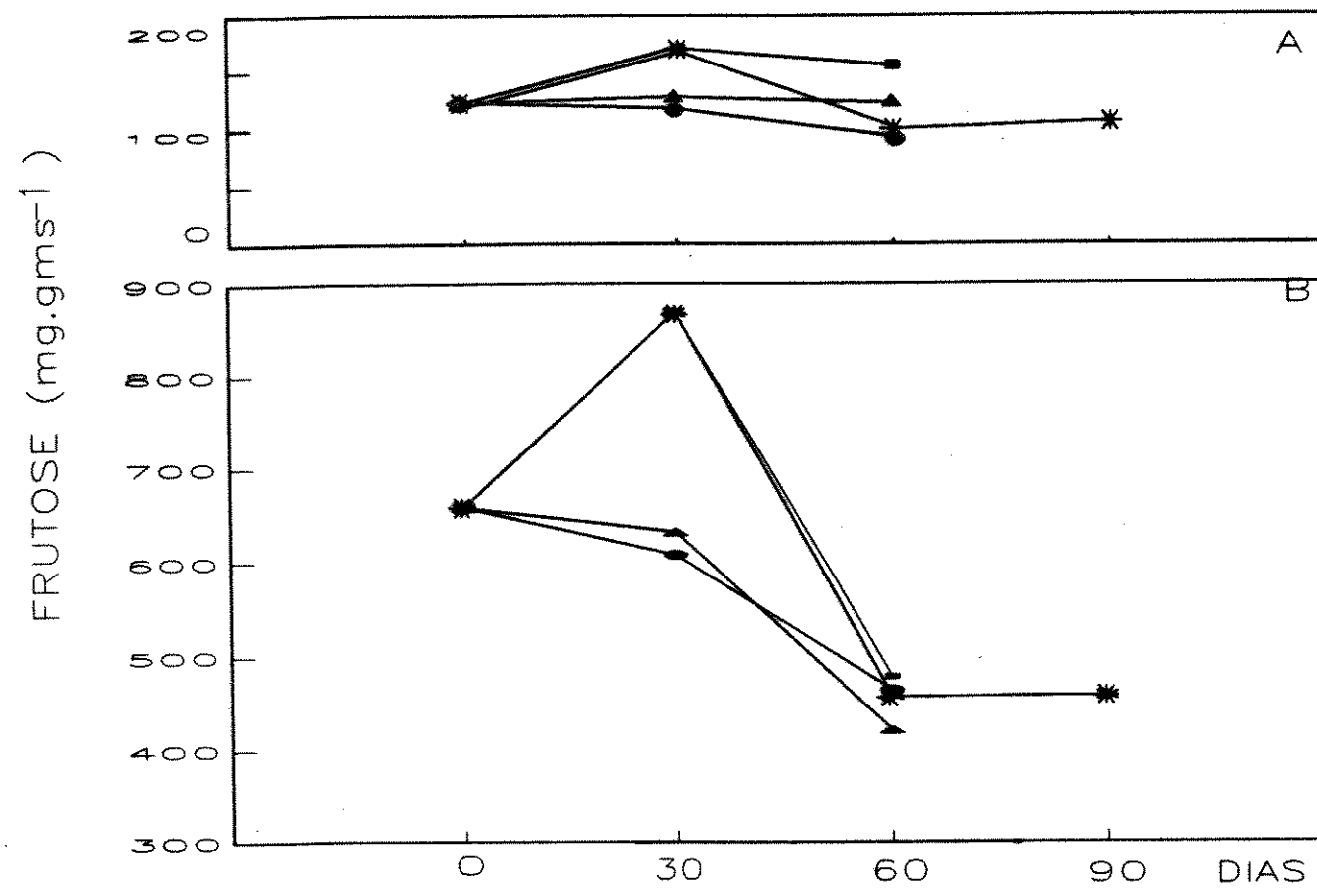


Figura 21 - Conteúdo dos frutanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea*, submetidas a diferentes níveis de déficit hídrico. A - oligofrutanos, B - polifrutanos (plantas irrigadas a cada 7 ● , 15 ▲ e 30 ■ dias; sem irrigação \*).

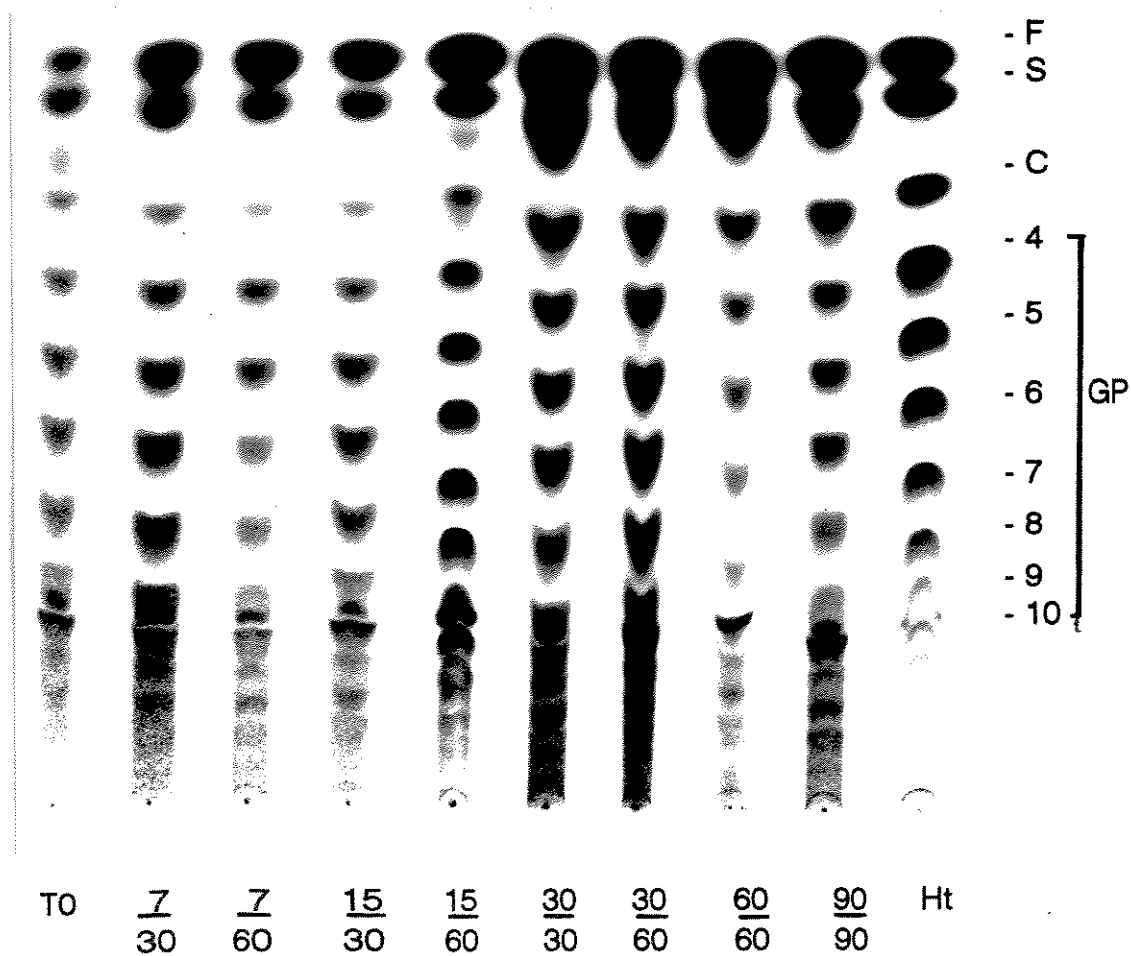


Figura 22 - TLC dos oligofrutanos presentes nos rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea**, submetidas a diferentes regimes hídricos durante 90 dias. F-frutose, S-sacarose, C-1-cestose, Ht-oligofrutanos de **Helianthus tuberosus**, GP- grau de polimerização. Foram aplicadas quantidades equivalentes em termos de massa seca. Os números superiores localizados abaixo da origem do cromatograma indicam a periodicidade (em dias) da irrigação e os inferiores a duração (em dias) dos tratamentos. T0 dia do início do experimento.

