

Marco Aurélio Silva Tiné



**Mobilização de xiloglucano de reserva
em sementes de *Hymenaea courbaril* L.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Marco Aurélio
Silva Tiné
e aprovada pela Comissão Julgadora.

12/09/97


Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas como
requisito para a obtenção do
título de Mestre em ciências
Biológicas na área de Biologia
Celular.

Campinas
1997

Marco Aurélio Silva Tiné

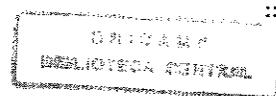
**Mobilização de xiloglucano de reserva
em sementes de *Hymenaea courbaril* L.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas como
requisito para a obtenção do
título de Mestre em ciências
Biológicas na área de Biologia
Celular.

Orientadores

Marcos Silveira Buckeridge
Angelo Luiz Cortelazzo

Campinas
1997



9813539

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T493m
V.	5
T. IMPROB.	34.259
PROC.	395/98
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$. 11,00
DATA	16/06/98
N.º CPD	

FICHA CATALOGÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00112425-9

T493m

Tiné, Marco Aurélio Silva
Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes
de *Hymenaea courbaril* L. / Marco Aurélio Silva Tiné.
Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Polissacarídeos. 2. Semente. 3. Hymenaea.
I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

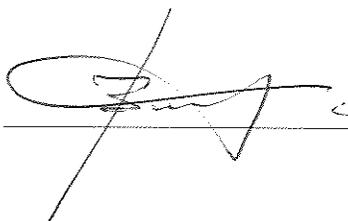
LOCAL E DATA:

Campinas, 12 de setembro de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Dr. MARCOS SILVEIRA BUCKERIDGE
(Orientador)



Dra. SONIA M. CAMPOS DIETRICH



Dra. CANDIDA CONCEIÇÃO J. VIEIRA



SUPLENTE:

Profª. Dr. TELMA REGINA GABRIEL SILVA

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

aos meus orientadores Marcos Buckeridge e Angelo Cortelazzo;

aos professores do departamento de Biologia Celular e Pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica;

aos colegas do grupo de parede, pela orientação técnica, ajuda na realização dos experimentos e (principalmente) pela amizade;

aos velhos companheiros de graduação, que embarcaram comigo na pós-graduação;

aos companheiros de laboratório e equipe técnica da seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica e do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP;

à minha família, por todo o apoio dado durante a realização deste trabalho (e pelo apoio anterior, também);

a todos os demais que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho;

ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

Introdução	1
Sementes	1
Carboidratos de reserva	2
Parede celular primária	2
Celulose	3
Hemiceluloses	4
Pectina	6
Proteínas	7
Estruturais	7
Enzimas	8
Parede de reserva	12
Xiloglucano de reserva	13
Justificativa	17
Objetivo	20
Material e métodos	21
Padronização do material e procedimento	21
Microscopia fotônica e eletrônica de varredura	22
Fixação e processamento	22
Coloração com Xylidine Ponceau (XP)	23
Coloração com Azul de Toluidina (AT)	24
Microscopia de polarização	25
Impregnação com Iodo/Iodeto de potássio	25
Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.)	25
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
Extração e análise de carboidratos	26
Padronização das extração dos carboidratos	26

Extração dos carboidratos	27
Dosagem de açúcar total	28
Dosagem de açúcar redutor	28
Análise por cromatografia em camada delgada	29
Análises por HPAEC	30
Preparo dos extratos enzimáticos	31
Preparação de xiloglucano e obtenção de oligossacarídeos	31
Determinação da atividade de β -glucosidase	32
Determinação da atividade de α -xilosidase	33
Determinação da atividade de endo- β -glucanase	35
Determinação da atividade de β -galactosidase	38
Dosagem de proteína	39
Análise do polissacarídeo	39
Hidrólise ácida	39
Obtenção dos oligossacarídeos	40
Resultados	41
Acompanhamento de partição de matéria	41
Microscopia	41
Xylidine Ponceau	41
Azul de Toluidina	44
Ácido periódico - Schiff (P.A.S.)	44
Impregnação com Iodo/Iodeto de potássio	47
Microscopia Eletrônica de Varredura	47
Microscopia de polarização	48
Extração e análise de carboidratos de baixo peso molecular	52
Extração de carboidratos	52
Cromatografia em camada delgada	54
Análise por cromatografia líquida de alta performance	54
Dosagem das atividades enzimáticas	56

Análise do polissacarídeo _____	61
Hidrólise ácida _____	61
Análise dos oligossacarídeos _____	61
Discussão _____	64
Compostos de reserva em sementes de <i>H. courbaril</i> _____	64
Mobilização do xiloglucano de reserva _____	68
Mecanismo de degradação _____	68
A origem do sistema de degradação: transferência de funções? _____	72
Transporte dos carboidratos durante a degradação do xiloglucano _____	73
Bibliografia _____	77