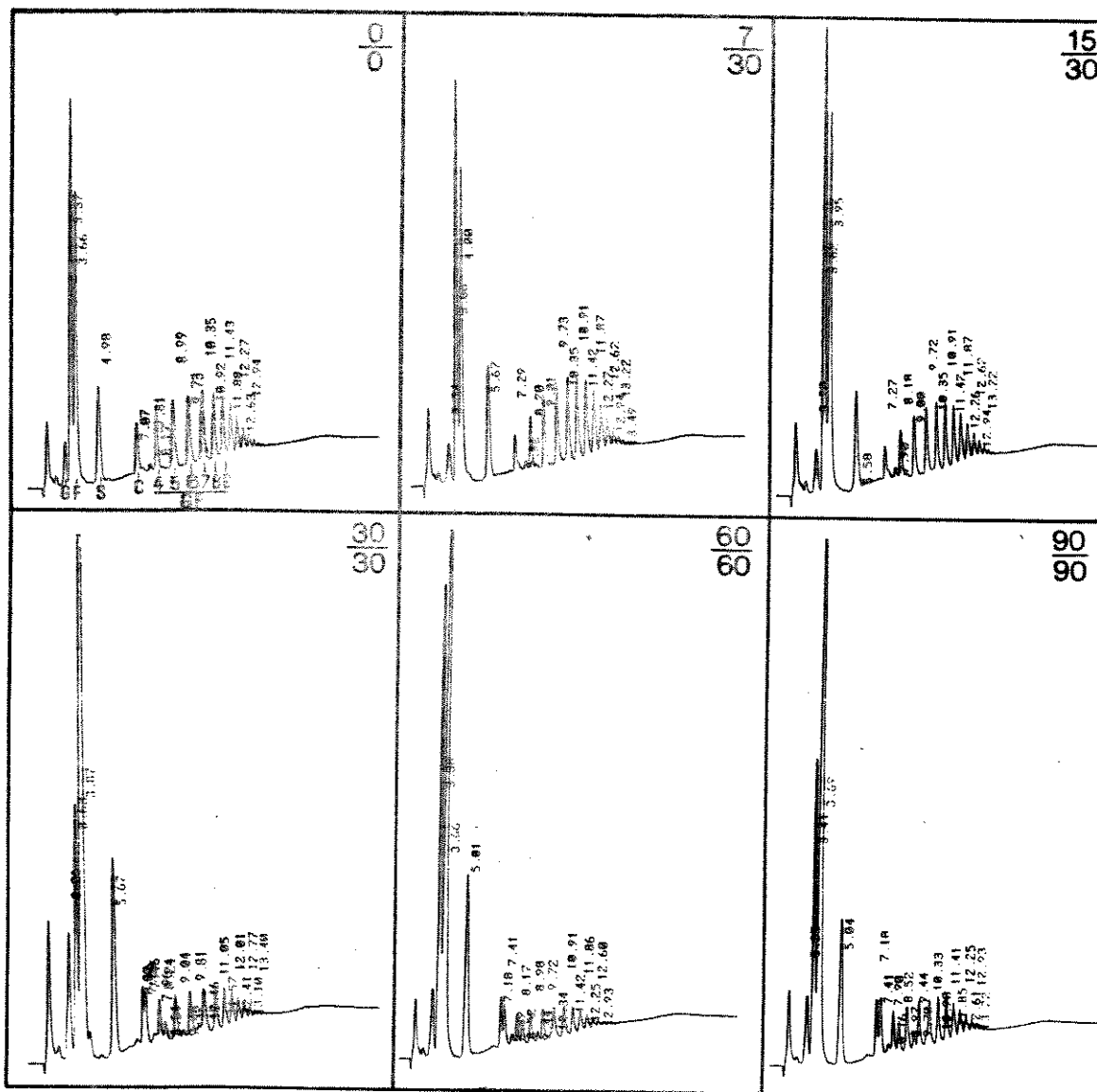


Figura 23 - HPLC dos oligofrutanos presentes nos rizóforos de plantas de *V. herbacea* submetidas a diferentes tratamentos de déficit hídrico. Em cada amostra o número superior indica a periodicidade de irrigação e o número inferior, a duração em dias de cada tratamento. G - glicose, F - frutose, S - sacarose, C - 1-cestose, GP grau de polimerização.

Tabela 6 - Conteúdo ( $\mu\text{g.mg.ms}^{-1}$ ) de mono, di e trissacarídeos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a déficit hídrico e analisados por HPLC. Nos tratamentos, os números anteriores às barras indicam a periodicidade em dias da irrigação e os posteriores a duração em dias dos tratamentos. T0 dia do início do experimento.

AÇÚCARES	TRATAMENTOS								
	T0	7/30	7/60	15/30	15/60	30/30	30/60	60/60	90/90
GLICOSE	6,36	1,09	2,00	1,14	3,43	3,33	1,33	7,79	5,00
FRUTOSE	8,73	9,75	3,00	11,81	21,76	28,86	3,96	22,95	7,50
SACAROSE	5,29	5,83	5,00	5,38	7,31	13,15	6,39	9,44	12,50
1-CESTOSE	5,47	3,94	10,00	3,78	4,74	6,69	3,64	4,82	25,00
TOTAL	25,85	20,61	20,00	22,11	37,24	52,03	15,32	45,50	50,00

Tabela 7 - Grau de polimerização médio de polifrutanos presentes em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea*, submetidas a diferentes tratamentos de déficit hídrico durante 90 dias.

Intervalo de irrigação (dias)	Duração do tratamento (dias)			
	0	30	60	90
0	28			
7		25	31	
15		25	31	
30		28	36	
s/irrigação		28	36	36

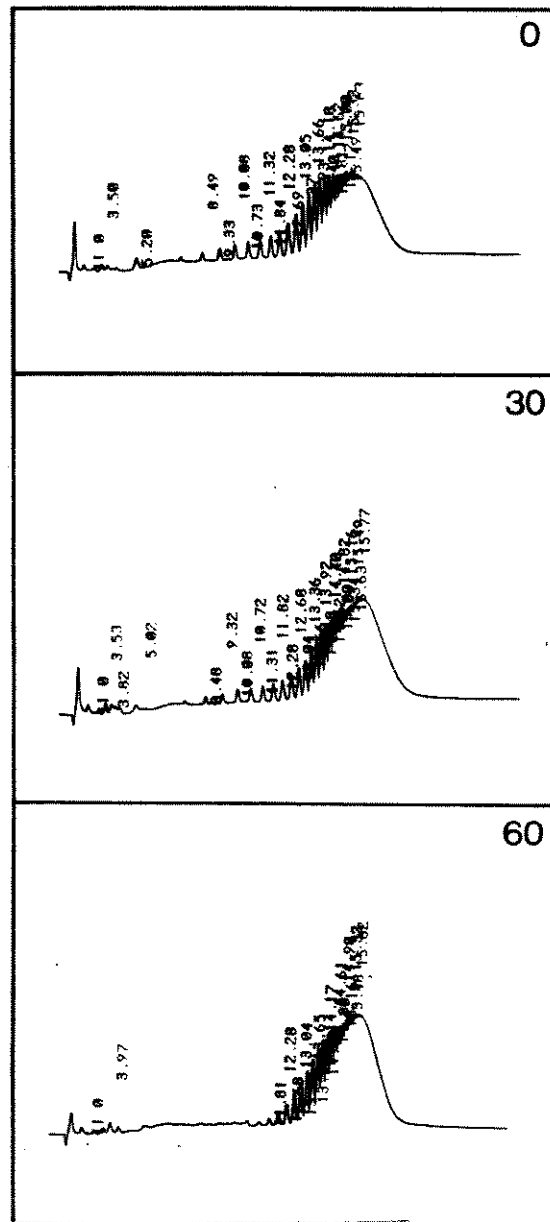


Figura 24 - Análises por HPLC da fração de polifrutanos presentes em segmentos de rizóforos de plantas de *V. herbacea* submetidas a diferentes tratamentos hídricos. O número indicado em cada amostra refere-se ao período, em dias, em que as plantas ficaram sem irrigação.

### 3 - INULINA DE *V. herbacea* NA FUNÇÃO RENAL

A distribuição da massa molecular da inulina de **Vernonia herbacea** é similar à da marca Sigma (Figura 25) sendo a massa molecular média de ambas de 5,6 kDa (grau de polimerização médio = 35 ).

A pressão arterial média dos ratos, após a aplicação das inulinas, foi estatisticamente igual e não variou ao longo do experimento. Seu valor, no caso de aplicação da inulina extraída de **Vernonia herbacea** foi de  $85 \pm 8,16$  mmHg e para a inulina da Sigma foi de  $93 \pm 5,04$ .

O ritmo de filtração glomerular (RFG) não apresentou diferenças significativas, quando medido pelo clearance de inulina de **Dahlia** sp (Sigma) ou de **Vernonia herbacea** (Figura 26). O ritmo de filtração glomerular não foi alterado quando a concentração de inulina utilizada para medidas de clearance foi dobrada (Figura 26). Esse procedimento também não alterou a pressão arterial.

A carga filtrada e a carga excretada da inulina de **Vernonia herbacea** são estatisticamente iguais (Figura 27). Essa igualdade se manteve, independentemente da concentração de inulina utilizada (resultados não apresentados).



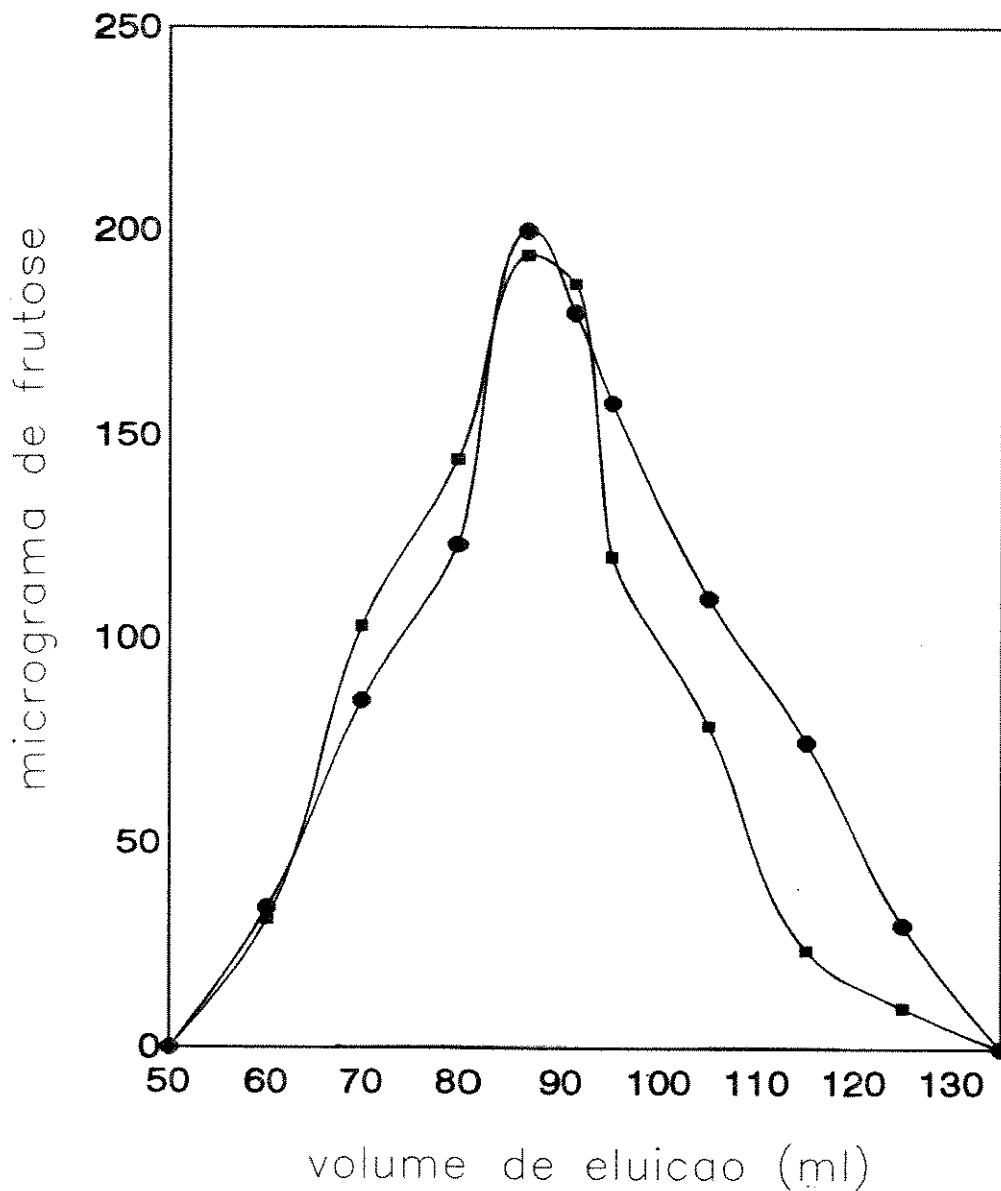


Figura 25 - Cromatografia em coluna de bio-gel P-10 das inulinas de **Vernonia herbacea** ● da marca Sigma ■. O pico máximo de eluição de ambas corresponde ao peso molecular de 5,6 kDa.

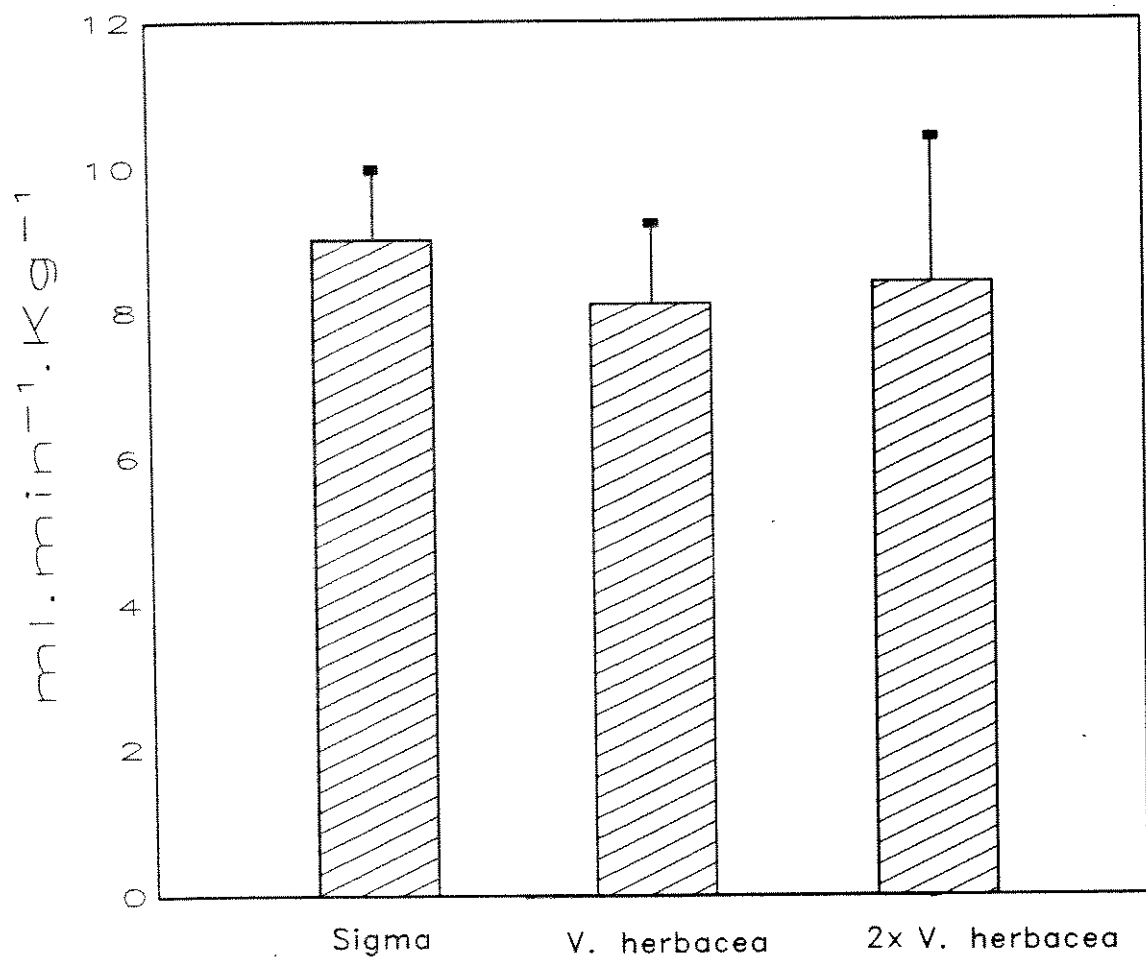


Figura 26 - Rítmo de filtração glomerular dos animais ao longo dos experimentos durante a infusão intra venosa da inulina da marca Sigma ou de **Vernonia herbacea** (concentração normalmente utilizada e concentração duplicada - 2X). O número de amostras utilizadas foi 15 e o erro padrão está representado por barras verticais.