Índice de figuras

Núm.	Figura	Pág.
1	Representação esquemática de uma molécula de xiloglucano.....	5
2	Representação esquemática de possíveis ações da XET.....	9
3	Modelo de crescimento de parede celular.....	11
4	Modelo de degradação do xiloglucano de reserva.....	15
5	Oligossacarídeos obtidos pela digestão de xiloglucano.....	16
6	Separação temporal do “turn-over” da parede durante o crescimento.....	18
7	Concentração de polissacarídeos solúveis em água no sobrenadante.....	27
8	Atividade de β -glucosidase em função do pH.....	33
9	Atividade de α -xilosidase em função do pH.....	34
10	Atividade de XET em função da concentração inicial de oligossacarídeos.....	37
11	Atividade de XET em função do pH.....	38
12	Atividade de β -galactosidase em função do pH.....	39
13	Acompanhamento das massas de matéria fresca e seca.....	42
14	Cortes de cotilédones corados pelo XP.....	42
15	Cortes de cotilédones corados pelo AT.....	44
16	Cortes de cotilédones corados por PAS.....	45
17	Cortes de cotilédones impregnados por I_2/KI	48
18	Microscopia eletrônica de varredura dos cotilédones.....	49
19	Seqüência proposta para a formação das protuberâncias da parede.....	51
20	Microscopia de polarização do eixo embrionário.....	51
21	Carboidrato total e redutor extraível com etanol 80%.....	53
22	Carboidrato total extraível com água e álcali.....	53
23	Análise por CCD dos oligossacarídeos.....	55
24	Proporção entre os açúcares presentes na fração solúvel em etanol 80%... ..	55
25	Análise por HPAEC-PAD do material solúvel em etanol 80%.....	56
26	Atividade enzimática por cotilédone.....	57
27	Dosagem de proteínas nos extratos enzimáticos.....	58
28	Atividade específica nos extratos.....	59
29	A mobilização de proteínas procedeu de forma heterogênea.....	60
30	As reservas de polissacarídeo de parede também foram mobilizadas.....	60
31	Análise de monossacarídeos gerados por hidrólise do polissacarídeo.....	62
32	Alteração nas proporções entre os oligossacarídeos de xiloglucano.....	63
33	Seqüência proposta para a mobilização das reservas.....	65
34	Modelo de degradação do xiloglucano baseado na ação da XET.....	69
35	Modelo proposto para o metabolismo e transporte dos carboidratos.....	76

Resumo

Algumas espécies de Leguminosae acumulam grande quantidade de polissacarídeos na semente. Seus produtos de degradação são translocados para o eixo embrionário após a germinação, constituindo uma importante reserva de carbono e energia para a plântula em desenvolvimento. Sementes de *Hymenaea courbaril* L. chegam a acumular 40% da massa da semente na forma de xiloglucano depositado na parede das células do parênquima cotiledonar. Neste trabalho, o processo de mobilização do xiloglucano de reserva de sementes de *Hymenaea courbaril* L. foi acompanhado citotóxicamente e bioquimicamente. Após a semeadura, foram coletadas 20 sementes a cada 5 dias até a queda dos cotilédones: 15 para acompanhamento da massa de matéria fresca e seca, 2 para acompanhamento de alterações celulares e 3 para análises bioquímicas (análise dos carboidratos presentes e enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano). Foi constatada a presença de pelo menos 3 outros materiais de reserva além do xiloglucano: oligossacarídeos da série rafínosica (metabolizados nos primeiros 15 dias após semeadura), corpos protéicos (mobilizados até 35 dias após semeadura) e grânulos presentes nos corpos protéicos (que provavelmente consistem em fitina, mobilizada nos primeiros 10 dias após a semeadura).

O xiloglucano de reserva foi mobilizado no período entre 35 e 50 dias após semeadura. Várias evidências corroboram esta observação: (1) neste período a espessura das paredes das células dos cotilédones diminui; (2) a quantidade de açúcar extraível dos cotilédones com água e álcali caem; (3) ocorre um aumento na atividade das enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano e; (4) há um acúmulo temporário de amido no interior das células, sugerindo que os carboidratos gerados pela degradação do xiloglucano entrem na célula.

O aumento da atividade das enzimas hidrolíticas não foi simultâneo. A primeira enzima a aumentar de atividade foi a α -xilosidase (em torno de 15 dias após semeadura), seguida pela β -galactosidase e β -glucosidase (cujas atividades aumentam a partir de 35 dias após semeadura, embora haja atividade presente desde a embebição) e pela xiloglucano-endo-transglicolase (XET, cuja atividade foi detectada apenas a partir de 55 dias após semeadura). O estudo da estrutura fina do xiloglucano mostrou

uma alteração na proporção entre os oligossacarídeos obtidos por digestão do xiloglucano com celulase antes do período de mobilização. Esta observação sugere que a atividade de β -galactosidase e β -glucosidase detectadas neste momento não seja um artefato gerado pela perda de compartimentalização das células, e sim uma atividade real sobre o polissacarídeo *in vivo*.

Apenas sacarose e monossacarídeos (principalmente glucose e frutose) foram detectados na fração de material solúvel em etanol durante a mobilização do xiloglucano. Estas devem ser, portanto, a forma de transporte do carboidrato de reserva para o eixo embrionário. A pequena quantidade de outros monossacarídeos presentes (xilose e galactose, que são monossacarídeos constituintes do xiloglucano) reforça a teoria de que os açúcares provenientes da degradação do polissacarídeo da parede entram rapidamente na célula cotiledonar. Uma vez dentro da célula, os monossacarídeos seriam convertidos a glucose e frutose e teriam diversos destinos possíveis: (1) biossíntese de sacarose a ser transportada para o eixo embrionário; (2) uso no metabolismo da célula do cotilédone (respiração, síntese de proteínas, etc.); (3) biossíntese de amido, o que funcionaria como um regulador da concentração de carboidratos, drenando o excesso de açúcares livres do citoplasma, mantendo-o disponível para mobilização posterior, quando as reservas da parede forem esgotadas e; (4) biossíntese de oligossacarídeos de xiloglucano.