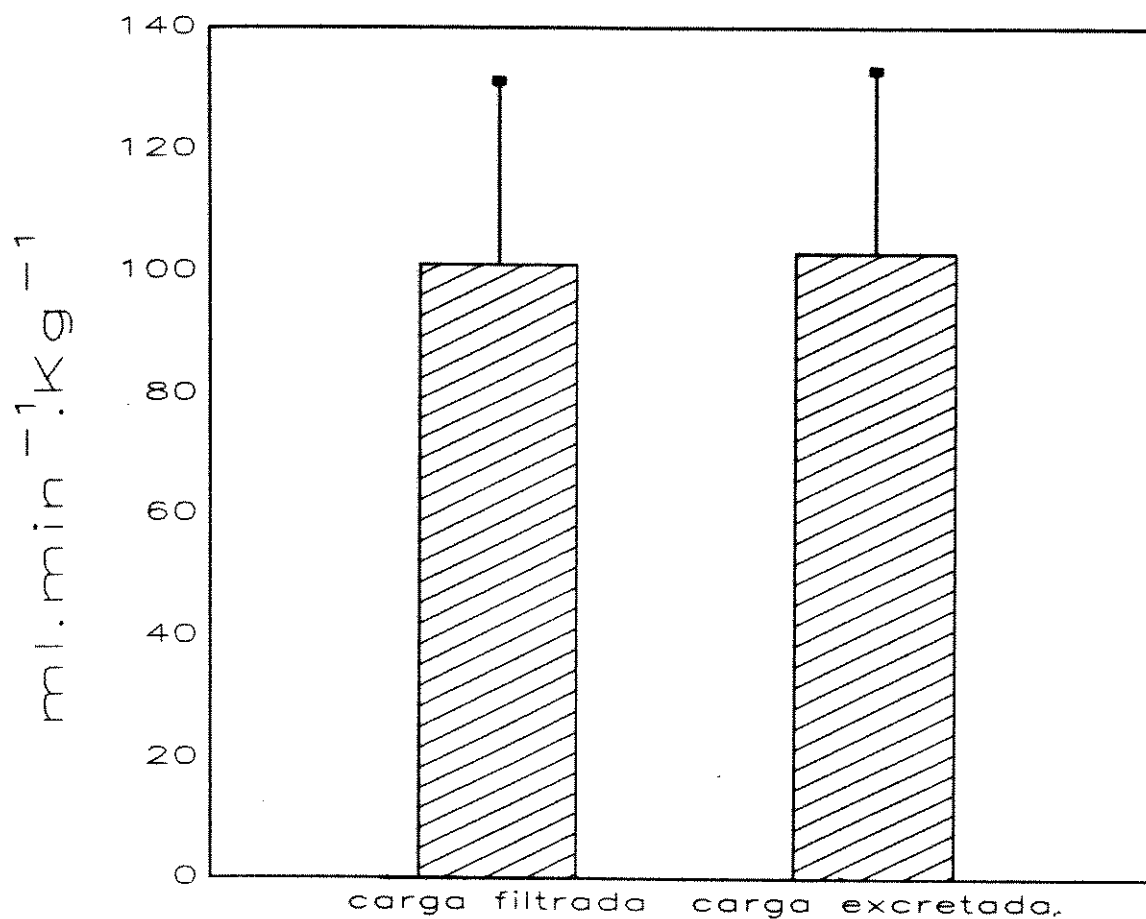


Figura 27 - Carga filtrada e carga excretada dos animais durante a infusão intravenosa da inulina extraída de **Vernonia herbacea**. O número de amostras utilizadas foi 15 e o erro padrão está representado por barras verticais.

# DISCUSSÃO

## 1 - EFEITO DE TEMPERATURA BAIXA NO METABOLISMO DE FRUTANOS DE *V. herbacea*

O conteúdo de polifrutanos nos rizóforos de *V. herbacea* foi consideravelmente maior que o de oligofrutanos, independentemente da origem dos rizóforos (plantas intactas ou fragmentos isolados da parte subterrânea) e das condições térmicas dos experimentos (Figuras 8 a 11). Conseqüentemente, as variações dos conteúdos totais de frutanos acompanharam as variações nos conteúdos de polifrutanos, portanto sempre que forem mencionadas as variações nos polifrutanos, essas podem ser estendidas ao conteúdo total.

Observou-se que em todos os tratamentos ocorreram flutuações nos conteúdos de frutanos, independentemente dos experimentos durarem dias ou semanas.

O conteúdo de frutanos é afetado por manipulações das fontes e drenos dos fotoassimilados presentes nas plantas (Kuhbauch & Thomé, 1989). Pressman *et al.* (1989) verificaram que plantas de aspargo após serem expostas a temperaturas baixas apresentavam senescência da parte aérea associada ao aumento de conteúdo

de frutanos nas raízes. Soja **et al.** (1989) estudando translocação de fotoassimilados em **H. tuberosus** verificaram que a sacarose é a principal forma de transporte para todas as partes da planta, e que esta pode ser translocada diretamente para os tubérculos sem ser armazenada temporariamente no caule; ao chegar nos tubérculos pode ser metabolizada em frutanos.

Como se sabe, a fotossíntese é um processo menos sensível a temperaturas baixas do que os processos de crescimento (Pollock **et al.**, 1983). Acredita-se que durante o tratamento com temperaturas baixas a acumulação de frutanos em raízes e tubérculos de plantas ocorre devido a um excesso de fixação de carbono em relação à sua utilização (Pollock, 1986; Chatterton **et al.**, 1989; Prud'home **et al.**, 1993) e também devido ao fato das enzimas do metabolismo de frutanos permanecerem ativas em temperaturas baixas (Pollock & Lhoyd, 1987; Farrar, 1988; Tognetti **et al.** 1989; Bancal & Triboi, 1993).

Nos experimentos onde utilizou-se plantas intactas de **V. herbacea** em início de dormência, observou-se que, se no início do tratamento de frio (5 °C) estas apresentavam parte aérea, ao final deste o conteúdo de frutanos em seus rizóforos era maior em relação ao das plantas mantidas a 25 °C (Figura 8). No entanto, se tratamento semelhante fosse realizado com plantas sem a parte aérea (dormência), existiam poucas diferenças no conteúdo de frutanos dos rizóforos das plantas mantidas a 5 ou 25 °C (Figura 9). Esse resultado sugere que o acúmulo de frutanos, ocorreu devido ao excesso de fotoassimilados provenientes da parte aérea e que o frio não tem efeito direto neste acúmulo, nessa planta.

Na tentativa de estudar isoladamente o órgão armazenador de frutanos, optou-se por utilizar fragmentos de rizóforos. Após considerar que rizóforos de plantas

submetidas a cinco dias de tratamento de baixa temperatura apresentaram variações pouco expressivas (Figura 9), as análises com fragmentos de rizóforos foram realizadas durante quatro semanas.

Nesses experimentos verificou-se que quando os fragmentos de rizóforos foram retirados de plantas em fase de dormência, ao final do experimento apresentaram um aumento no conteúdo de polifrutanos em relação ao início do tratamento (Figura 10). Os fragmentos retirados de plantas em fase de brotação apresentaram uma diminuição do conteúdo de polifrutanos ao longo do período de tratamento (Figura 11). Verificou-se, também, que esse aumento ou diminuição ocorriam independentemente dos fragmentos serem mantidos a 5 ou 20 °C. Carvalho & Dietrich (1991), ao estudarem plantas intactas de **Vernonia herbacea** em diferentes estádios fenológicos crescidas em seu habitat natural, haviam verificado que em rizóforos de plantas em fase de dormência ocorre aumento no conteúdo de frutanos e nos rizóforos de plantas em fase de brotação ocorre uma diminuição desse polissacarídeo. Esses dados, associados aos resultados do presente trabalho, mostram, portanto, que as variações observadas parecem estar mais relacionadas com o estágio fenológico da planta do que com o tratamento de temperatura.

Quando os resultados obtidos de rizóforos de plantas intactas são comparados aos obtidos de fragmentos de rizóforos, observa-se que os fragmentos apresentam quantidades menores de oligofrutanos; no entanto, estes apresentam maiores quantidades de frutose livre (Figuras 8 a 16 e Tabela 1 a 3). O conteúdo elevado de frutose indica que o metabolismo está sendo alterado; provavelmente está ocorrendo hidrólise de frutanos e mobilização de carboidratos para as gemas existentes nos fragmentos, as quais iniciam o seu desenvolvimento com a quebra da

dormência, causada pela fragmentação.

Segundo Carvalho (1991), a fragmentação dos rizóforos de **V. herbacea** ocasiona a quebra de dormência das gemas ali presentes; isto ocorre independentemente do estágio fenológico em que a planta-mãe se encontra. Entretanto a velocidade de resposta varia de um estágio para outro, sendo mais lentas nas fases vegetativa e de dormência do que nos estágios de brotação e floração.

Esses dados são confirmados no presente estudo, pois fragmentos de rizóforos provenientes de plantas em fase de brotação apresentam conteúdos menores de polifrutanos e maiores de oligofrutanos, em comparação aos provenientes de plantas em fase de dormência (Figuras 10 e 11), indicando que a velocidade de resposta variou de um estágio fenológico para outro e que essa resposta foi mais rápida nos fragmentos retirados de plantas em fase de brotação, independentemente da temperatura.

Através de análises das variações na intensidade das manchas cromatográficas e das áreas sob os picos obtidos por HPLC, observou-se que rizóforos de plantas e fragmentos de rizóforos de **V. herbacea** submetidos a temperaturas baixas em geral apresentaram uma relação maior sacarose:frutose do que os mantidos a 20 ou 25 °C; essa relação observada foi devida a um aumento nos níveis de sacarose nas plantas e nos fragmentos mantidos a 5 °C ( Figuras 12 a 16; Tabelas 1 a 4). Isso pode ser devido ao fato das enzimas envolvidas na síntese de sacarose terem sua atividade aumentada em baixas temperaturas, como tem sido sugerido e demonstrado para outras plantas. Assim, em trigo verificou-se que a atividade de sacarose fosfato sintetase e de sacarose sintetase aumentou em plantas

armazenadas em temperaturas baixas (Calderon & Pontis, 1985; Salerno et al., 1989; Tognetti et al, 1989 , 1990).

Apesar da sacarose ser a precursora da síntese de frutanos, nos experimentos realizados com fragmentos de rizóforos e em rizóforos de plantas de **V. herbacea** sem parte aérea, a quantidade de sacarose formada não foi suficiente para gerar acúmulo de frutanos; isso pode ter ocorrido porque a enzima sacarose sacarose frutossiltransferase (SST), necessária para iniciar a síntese de frutanos, requer uma concentração mais elevada de sacarose para iniciar a síntese de frutanos, conforme ocorre em **H. tuberosus** (Edelman & Jefford, 1964).

Ao analisarmos os níveis de frutose e glicose (Tabelas 1, 2 e 3) observamos que estes são mais altos nas plantas de **V. herbacea** em fase de dormência, mantidas a 20 ou 25 °C em comparação às mantidas a 5°C. Provavelmente nas temperaturas mais altas a atividade hidrolítica tenha sido estimulada. Banca & Triboi (1993), estudando a atividade das frutano exidrolases em trigo, verificaram que estas enzimas têm sua atividade aumentada nas plantas mantidas a 20 °C, quando comparadas com às mantidas em temperaturas mais baixas.

No entanto, em fragmentos de rizóforos de plantas em fase de brotação, os níveis de glicose e frutose são maiores nos tratamentos a 5 °C, em comparação aos tratamentos a 20 °C. Como neste estágio fenológico o metabolismo é mais intenso, embora as hidrólises sejam mais rápidas, é provável que os monossacarídeos liberados nas plantas a 20 °C estejam sendo também rapidamente transformados em sacarose, e utilizados no metabolismo celular.

Ao analisar-se a fração de polifrutanos, o aspecto mais marcante foram as oscilações existentes no grau de polimerização médio e estas ocorreram



independentemente da temperatura utilizada e do tempo de duração do experimento. Entretanto, plantas e fragmentos mantidos a 5 °C apresentaram uma tendência a diminuir o grau de polimerização médio das cadeias de polifrutanos.

Os resultados revelaram que temperatura baixa não altera diretamente o metabolismo dos frutanos; esta parece apenas acelerar ou retardar as alterações metabólicas características de cada estágio fenológico da planta.

## 2 - EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NO METABOLISMO DE FRUTANOS DE *V. herbacea*

O conteúdo relativo de água nos tecidos (CRA) dos rizóforos de plantas de *V. herbacea* submetidas a déficit hídrico declinou mais lentamente que o conteúdo de água no solo (Figura 19). Até 30 dias sem irrigação o CRA se manteve igual ao do início do tratamento (100%), apesar do conteúdo de água no solo haver baixado para 36 %. Isso parece indicar a existência de uma plasticidade da espécie ao déficit hídrico; essa plasticidade, entretanto parece ser limitada pois a capacidade de manter os tecidos túrgidos é perdida após 60 sem água (Figura 19). Resultado semelhante foi encontrado por Thomas (1991) que observou que *Lolium perene* apresenta um declínio significativo do CRA após 45 dias sem irrigação.

De um modo geral, em plantas submetidas a déficit hídrico ocorre queda das folhas maduras e as folhas jovens e botões normalmente secam (Levitt, 1980b); mais

recentemente Spolen & Nelson (1994) verificaram que plantas de **Festuca arundinacea** apresentavam diminuição significativa de crescimento após serem submetidas ao déficit hídrico. Esse padrão de resposta também foi observado em **V. herbacea**. O déficit hídrico afetou o crescimento das plantas pois, quanto maior o intervalo de irrigação, maior foi a redução de crescimento (Figura 20).

A adaptação da planta ao déficit hídrico pode estar relacionada com a acumulação de carboidratos solúveis. Munns & Wein (1981) estudando plantas de trigo observaram que o acúmulo de açúcares solúveis, inclusive frutanos de baixa massa molecular, é importante na resposta adaptativa ao déficit hídrico, pois estes açúcares contribuem efetivamente para o ajuste osmótico. Igualmente Meyer & Boyer (1981) constataram que a sacarose e a frutose contribuem para o ajuste osmótico em hipocótilos de soja submetidos a déficit hídrico.

Thomas (1991) verificou que ocorre aumento de carboidratos solúveis em plantas de **Lolium perene**, durante o déficit hídrico ; no entanto somente o excesso destes carboidratos é convertido em frutanos, pois a concentração de açúcares de baixa massa molecular é mantida na célula em níveis necessários às condições fisiológicas dos tecidos.

Virgona & Barlow (1991) mostraram que a proporção de frutanos entre os demais carboidratos solúveis pode afetar as relações hídricas entre as células, e que os mono e dissacarídeos têm efeito osmótico muito maior que os frutanos em plantas de trigo submetidas a déficit hídrico.

Conforme descrito no presente estudo, até 30 dias sem irrigação as plantas de **V. herbacea** apresentaram tolerância ao déficit hídrico sem alterar o CRA . Associado a este fato as plantas que ficaram 30 dias sem irrigação foram as que

apresentaram em seus rizóforos os maiores valores de oligofrutanos e esses foram acompanhados pelas maiores quantidades de sacarose e frutose livre (Figuras 21 A, 22, 23 e Tabela 6). Provavelmente ocorreram hidrólises que liberaram estes açúcares, os quais contribuíram para o mecanismo de manutenção de turgor dos tecidos dos rizóforos.

Segundo Spollen & Nelson (1994) uma consequência do déficit hídrico é o decréscimo de frutanos associado ao aumento de sacarose e hexoses livres, as quais contribuem mais por unidade de massa do que os frutanos no mecanismo de ajuste osmótico; nestas condições as exidrolases estão ativas e ocorre aumento de degradação

Após 30 dias o conteúdo de polifrutanos foi maior nos rizóforos das plantas de **V. herbacea** que ficaram sem irrigação e o grau de polimerização médio dos mesmos não se alterou. Já as plantas que foram irrigadas a cada 7 ou 15 dias mantiveram os valores de polifrutanos com uma tendência a diminuir o grau de polimerização médio (Figura 21 B e Tabela 7).

O fato dos rizóforos das plantas sem irrigação por 30 dias apresentarem as maiores quantidades de polifrutanos sugere intensificação no metabolismo dos frutanos em consequência da translocação de fotoassimilados da parte aérea (em senescência), para a subterrânea.

Mudanças nas atividades enzimáticas ocorrem devido ao estresse hídrico e frequentemente os níveis das enzimas envolvidas em hidrólises aumentam (Hsiao, 1973). Thomas (1990) observou que o maior impacto do déficit hídrico ocorre na composição dos carboidratos armazenados, pois em folhas de **Lolium perene** o déficit hídrico induziu a despolimerização dos frutanos.

Ao analisar-se o grau de polimerização médio dos polifrutanos em rizóforos de plantas de **V. herbacea** submetidas a déficit hídrico, verificou-se que até 30 dias sem irrigação não ocorre alteração no tamanho médio das cadeias, mas após 60 dias o grau de polimerização médio aumenta. Através das análises por HPLC (Figura 24), verifica-se que após 60 dias diminuem os polifrutanos de cadeias mais curtas. Esses polifrutanos podem estar sob a ação da enzima FFT (frutano-frutosil-transferase) e/ou enzimas hidrolíticas que atuam preferencialmente nos polifrutanos intermediários; com o consumo preferencial dos polifrutanos intermediários o grau de polimerização médio aumenta sem que haja aumento no conteúdo dos mesmos.

É conhecido o fato de que em condições de estresse moderado a respiração decresce e, à medida que este vai se tornando severo a respiração aumenta para níveis acima do controle da planta e finalmente declina em condições extremas de estresse (Hsiao, 1973).

Em **Vernonia herbacea** provavelmente até 30 dias as condições de estresse são moderadas, a respiração é baixa e os frutanos estão sendo armazenados; após esse período o estresse vai se tornando severo e os produtos da hidrólise vão sendo consumidos na respiração que deve ser aumentada. Após 60 dias, a taxa de respiração vai declinando, as condições de estresse são extremas e as plantas acabam morrendo.

Segundo Thomas (1991) os frutanos afetam pouco o potencial osmótico; o ajuste osmótico pode ser devido a mudanças no conteúdo de água pois, com a diminuição de água na célula, o conteúdo celular fica mais concentrado. No entanto ele sugere que o acúmulo de carboidratos solúveis pode ser um mecanismo para armazenar estes compostos sem causar excessiva redução do potencial osmótico.

Muitas plantas mantêm o turgor de seus tecidos através do ajuste osmótico (Thomas & Evans, 1990). Um decréscimo no potencial da água na célula durante o déficit hídrico pode ser consequência do ajuste osmótico; o aumento de acúmulo ou síntese de solutos pode contribuir para o abaixamento do potencial osmótico da célula e permitir que a mesma mantenha-se túrgida ( Nelson & Spolen, 1994).

Os resultados obtidos nesse trabalho revelaram que em **Vernonia herbacea**, os frutanos podem estar associados ao mecanismo de manutenção de turgor dos tecidos dos rizóforos. Esta associação pode ocorrer quando o excesso de fotoassimilados é metabolizado em frutanos, evitando deste modo que a concentração de açúcares fique muito alta (além dos limites fisiológicos) e consequentemente permitindo que o balanço hídrico entre as células seja mantido. Este balanço também pode ser mantido quando oligo e polifrutanos são degradados, gerando pequenas moléculas capazes de contribuir para o abaixamento do potencial osmótico da célula e consequentemente manter as células túrgidas e vivas.

### 3 - IMPORTÂNCIA DO METABOLISMO DOS FRUTANOS EM **Vernonia herbacea**

O papel dos frutanos como carboidratos de reserva é indiscutível (Pollock, 1986; Carvalho & Dietrich, 1993; Figueiredo-Ribeiro, 1993). A sua ocorrência em

plantas consideradas evoluídas sugere a existência de um significado evolutivo para seu aparecimento. No entanto, as pressões seletivas que favoreceram o surgimento dos genes envolvidos na síntese de frutanos ainda são desconhecidas (Hendry & Wallace, 1993).