A biossíntese de oligossacarídeos poderia vir a ser uma forma de a célula controlar a degradação do polissacarídeo da parede. Por não ter, aparentemente, uma endo- β 1,4-glucanase verdadeira, e sim uma xiloglucano-endo-transglicolase (XET), o mecanismo de degradação do xiloglucano requereria uma fonte externa de oligossacarídeos para que houvesse liberação de fragmentos de polissacarídeo susceptíveis ao ataque das exo-hidrolases (α -xilosidase e β -glucanase, principalmente).

Abstract

Some species of Leguminosae accumulate high amounts of polysaccharides in the seed. These polysaccharides are translocated to the embryo after the germination, being an important source of carbon and energy to the developing plantlet. Seeds of *Hymenaea courbaril* L. store up to 40% of the seed mass in the form of xyloglucan deposited in the walls of parenchyma cells. In this work, the mobilization of the storage xyloglucan in the seeds of *Hymenaea courbaril* L. was followed citochemically and biochemically. After planting, 20 seeds were collected every 5 days until the fall of the cotyledons: 15 to follow fresh and dry weight; 2 to follow cytological alterations and; 3 were collected for biochemical analysis (of the carbohydrates present and the enzymes involved in the degradation of xyloglucan). At least 3 other types of reserves other than xyloglucan were detected: oligosaccharides of the raffinose family (metabolised during the first 15 days after planting), protein bodies (mobilized until 35 days after planting) and granulation in the protein bodies (probably fitin, mobilised within the first 10 days after planting).

The storage xyloglucan was mobilised between 35 to 50 days after planting. This observation can be confirmed as follows: (1) in this period the walls of the cotyledonary cells became thinner; (2) the amounts of water and alcali soluble sugar decrease; (3) there is an increase in the activity of the enzymes involved in the degradation of xyloglucan and; (4) there is accumulation of transitory starch inside the cells, suggesting that the monosaccharides derived from xyloglucan breakdown are entering in the cell.

The rise of the activity of the enzymes was not simultaneous. The first enzyme to increase its activity was α -xylosidase (around 15 days after planting), followed by β -galactosidase and β -glucosidase (whose activity rise 35 days after planting, although there is activity since the beginning of inbibition) and xyloglucan-endo-transglycolase (XET, whose activity was detected only after 55 days of planting). The study of xyloglucan fine structure showed that chances in the proportion between the oligosaccharides occurred before the mobilisation period. This observation indicates that the activities of β -galactosidase and β -glucosidase detected prior to the mobilisation are not an artifact caused by the lost of compartmentalization of the cell, but a real activity upon the polysaccharide *in vivo*.

Only sucrose and monosaccharides (specially glucose and fructose) were detected in the fraction of the alcohol soluble carbohydrates during the mobilisation of xyloglucan. On the basis of these results, this seems to be the way the carbohydrates are transported to the embryo. The small amount of other monosaccharides (specially xylose and galactose, which are constituents of xyloglucan) strengthen the hypothesis that the sugars coming from the wall enter in the cell. Once inside it, the monosaccharides would be converted to glucose and fructose and could be used in the following ways: (1) biosynthesis of sucrose to be translocated to the embryo; (2) use in the cell metabolism (respiration, protein synthesis, etc.); (3) biosynthesis of starch, draining the excess of free carbohydrates from the cytoplasm, but keeping it available for further transport to the embryo and; (4) biosynthesis of xyloglucan oligosaccharides.

The biosynthesis of xyloglucan could be a way to control the degradation of cell wall polysaccharide. Since the degradation mechanism does not involve a real endo- β 1,4-glucanase, but a xyloglucan-endo-transglycolase (XET), xyloglucan oligosaccharides from an external source would be required to start the degradation of xyloglucan.

Introdução

Sementes

As sementes surgiram ao longo da evolução como uma estratégia de dispersão de novos indivíduos. A forma e composição química destas varia de uma espécie para outra, de acordo com a estratégia de dispersão e estabelecimento da plântula no ambiente. Estas variações podem ser, por exemplo, na resistência e permeabilidade da testa, na quantidade, no tipo e na localização do material de reserva, na existência de algum tipo de dormência, assim como no grau de desenvolvimento do embrião (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

As diferentes características das sementes refletem variações na estratégia adotada por cada espécie para o seu estabelecimento no ambiente. Dois padrões básicos podem ser identificados nas plantas: r e K (Barbour et al., 1987). Em geral, as espécies que adotam uma estratégia r se estabelecem em ambientes pouco previsíveis ou que ocorrem por um curto período, onde a mortalidade das plântulas é independente da densidade. Nesta situação, o melhor desempenho reprodutivo é obtido com uma grande produção de sementes pequenas. Por outro lado, em ambientes estáveis, onde a competitividade é muito alta, as sementes ricas em reservas possuem vantagens sobre as demais. É neste último tipo de ambiente que as espécies que adotam a estratégia K se saem melhor, produzindo um número menor de sementes com um maior investimento energético por semente. Embora os extremos sejam bastante distintos, as espécies encontradas na natureza se distribuem ao longo de um *continuum* de estratégias $r - K$.