Eagles (1967) já havia observado que muitas plantas que suportavam períodos de seca ou frio durante seu ciclo de vida armazenavam frutanos. Estudos posteriores sugeriram que os frutanos poderiam atuar como crioprotetores em plantas submetidas a temperaturas baixas (Pontis & Del Campillo, 1985; Hendry, 1987). Recentemente tem sido sugerido que os frutanos estão relacionados com os processos de manutenção de turgor celular em plantas submetidas a deficiência de água (Hendry, 1993; Hendry & Wallace, 1993; Hendry, 1995). Segundo Pontis (1990), o papel dos frutanos como carboidratos de reserva estaria relacionado com as estratégias de adaptação em plantas submetidas a temperaturas baixas ou déficit hídrico.

A maioria dos estudos sobre a importância dos frutanos tem sido realizada com plantas nativas ou adaptadas a regiões de clima temperado; pouco se conhece sobre o efeito dos frutanos no metabolismo de espécies tropicais.

No presente trabalho escolheu-se **Vernonia herbacea** por ser uma espécie de clima tropical que armazena frutanos em seus órgãos subterrâneos e durante seu ciclo de vida passa por períodos de seca, acompanhados de temperaturas baixas. Portanto, esta planta é um bom modelo para se verificar as correlações existentes entre este carboidrato de reserva e déficits hídricos e/ou baixas temperaturas em ambiente sub-tropical.

Plantas de **Vernonia herbacea** apresentam variações sazonais nos níveis e

na composição dos frutanos armazenados nos rizóforos. O metabolismo dos frutanos nesta espécie parece não estar envolvido com os mecanismos crioprotetores, pois os tratamentos com temperatura baixa somente aceleram ou retardam as variações fenológicas e sazonais anteriormente observadas no metabolismo dos frutanos (Carvalho & Dietrich, 1993).

O ajuste osmótico durante o déficit hídrico é um mecanismo pelo qual muitas plantas mantêm o turgor de seus tecidos (Morgan, 1984; Thomas & Evans, 1990). Os resultados obtidos com **V. herbacea** indicam que os rizóforos submetidos a déficit hídrico, por 30 dias, conseguem manter os seus tecidos 100 % túrgidos. Essa manutenção de turgor parece estar relacionada com as variações observadas nos frutanos, pois durante este período ocorreu aumento de metabolitos que contribuem para o ajuste osmótico na célula, como frutose e glicose livres, sacarose e oligofrutanos de baixa massa molecular.

Em **V. herbacea** os frutanos chegam a representar até 80 % de massa seca dos rizóforos. Dessa maneira, tanto nos tratamentos de temperatura baixa, como nos de déficit hídrico, pequenas variações que possam ser importantes no processo de osmoregulação provavelmente não foram detectadas pelos métodos convencionais. Além disso, as variações existentes entre as amostras é geralmente grande em plantas selvagens, podendo mascarar variações significativas para a espécie. Esse fato já era conhecido antes de iniciar este estudo; no entanto, ao utilizarem-se variáveis ambientais drásticas, especialmente déficit hídrico, esperava-se que as alterações no metabolismo de frutanos fossem muito superiores àquelas entre as amostras, o que em alguns casos, efetivamente não ocorreu.

Nos experimentos de déficit hídrico, limitar as regiões de dessecação, assim

como foi realizado nos tratamentos de temperatura baixa nos quais foram utilizados fragmentos de rizóforos, poderá em experimentos futuros, ajudar a elucidar o papel osmoregulador dos frutanos. Experimentos com fragmentos de rizóforo possibilitariam não só a utilização de um número maior de amostras, bem como de condições mais controladas como, por exemplo, temperatura constante durante o dessecamento. Necessitariam, porém, de uma uniformização de fragmentos, o que está demandaria um grande número de plantas em condições semelhantes de crescimento.

Apesar das limitações acima assinaladas, os estudos com **Vernonia herbacea** revelaram que os frutanos presentes nos rizóforos, além de constituírem carboidratos de reserva, estão envolvidos nos mecanismos de manutenção de turgor; o envolvimento direto em mecanismos de crioproteção não foi observado. Esses resultados corroboram a hipótese de Hendry (1995), a qual propõe que a biossíntese de frutanos tenha sido favorecida pelo desenvolvimento da sazonalidade ambiental, especialmente pelos períodos de seca.

Esta teoria se aplica a **V. herbacea** e a outras espécies acumuladoras de frutanos presentes no cerrado brasileiro, pois neste bioma estas passam por pelo menos um período de seca drástico durante seu ciclo de vida. No entanto, como explicar a ocorrência de frutanos entre plantas de regiões de clima temperado? Segundo Ting (1982), temperaturas abaixo de zero graus Celcius muitas vezes provocam a formação de cristais de gelo dentro dos espaços intracelulares, através da utilização da água proveniente das células e, conseqüentemente, gerando um dessecamento celular. O processo de absorção de água através do sistema solo-planta também diminui em condições de baixas temperaturas (Levitt, 1980a).



Portanto, os frutanos poderiam ter papel semelhante tanto nas plantas submetidas a baixas temperaturas como naquelas submetidas a déficit hídrico, pois em ambos os casos a diminuição da disponibilidade de água nos tecidos faz com que ocorram mudanças metabólicas que favorecem a manutenção do turgor nas células e tecidos.

## 4 - INULINA DE *V. herbacea* NA FUNÇÃO RENAL

Devido à ocorrência de amplas variações nas massas moleculares dos frutanos, mesmo dentro de uma família, foi realizada uma análise qualitativa das inulinas de *Vernonia herbacea* e de *Dahlia* sp, importada e distribuída no Brasil pela Sigma. Como está indicado na figura 25 ambas inulinas apresentaram padrão de distribuição de massas moleculares semelhante, com a mesma massa molecular média, o que constituiu a primeira sugestão de que a inulina de *V. herbacea* também poderia ser utilizada nas determinações de medidas de clearance.

A verificação de que a pressão arterial dos ratos não varia ao longo do experimento com a contínua infusão de qualquer uma das duas inulinas sugere que a proveniente de *V. herbacea*, assim como a comercial, não apresenta efeitos sistêmicos colaterais. Isto se deve à propriedade da inulina ser uma substância inerte fisiologicamente (Smith, 1951; Brenner *et al.*, 1986; Levey *et al.*, 1991), não sendo metabolizada no organismo e, em consequência de sua massa molecular, não penetrar nas células, distribuindo-se apenas no fluido extracelular. Cumpre

salientar que esse polissacarídeo é utilizado em fisiologia animal como um marcador de volume extracelular (Aires, 1991).

A carga filtrada e a carga excretada da inulina de **V. herbacea** foram iguais (Figura 27), indicando que esta substância pode ser usada para medir adequadamente a filtração glomerular, por não sofrer influência da função tubular. Caso esta fosse reabsorvida pelo epitélio tubular renal, sua carga filtrada deveria ser maior que a excretada. Se houvesse secreção tubular, o oposto deveria acontecer. Assim, a inulina de **Vernonia herbacea**, não sofrendo transporte tubular, pode ser utilizada em experimentos de microperfusão tubular renal, como marcadora da reabsorção tubular de água: quanto mais concentrada estiver no túbulo, maior será a reabsorção de água.

A igualdade das cargas filtrada e excretada demonstra, pois, que todo o plasma filtrado fica depurado da substância e essa depuração plasmática é que corresponde à filtração glomerular do indivíduo (Aires, 1991; Levey et al., 1991). Tal afirmação é comprovada nos experimentos em que foi dobrada a concentração plasmática de inulina pois, nessa situação, a filtração glomerular se manteve constante, ocorrendo concomitante e igual aumento das cargas filtrada e excretada.

O ritmo de filtração glomerular foi o mesmo para as duas inulinas estudadas, indicando que ambas são igualmente filtradas e que a comercial poderia ser substituída pela extraída de **V. herbacea** em pesquisas de fisiologia renal e, eventualmente, em pacientes nefropatas.

Entretanto o processo de extração e o grau de pureza da inulina de **V. herbacea** devem ser examinados em mais detalhe antes que seu uso em humanos possa ser preconizado.

# CONCLUSÕES

- As condições de temperatura e disponibilidade de água no ambiente influenciam o metabolismo dos frutanos em plantas de **Vernonia herbacea**.

- As variações do metabolismo dos frutanos durante os diferentes estádios fenológicos são aceleradas ou retardadas nas plantas de **V. herbacea** submetidas a temperatura baixa, não havendo uma mudança no direcionamento desse metabolismo em função da temperatura baixa.

- Os frutanos de **Vernonia herbacea**, através de alterações nos tamanhos de suas moléculas, estão relacionados com a manutenção de turgor das células, podendo ser associados aos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.

- A inulina extraída de rizóforos de **V. herbacea** pode ser utilizada em substituição à inulina comercial da marca Sigma, nas medidas do ritmo de filtração glomerular e em experimentos de microperfusão tubular renal, como marcadora da reabsorção tubular de água.

# RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram verificar o efeito de temperatura baixa e do déficit hídrico no conteúdo e na composição dos frutanos presentes em rizóforos de **Vernonia herbacea**, e determinar se a inulina isolada e purificada de **V. herbacea** pode ser usada para avaliar o ritmo de filtração glomerular em substituição à inulina importada.