A maioria das sementes possui compostos de reserva que são utilizados pelo embrião como fonte de matéria e energia até que o novo indivíduo seja capaz de extrair do ambiente os recursos necessários para a sua sobrevivência. Os três grupos de compostos orgânicos de reserva são: proteínas, lipídios e carboidratos, sendo que existe uma correlação negativa entre os teores de carboidrato e de lipídeo nas sementes. Tais compostos são caracterizados como reserva devido à sua degradação e translocação dos produtos derivados da sua hidrólise para o

eixo embrionário durante a germinação e estabelecimento da plântula (Bewley e Black, 1978).

Carboidratos de reserva

A composição e a localização das reservas de carboidratos podem variar de semente para semente. Um dos polissacarídeos de ocorrência mais freqüente é o amido, formado por uma cadeia principal de glucose ligada $\alpha 1,4$, com ramificações de outras cadeias idênticas ligadas $\alpha 1,6$ à cadeia principal. Além do amido, alguns polissacarídeos de parede já foram descritos como material de reserva (ver adiante, parede de reserva).

Além de polissacarídeos, oligossacarídeos da série rafínosica ocorrem em algumas sementes de leguminosas (Dey, 1980; Buckeridge e Dietrich, 1996) onde funcionam como uma reserva de mobilização rápida, antes da dos polissacarídeos (Buckeridge et al., 1995). Além de atuar como reserva, acredita-se que estes oligossacarídeos sejam importantes na proteção da semente, limitando os danos causados pela dessecação na semente madura (Buckeridge e Reid, 1996). Existe uma correlação entre o teor de rafinose na semente e a manutenção da sua viabilidade, mas o mecanismo de proteção ainda é desconhecido (Steadman et al., 1996).

Parede celular primária

Todas as células vegetais são envolvidas por uma parede celular. Segundo Waldron e Brett (1990), as paredes celulares têm como funções manter a forma da célula, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, participar dos mecanismos de proteção contra microrganismos, armazenar reservas e participar da sinalização e reconhecimento entre as células, além de ter efeitos sobre o transporte intercelular. Podemos acrescentar ainda a manutenção de uma pressão hidrostática sobre o citoplasma, influenciando o potencial hídrico intracelular (Street e ÖPik, 1984). Cada uma destas funções é exercida em graus diferentes e de formas diferentes por cada tipo celular.

Um exame da parede ao microscópio eletrônico mostra que ela não é homogênea. Em geral temos entre as células uma camada chamada lamela média que é rica em pectina, mais espessa nas regiões onde mais de duas células entram em contato. Adjacente à membrana plasmática está a parede primária e, em muitos casos, pode ocorrer ainda uma outra camada denominada parede secundária. Neste trabalho chamaremos de parede secundária todo material que assume-se ter sido depositado na parede após a parada do crescimento da célula, independente de sua natureza. A aparente uniformidade de cada uma dessas camadas ao microscópio esconde uma grande complexidade química. Os componentes de cada uma dessas camadas variam muito entre tipos celulares diferentes e entre espécies diferentes, tanto quantitativa quanto qualitativamente, podendo haver regiões da parede com composição diferenciada em uma mesma célula tais como plasmodesmata, cantos das células, etc. (Roberts, 1989, 1990).

Segundo Carpita e Gibeaut (1993), a parede primária da maioria das Angiospermas é composta por três grandes matrizes que se sobrepõem e que interagem nos vários processos que ocorrem na parede. A primeira matriz é formada por celulose e xiloglucano; a segunda, por substâncias pécnicas e a terceira por material protéico estrutural. Nas plantas da família Poaceae, também podemos identificar três matrizes análogas, embora a sua composição seja bem diferente (Carpita e Gibeaut, 1993; Carpita, 1996).

Embora amplamente aceito, este modelo não considera a presença dos compostos fenólicos na parede primária. Sua ausência no modelo ignora a possibilidade de formação de ligações cruzadas entre estes e os polissacarídeos (McNeil et al., 1984), além de possíveis ligações de polissacarídeos às proteínas (Liyama et al., 1994; McCann e Roberts, 1991). Carpita e Gibeau (1993) supõem que as matrizes sejam essencialmente independentes, ao contrário do que sugerem outros autores (Coimbra et al., 1994, Goonerate et al., 1994).

Celulose

A celulose é um polímero não ramificado de glucoses ligadas β 1,4 cuja principal função é conferir resistência mecânica à parede, sendo um dos poucos polímeros de parede sintetizados na membrana plasmática. Cada molécula de

celulose é produzida por um complexo multienzimático transmembrânico (Robinson, 1996) e, na parede, vários destes complexos se associam e se deslocam juntos na membrana plasmática (Delmer e Amor, 1995). Com isso, as moléculas recém sintetizadas formam feixes compostos de várias moléculas chamados de microfibrilas.

Devido à posição dos resíduos de glucose na molécula, ocorre a formação de ligações do tipo ponte de hidrogênio entre moléculas adjacentes. Com isso, nas regiões da fibrila onde a celulose ocorre pura, não há sítios livres onde possa ocorrer a formação de ligações do tipo pontes de hidrogênio. Isto reduz a camada de solvatação do polissacarídeo e, conseqüentemente, a solubilidade da microfibrila. Estas regiões possuem uma estrutura cristalina e normalmente ocorrem no centro da microfibrila. A periferia da microfibrila, em geral, é uma região amorfa, possivelmente devido à infiltração de outros polissacarídeos (principalmente xiloglucano, ver adiante), que impedem a cristalização da celulose (Hayashi, 1991; Hayashi et al., 1994). O revestimento de hemiceluloses permite que as fibrilas deslizem entre si, de modo que “a orientação da síntese das microfibrilas de celulose estabelece a forma final da célula, enquanto a interação dinâmica entre a celulose e os polissacarídeos não celulósicos determina a taxa de crescimento da célula”¹.

Hemiceluloses

São genericamente chamados de hemiceluloses: xilano, glucomanano, manano, galactomanano, xiloglucano, calose e glucano β 1,3- β 1,4 ligado (Waldron e Brett, 1990). Excetuando-se a calose, todas as hemiceluloses são sintetizadas no Complexo de Golgi (Moore et al., 1991), assim como as pectinas. Cada parede possui hemiceluloses diferentes em quantidades diferentes, sendo que nem toda paredes possui todos os polissacarídeos citados. Além disto, cada um destes polissacarídeos apresenta variações na sua composição de acordo com a fonte de onde foi extraído, o que torna possível uma diversidade muito grande.

¹ Tradução livre do texto original (Carpita e Gibeau, 1993).

Uma das hemiceluloses mais estudadas é o xiloglucano. Sua estrutura básica consiste em uma cadeia principal de resíduos de glucose ligados β 1,4, como na celulose, e ramificações de xilose ligadas α 1,6 à cadeia principal. Segundo a nomenclatura atual (Fry et al., 1993), os resíduos de glucose não ramificados são denominados **G**, enquanto os resíduos com ramificação de xilose são denominados **X**. Nem todas as moléculas de glucose possuem tais ramificações e, uma vez que nesses resíduos o xiloglucano é idêntico à celulose, a celulase pode hidrolisar o polissacarídeo nesses resíduos. Em muitos casos a ramificação de xilose apresenta uma galactose ligada β 1,2, quando então, o trissacarídeo (glc-xil-gal) é denominado **L**. Pode haver uma fucose ligada à galactose através de ligação α 1,2 e neste caso a sequência completa (glc-xil-gal-fuc) é denominada **F** (figura 1).

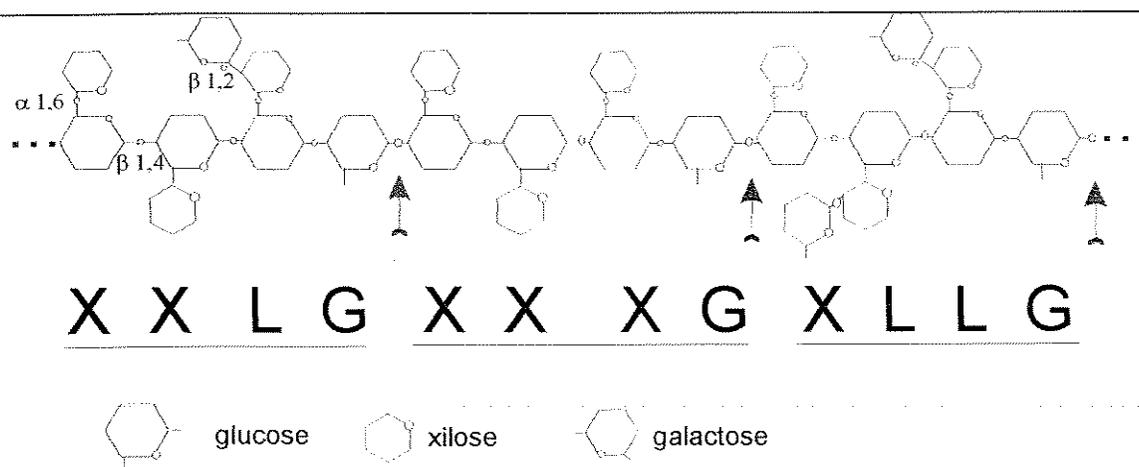


Figura 1: representação esquemática de uma molécula de xiloglucano. Os tipos de ligações estão indicadas no lado esquerdo da molécula. As setas representam os possíveis sítios de ataque da celulase. Os fragmentos gerados pela digestão deste segmento hipotético de xiloglucano com celulase de *Trichoderma viride* seriam: **XXLG**, **XXXG** e **XLLG**, segundo a nomenclatura atual (Fry et al., 1993). Esquema adaptado de Driouich et al. (1994).

Já foram encontradas diversas exceções para tal estrutura básica tais como arabinose (Keifer et al., 1990), dois resíduos de xilose em uma única glucose e uma ramificação de arabinose na xilose (Hisamatsu et al., 1992), ácido ferúlico

(Ishii et al., 1990) e O-acetilação das galactoses (Kiefer et al., 1989). Os xiloglucanos de monocotiledôneas não contêm fucose, contém menos xilose e muito menos galactose (Kato e Matsuda, 1985; Hayashi, 1989).