Plantas intactas em início de dormência, que apresentavam parte aérea, ao final do tratamento de frio (5 °C) apresentaram conteúdo de frutanos maior que o das plantas mantidas a 25 °C. Tratamento semelhante com plantas sem a parte aérea (dormência), apresentaram poucas diferenças no conteúdo de frutanos dos rizóforos das plantas mantidas a 5 ou 25 °C. Esse resultado sugere que o acúmulo de frutanos ocorreu devido ao excesso de fotoassimilados provenientes da parte aérea e que o frio não tem efeito direto neste acúmulo.

Fragmentos de rizóforos retirados de plantas em fase de dormência, apresentaram ao final do experimento um aumento no conteúdo de polifrutanos em relação ao início do tratamento. No entanto, fragmentos retirados de plantas em fase de brotação apresentaram uma diminuição do conteúdo de polifrutanos ao longo do período de tratamento. Esse aumento ou diminuição ocorreram independentemente da temperatura, mostrando que as variações observadas parecem estar mais relacionadas com o estágio fenológico da planta do que com o

tratamento de temperatura.

O conteúdo relativo de água nos tecidos (CRA) dos rizóforos de plantas submetidas a déficit hídrico declinou mais lentamente que o conteúdo de água no solo. Até 30 dias sem irrigação o CRA se manteve igual ao do início do tratamento (100%), apesar do conteúdo de água no solo haver baixado para 36 %. Essas plantas foram as que apresentaram em seus rizóforos os maiores valores de oligofrutos acompanhados pelas maiores quantidades de sacarose e frutose livre.

Concluiu-se que em **V. herbacea** os frutanos estão associados ao mecanismo de manutenção de turgor dos tecidos dos rizóforos, através de alterações nos tamanhos de suas moléculas.

Nos experimentos sobre o uso da inulina de **V. herbacea** na função renal verificou-se que a carga filtrada e a carga excretada da inulina foram iguais, e que o ritmo de filtração glomerular foi o mesmo da inulina comercial, indicando que esta substância pode ser usada para medir adequadamente a filtração glomerular.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M.M. 1991. Fisiologia renal. In: AIRES, M.M., ed. Fisiologia. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 495-583.
- ALBERDI, M.. & CORCUERA, L. 1991. Cold acclimation in plants. *Phytochem.* 30(10) 3177-84.
- ANDREWS, P. 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96:595.
- ASPINALL, G.O. & DAS GUPTA, P.C. 1959. The trisaccharide fraction of some monocotyledons. *Biochem. Soc.* 73:507-14
- BANCAL, P. & TRIBOI, E. 1993. Temperature effect on fructan oligomer contents and fructan related enzyme activities in stem of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain filling. *New Phytol.* 123:247-53.
- BLACKLOW, W.M.; DARBYSHIRE, B. & PHELOUNG, P. 1984. Fructans polymerised in the internodes of winter wheat as grain-filling progressed. *Plant Sci. Let.* 36:213-8.
- BRENNER, B.M.; DWORKIN, L.D. & ICHIKAWA, I. 1986. Glomerular ultrafiltration. In: The Kidney (Brenner, M.D.; Floyd, C. & Rector, M.D.; eds.) WB Sanden Company, USA p. 124-44.
- CAIRNS, A. J. & POLLOCK, C.J. 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. I. Chromatographic characterization of oligofructans and their labelling patterns following  $^{14}\text{CO}_2$  feeding. *New Phytol.* 109:399-405.

- CALDERON, P.L. & PONTIS, H.G. 1985. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. *Plant Sci.* 42:173-6.
- CAMARGO, A.P. 1971. Clima do cerrado. In: FERRI, M.G.,ED. Simpósio sobre o cerrado. Blucher & Edusp, São Paulo p.75-95.
- CARVALHO, M.A.M. 1991. Variações no conteúdo e composição de frutanos em rizóforos de **Vernonia herbacea** (Vell) Rusby. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 111p.
- CARVALHO, M.A.M. & DIETRICH, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of **Vernonia herbacea**(Vell) Rusby at different phenological phases. *New Phytol.* 123:735-40.
- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H. & ASAY,K.H. 1989. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134: 169-79.
- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; THOMLEY, W.R. & BENNETT, J.H. 1990. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. *Plant Physiol. Biochem.* 28(2):167-72.
- CHURMS, S.C. 1970. Gel chromatography of carbohydrates. *Adv. Carbohy. Chem. Biochem.* 25:13-51.
- COUTINHO, L.M. 1990. O cerrado e a ecologia do fogo. *Ciência Hoje* 12(68): 22-30.
- DARBYSHIRE, B. & HENRY, R.J. 1978. The distribution of fructan in onions. *New Phytol.* 81:29-34.
- DE VUONO, Y.S., BATISTA, E. A. & FUNARI, F. L. 1986. Balanço hídrico na área da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo - Brasil. *Hoehnea* 13: 73-85.
- EAGLES, C.F. 1967. Variation in the soluble carbohydrate content of climate races of

- Dactylis glomerata** (cocksfoot) at different temperatures. *Ann. Bot.* 31:350-6.
- EDELMAN, J. & JEFFORD, T.G. 1964. The metabolism of fructose polymers in plants. 4 B-fructofuranosidases of tubers of **Helianthus tuberosus** L. *Biochem. J.* 93:148-61.
- EDELMAN, J. & JEFFORD, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in **Helianthus tuberosus**. *New Phytol.* 67:517-31.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, C.J. 1990. Molecular and Kinetic Properties of **Aspergillus ficuum** inulinases. *Agric. Biol. Chem.* 54:61-8.
- FARRAR, J.F. 1988 . Temperature and the partitioning and translocation of carbon. In: LONG, S.P. & WOODWARD, F.I., eds. Plants and Temperature- XXXII Symposia of the Society for Experimental Biology. Great Britain Society for Experimental Biology. p. 203-36.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1993. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 52(2):203-8.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J. & GRAZIANO, T.T. 1986. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revta brasil. Bot.* 9:159-66.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ISEJIMA, E.M.; DIAS-TAGLIACOZZO, G.M.; CARVALHO, M.A.M. & DIETRICH, S.M.C.; 1991. The physiological significance of fructan accumulation in Asteraceae from cerrado. *Ciência e Cultura* 43(6):443-6.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; ISEJIMA, E.M.; DIAS-TAGLIACOZZO, G.M. & TERTULIANO, M. F. 1992. As múltiplas utilidades dos frutanos. *Ciência Hoje.* 14:16-18.
- FITTER, A.H. & HAY, R.K. 1981. Water and Temperature In: ----- & ----., eds.



Environmental Physiology of Plants. Academic Press, London p.118-99.

FRENCH, A.D. (1989) Chemical and physical properties of fructans J. Plant Physiol. 134:125-36.

FREHNER, M., KELLER, F. & WIENKEN, A. 1984. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (**Helianthus tuberosus** L.). J. Plant Physiol. 116:197-208.

GROSS, D., BLANCHARD, P.H. & BELL, D.J. 1954. Neokestose, a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. J. Chem. Soc. 1727-30.

HELLEBUST, J.A. 1976. Osmoregulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:485-505.

HENDRY, G.A.F. 1987. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. New Phytol. 106:201-16.

HENDRY, G.A.F. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. New Phytol. 123:3-14.

HENDRY, G.A.F. 1995. Fructan and ecology and evolution of the Compositae. In: JEFFREY, ed. The Compositae Royal Botanic Gardens, Kew (in press).

HENDRY, G.A.F. & WALLACE, R.K. 1993. The origin distribution and evolutionary significance of fructans. In : SUZUKI, M. & CHATTERTON, J.N., eds. Science and Technology of Fructan. Boca Raton, CRC Press p.

HENRY R.J. & DABYSHIRE, B. 1980. Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from **Allium cepa** Phytochem. 19:1017-20.

HSIAO, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant Physiol. 24:519-70.

HSIAO, T.C.; ACEVEDO, E.; FERERES, E. & HENDERSON, D.W. 1976. Stress metabolism - water, growth and osmotic adjustment. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 273:479-500.

JEFFORD, T.G. & EDELMANN, J. 1963 The metabolism of fructose polymers in plants.

II Effect of temperature carbohydrate changes and morphology of stored tubers of **Helianthus tuberosus** L. J. Exp. Bot. 14:56-62.

JERMYN, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. Nature 177:38-9.

JOHNSON, R.C.; NIGUYEN, H.T. & CROY, L.I. 1984. Osmotic adjustment and solute accumulation in two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop. Sci. 24:957-60.

JORGENSEN, K.E.; Moller, J.V. & Sheikh, M.I. 1972. The glomerular filterability of inulin and of different molecular weight preparations of polyethylene glycol in the rabbit. Acta Physiol. Scand. 84:408-14.

KANAYA, K.I., CHIBA, S. & SHIMOMURA, T. 1978. Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. Agr. Biol. Chem. 42:1947-8.

KANDLER, O. & HOPF, H. 1980. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In The Biochemistry of Plants. vol.3: Carbohydrates:Structure and Function (J. Press, ed.) Academic Press, New York, p.221-70.

KOSARIC, N. COSENTINO, G.P. & WIECZOREK, A. 1984. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. Biomass 5: 1-36.

KUHBAUCH, W. & THOME, U. 1989. Nonstructural carbohydrates of wheat stems as influenced by sink-source manipulations. J. Plant Physiol. 134:243-250.