Várias funções já foram sugeridas para o xiloglucano. Nas paredes primárias o xiloglucano está intimamente ligado à celulose, chegando a penetrar na fibrila (Baba et al., 1994). O comprimento da cadeia de xiloglucano possibilita que uma mesma molécula estabeleça ligações com mais de uma fibrila de celulose, formando ligações cruzadas entre as mesmas, o que aumenta ainda mais a resistência da parede às forças externas (Hayashi e Maclachlan, 1984). Mesmo *in vitro*, o xiloglucano é capaz de se associar à celulose, embora a quantidade capaz de se ligar à microfibrila seja menor do que *in vivo*, possivelmente por haver um impedimento à penetração na microfibrila durante os ensaios *in vitro* (Hayashi et al., 1994). Além de estabelecer ligações entre as fibrilas, o revestimento de xiloglucano mantém a organização das microfibrilas, impedindo que estas coalesçam e formem feixes muito espessos (McCann et al., 1990).

Segundo o modelo atual de formação da parede, as vesículas provenientes do Complexo de Golgi que contêm o xiloglucano se fundem com a membrana plasmática enriquecendo o meio extracelular com essas moléculas. Algumas destas moléculas se infiltram na fibrila de celulose enquanto esta está sendo sintetizada, impedindo a associação lateral das moléculas de celulose, ao menos na região amorfa periférica da microfibrila. Em seguida, a fibrila recém sintetizada, permeada por fragmentos de xiloglucano, seria integrada à parede com a formação de ligações entre suas moléculas (Hayashi, 1989), possivelmente por transglicosilação (ver adiante “enzimas”).

Pectina

O termo pectina está relacionado a vários polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose (Waldron e Brett, 1990). Sob essa designação podemos incluir ramnogalacturonanos I e II, arabinanos, arabinogalactanos, homogalacturonanos e galactanos. A quantidade desses componentes varia de célula para célula, sendo que nem todas possuem todos os componentes. Em geral a pectina está presente em grande quantidade na lamela

média e em espessamentos da parede que ocorrem em resposta à invasão de patógenos (Rodríguez-Gálvez e Mendlen, 1995). A presença de açúcar ácido (ácido galacturônico) nesses polissacarídeos confere uma carga líquida negativa à pectina, o que é de grande relevância fisiológica.

Entre as funções das pectinas podemos citar: a regulação da porosidade e permeabilidade da parede, tanto para íons quanto para moléculas neutras (Baron-Epel et al., 1988); reserva e modulação das propriedades mecânicas da parede em alguns tecidos (Buckeridge e Reid, 1996); participação nos mecanismos celulares de defesa, sendo os oligossacarídeos de pectinas uma das mais bem caracterizadas classes de oligossacarinas² (Braga et al., 1993).

Proteínas

As proteínas presentes na parede podem ser divididas em dois grandes grupos: as estruturais e as enzimas.

Estruturais

As principais proteínas estruturais da parede são classificadas em extensinas, proteínas ricas em glicina, proteínas ricas em prolina, lectinas e arabinogalactano-proteínas (Showalter, 1993), embora dados recentes sugiram que, em alguns casos, estes termos se apliquem mais a domínios das proteínas do que às proteínas em si (Carpita et al., 1996). Além de ocorrerem em níveis basais, sua expressão pode ser induzida ou aumentada por ferimentos, estresse, ou como parte do processo de diferenciação celular. Acredita-se que estas proteínas formem ligações éter entre os resíduos de tirosina de proteínas adjacentes ou com polissacarídeos, enrijecendo a parede (Liyama et al., 1994)

Recentemente foram descoberta a expansina, uma proteína capaz de induzir *in vitro* a expansão de paredes inativadas pelo calor (McQueen-Mason et al., 1992). O fato de esta proteína não apresentar nenhuma atividade de transglicosilase ou hidrolase detectáveis aponta para a existência de um novo

² Oligossacarinas são são fragmentos de polissacarídeos de parede que possuem capacidade de ativar mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos.

processo envolvido na extensão da parede (Cosgrove, 1993) como, por exemplo, a reorganização das pontes de hidrogênio na matriz celulose-hemicelulose (McQueen-Mason, 1995). Esta proteína, portanto, seria capaz de reorganizar as ligações do tipo pontes de hidrogênio na parede, possibilitando o deslizamento das microfibrilas de celulose umas sobre as outras aliviando a tensão gerada pela expansão celular (McQueen-Mason e Cosgrove, 1994). Seria possível classificar a expansina como uma enzima, embora as ligações envolvidas não sejam covalentes.

Enzimas

Existem quatro grandes grupos de reações na parede que são catalizadas por enzimas: hidrólise de ligações ester-glicosídicas e ligações peptídicas, transglicosilação, transacilações (possivelmente envolvidas na síntese da cutina) e reações de óxido-redução (Fry, 1995). Não existem evidências de que os dois últimos tipos de reação ocorram em polissacarídeos de parede, mas as reações de oxido-redução envolvendo fenóis como doadores de elétrons são importantes na formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos, via pontes de ácido ferúlico, na lignificação da parede, o que pode ser importante no processo de parada do crescimento, no enrijecimento da parede e na defesa contra patógenos (Liyama et al., 1994).

As glicosidases na parede têm diversas funções. Elas servem para modificar os polissacarídeos, alterando sua atividade biológica, como a fucosidase, que alteraria a atividade biológica dos oligômeros de xiloglucano (Hoson et al., 1995); aliviar a tensão da parede criada pelo crescimento da célula, no caso das endoglicosidases (Cosgrove, 1993) e da exo-galactanase de *Lupinus angustifolius* (Buckeridge e Reid, 1996) e para degradar polissacarídeos de parede, permitindo a internalização dos produtos de hidrólise pela célula, no caso dos polissacarídeos de reserva (Edwards et al., 1985; 1986). As proteases podem atuar tanto no "turnover" das proteínas de parede, quanto na defesa da célula contra eventuais tentativas de invasão por microorganismos e ainda em processos de reconhecimento celular.

Entre as enzimas de transglicosilação, a mais estudada é a xiloglucano endo-transglicosilase (XET). Uma enzima provavelmente codificada por uma

família de genes (Silva et al., 1994) cujas taxas de expressão são sensíveis a auxina (Nishitani, 1995) e se correlacionam bem com taxas de crescimento celular (Fry et al., 1992). Suas estruturas primária e secundária são bastante conservadas (Nishitani, 1995) e a atividade de XET já foi detectada desde briófitas a monocotiledôneas, inclusive gramíneas, cuja parede possui pouco xiloglucano (Fry et al., 1992). Aparentemente a XET é uma enzima específica para xiloglucano, pois este é o único polissacarídeo capaz de atuar eficientemente como doador de açúcares para a transglicosilação (Fanutti et al. 1993)

A XET cliva moléculas de xiloglucano gerando duas novas extremidades: uma redutora e outra não. A mesma enzima liga o terminal redutor gerado a um terminal não redutor de uma outra molécula de xiloglucano (Figura 2A). O resultado líquido de fragmentação do xiloglucano da parede é zero, havendo apenas um remodelamento do polissacarídeo. Este processo possibilita o relaxamento da tensão gerada durante o crescimento. Como ocorre a quebra de uma ligação glicosídica e a formação de outra idêntica, a variação da energia livre é próxima a zero, ou seja, a reação está sempre próxima ao equilíbrio e não há necessidade de uma fonte externa de energia (McQueen-Mason, 1995)

Como a enzima é incapaz de clivar o polissacarídeo e gerar novos terminais não redutores, exceto em concentrações muito baixas de substrato (Fanutti et al., 1993), a presença de oligossacarídeos de xiloglucano é condição necessária para detectar a queda de viscosidade em soluções de xiloglucano (figura 2B). Isso poderia explicar o estímulo da atividade de endo- β -glucanase por oligossacarídeos de xiloglucano (Farkas e Maclachlan, 1988) e as alterações morfológicas em células cultivadas *in vitro* (Ruel e Joseleau, 1993). Apesar do seu potencial de remodelar as pontes de xiloglucano entre as fibrilas de celulose, a XET isolada não é capaz de promover crescimento de paredes inativadas pelo calor como ocorre com as expansinas, de forma que o seu papel na expansão da parede ainda é incerto (Cosgrove, 1993).

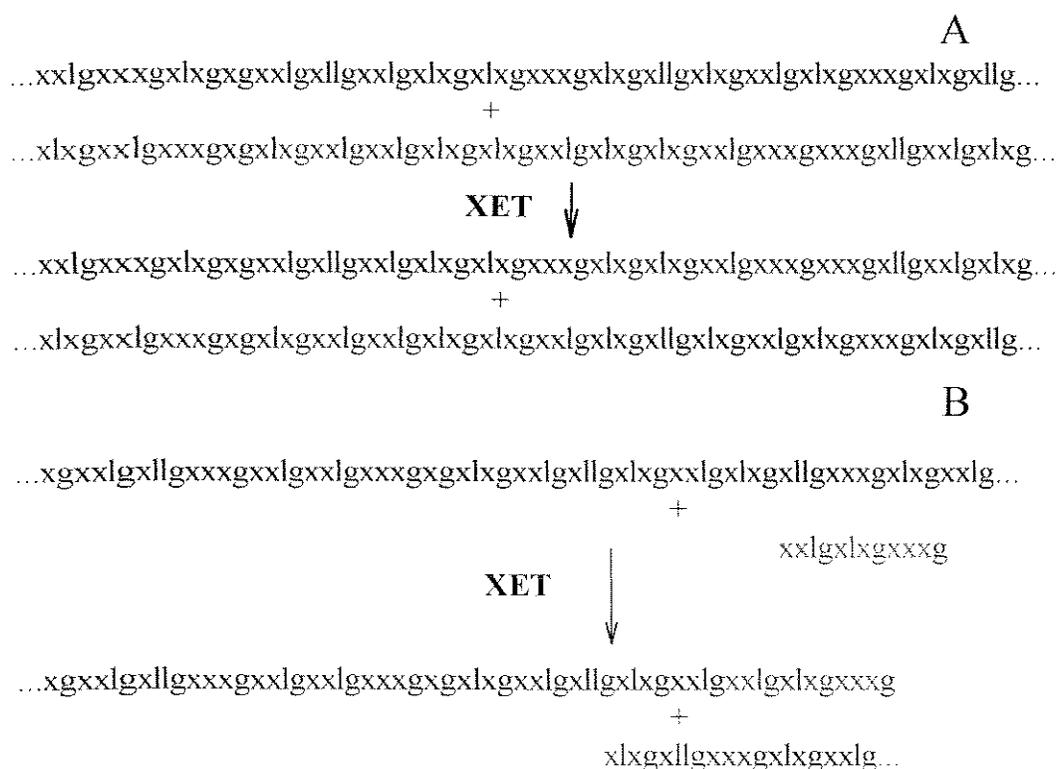


Figura 2: representação esquemática de possíveis ações da XET sobre um fragmento hipotético de xiloglucano. A XET pode transferir grandes fragmentos entre duas moléculas de xiloglucano (A) ou hidrolisar um polissacarídeo ao transferir o terminal redutor gerado para um oligossacarídeo (B), trazendo a massa molecular de ambos os fragmentos mais próximos à massa molecular média. O terminal redutor está indicado com a letra verde. Adaptado de Fry, 1995.