LACERDA, A.M.F. 1987. Investigaç o da inulinase de fonte microbiol gica. Dissertaç o de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 110p.

LEVEY, A.S.; MADAIO, M.P. & PERRONE, R.D. 1991. Laboratory Assessment of Renal Disease: Clearance, Urinalysis and Renal Biopsy. In: The Kidney (Brenner, M.D.; Floyd, C. & Rector, M.D.; eds.) WB Sanden Company, USA p. 919-68.

- LEVIT, J. 1980 a. II Chilling Temperature, III Freezing Temperatures In: -----, ed Responses of Plants to Environmental Stresses. vol II. Academic Press, London p.23-230.
- LEVIT, J. 1980b. I Stress concepts, II Water stress In: -----, ed Responses of Plants to Environmental Stresses. vol II. Academic Press, London p. 3-210.
- MANTOVANI, W. & MARTINS, F.R. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. *Revta brasil. Bot.* 11:101-12.
- MARGARATIS, A. & BAJPAI, P. 1982. Ethanol production from jerusalem artichoke tubers (***Helianthus tuberosus***) using ***Kluyveromyces marxianus*** and ***Saccharomyces rosei***. *Biotech. Bioeng.* 24: 941-53.
- MEDCALF, D.G. & CHEUNG, P.W. 1971. Composition and structure of glucofructans from durum wheat flour. *Cereal. Chem.* 48:1-8.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, vol. 13 A. *Plant Carbohydrates I*. (F.A. Loewus & W. Tanner, eds.). Springer-Verlag., p.418-71.
- MEYER, R.F. & BOYER, J. S. 1981. Osmoregulation, solute distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. *Planta* 151: 482-9.
- MORGAN, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:299-319.
- MUNNS, R. 1988. Why measure osmotic adjustment?. *Aust. J. Plant Physiol.* 15:717- 26.
- MUNNS, R. & WEIN, R. 1981. Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 93-105.

- MURAMATSU, M.; KANUAMA, S.; MIWA, T. & NAKAKUKU, T. 1988. Structures of some fructo-oligosaccharides produced from sucrose by mycelia of **Aspergillus sydowi** IAM 2544. *Agric. Biol. Chem.* 52(5):1303-4.
- PIMENTEL, M.G.; CRISTOFIDIS, D.S. & PEREIRA, F.J.S. 1977. Recursos hídricos no cerrado. In: FERRI, M.G., ed. Simpósio sobre o cerrado: utilização agropecuária. Edusp & Itatiaia, São Paulo p.121-54.
- POLLOCK, C.; LLOYD, E.J.; STODDART, J.L. & THOMAS, H. 1983. Growth photosynthesis and assimilate partitioning in **Lolium temulentum** exposed to chilling temperatures. *Physiol. Plant.* 59:257-62.
- POLLOCK, C.J. 1984. Physiology and metabolism of sucrosyl-fructans. In: LEWIS, D.H., ed. Storage carbohydrates in vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge. p. 97-113
- POLLOCK, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol.* 104:1-24.
- POLLOCK, C. J. 1990. The response of plants to temperature change. *J. Agric. Scien.* 115:1-5
- POLLOCK, C.J. & JONES, T. 1979. Seasonal patterns of fructan and metabolism in forage grasses. *New Phytol.* 83:8-15.
- POLLOCK, C.J. & PREISS, J. 1980. The citrate-stimulated starch synthase of starch maize kernels: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 204:578-88.
- POLLOCK, C.J. & LLOYD, E. J. 1987. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. *Ann. Bot.* 60: 231-5.
- POLLOCK, C.J. & CHATTERTON, N.J. 1988. Fructans. In : J. Preiss, ed. The Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise vol.14. Carbohydrates: Structure and Function.

Academic Preiss, New York, p.109-140.

POLOCK,C.J.; CAIRNS, A.J.; COLLIS,B.E. & WALKER, R.P. 1989. Direct effects of low temperature upon components of fructan metabolism in leaves of **Lolium temulentum** L. J. Plant Physiol. 134:203-208.

PONTIS, H.G. & DEL CAMPILLO,E. 1985. Fructans. In: DEY, P.M. & DIXON, R. ,EDS. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. Academic Press, London. p.205-227.

PRESSMAN, E.; SCHAFFER, A.A.; COMPTON,D. & ZAMSKI, E. 1989. The effect of low temperature and drought on the carbohydrate content of asparagus. J. Plant Physiol. 134:209-13.

PRU'HOME, M.P.; CASTAL, F.; BELANGER, G. &BOUCAUD, J. 1993. Temperature effects on partitioning of <sup>14</sup>C assimilates in tall fescue (**Festuca arundinacea** Schreb). New Phytol 123:255-61.

RACHID, M. 1947. Transpiração e sistemas subterrâneos da vegetação de verão nos campos derrados de Emas. Bolm. Fac. Fil. Ciênc. Univ. S. Paulo 80(Botânica) 5:5-140.

REIS, A.C.S. 1971. Climatologia sobre o cerrado. In: FERRI, M.G., ed. Simpósio sobre o cerrado; utilização agropecuária. Edusp & Itatiaia, São Paulo p.15-25.

SALERNO, G.L.; IANIRO,J.L.; TOGNETTI,J.A., CRESPI, M.D. & PONTIS, H.G. 1989. Differential induction of sucrosemetabolizing enzymes in wheat (**Triticum aestivum** cv. San Agustin) leaf sections. J. Plant Physiol. 134:214-17.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1992. Four- Environmental Physiology. In: -----&-----, eds. Plant Physiology .Wadsworth Publishing Company Belmont, California p. 551-615.

SCOTT, R.W. 1968 Transfructosylation in higher plants containing fructose polymers. Ph

D thesis, University of London, 244p.

- SHIOMI, N. 1981. Two novel hexasaccharides from the roots of **Asparagus officinalis**. *Phytochemistry* 20:2581-3.
- SHIOMI, N. & IZAWA, M. 1980. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of asparagus (**Asparagus officinalis** L.). *Agric. Biol. Chem.* 44:603-14.
- SHIOMI, N. ; ONODERA, S.; CHATTERTON, N.J. & HARRISON, P.A. 1991. Separation of fructo-oligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 55(5):1427-8.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J. & IZAWA, M. 1979. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by asparagus fructosyltransferases. *Agric. Biol. Chem.* 43:2233-44.
- SIMPSON, R.J.; WALKER, R.P. & POLLOCK, C.J. 1991. Fructan exohydrolase activity in leaves of **Lolium temulentum** L. *New Phytol.* 119:499-507.
- SMITH, H.W. 1951. Measurement of the filtration rate. In *The kidney, structure and function in health and disease*. (Smith, H.W.,ed) Oxford University Press, New York. p. 39-62.
- SOJA, G.; HAUNOLD, E.; PRAZNICK, W. 1989. Translocation of <sup>14</sup>C-assimilates in jerusalem artichoke (**Helianthus tuberosus** L.). *J. Plant Physiol.* 134:218-23.
- SPOLEEN, W.G. & NELSON, C.J. 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant. Physiol.* 106:329-36.
- TERTULIANO, M.F. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytol.* 123:741-9.
- TING, I. 1982. IV Water relations. In: -----,ed. Plant Physiology. Addison-Wesley Publishing Company, Philippines p.81-100.
- TOGNETTI, J.A.; CALDERON, P.L. & PONTIS, H.G. 1989. Fructan metabolism reserval of

- cold acclimation. *J. Plant Physiol.* 134:232-36.
- TOGNETTI, J.A. ; SALERNO, G.L.; CRESPI, M.D. & PONTIS, H.G. 1990. Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiol. Plant.* 78:554-59.
- THOMAS, H. 1990. Osmotic adjustment in ***Lolium perene***; its heritability and the nature of solute accumulation. *Ann. Bot.* 66:521-30.
- THOMAS, H. 1991. Accumulation and consumption of solutes in swards of ***Lolium perene*** during drought and after rewatering. *New Phytol.* 118:35-48.
- THOMAS, H. & EVANS C. 1989. Effects of divergent selection for osmotic adjustment on water relations and growth of plants of ***Lolium perene***. *Ann. Bot.* 64:581-7.
- THOMAS, H. & EVANS C. 1990. Influence of drought and flowering on growth and water relations of perennial ryegrass populations. 116:371-82.
- VANDAME, E.J. & DERYCKE, D.G. 1983. Microbial fermentation process, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 29:139-75.
- VIRGONA, J.M. & BARLOW, E.W.R. 1991. Drought stress induce change in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:239-47.
- WAGNER, W. & WIEMKEN, A. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (***Hordeum vulgare*** L. cv. Gerbel). *J. Plant Physiol.* 123:429-39.
- WAGNER, W.; Keller, F. & WIEMKEN, A. 1983. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z. Pflanzenphysiol.* 112:359-372.
- WIEMKEN, A.; FREHNER, M.; KELLER, F. & WAGNER, W. 1986. Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. *Curr. Top. Plant Biochem. hysiol.* 5:17-37.

WISE, C.S.; DIMLER, R.J.; DAVIS, H.A. & RIST, C.E. 1955. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparation. *Analyt. Chem.* 27:33-6.