Diante de toda esta diversidade de modificações na parede celular *in vivo*, ela pode ser considerada um compartimento metabolicamente ativo da célula (Fry, 1995). O modelo de crescimento adotado atualmente (Taiz, 1984; Cosgrove, 1993) supõe uma parede dinâmica e em constante modificação (Figura 3). Segundo este modelo, quando a célula absorve água, o aumento do turgor exerce uma força sobre a parede, distendendo-a até que a tensão gerada nos polímeros se iguale à pressão exercida pelo citoplasma. Em seguida, as enzimas presentes na parede (XET, expansinas, endo e exo-glicosidases) modificam os polissacarídeos de modo a aliviar a tensão. Com a redução da pressão da parede sobre o citoplasma, o potencial hídrico deste diminui e mais água entra na célula, aumentando o volume celular e, conseqüentemente, a pressão do citoplasma sobre a parede, o que distende esta última, começando um novo ciclo de crescimento. *In vivo*, o

processo é contínuo e está sempre próximo ao equilíbrio. A todo momento ocorre troca de material entre a parede e o citoplasma: o citoplasma manda para a parede novos polímeros (polissacarídeos e proteínas) para evitar o enfraquecimento da parede e esta última libera o produto das reações de rearranjo dos polímeros para uso no metabolismo intracelular (Taiz, 1984).

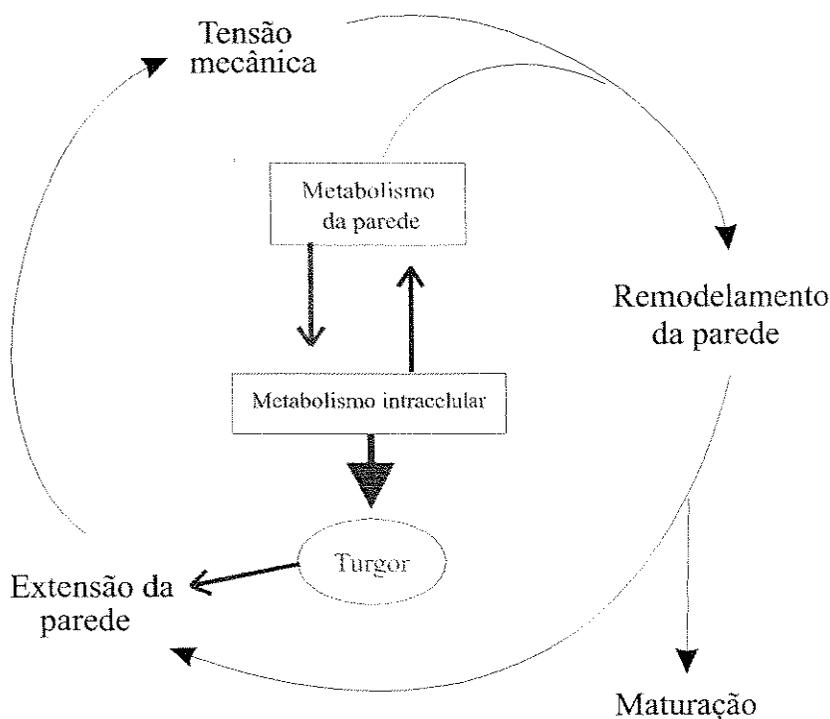


Figura 3: modelo de crescimento da parede celular. O aumento do turgor da célula leva à extensão da parede, gerando tensão mecânica nos polímeros desta. O metabolismo da parede modifica e rearranja seus polímeros, assim como incorpora a esta os novos polímeros vindos do citoplasma de forma a aliviar a tensão criada pelo crescimento. Uma vez aliviada a tensão, a célula volta a crescer, e a cada volta no ciclo a célula cresce mais um pouco. Em algumas células a diferenciação interrompe o ciclo e a célula para de crescer. Adaptado de Taiz, 1984.

Parede de reserva

Nos tecidos de reserva de algumas sementes, a parede de reserva (também chamada de espaço periplasmático) é formada apenas pela interrupção ou redução da malha de pectina, celulose e proteína, havendo deposição apenas de uma grossa camada de hemicelulose. Tais espessamentos representam uma grande reserva de carboidrato na semente que é mobilizada durante a germinação e estabelecimento da plântula (Bewley e Black, 1978; Buckeridge e Reid, 1996). Este processo envolve a ação de diversas enzimas de parede capazes de degradar essa hemicelulose e permitir a sua mobilização para o eixo embrionário a partir do órgão de reserva que pode ser o endosperma ou os cotilédones.

Já foram descritos como compostos de reserva na parede os mananos (com diferentes graus de ramificação com galactose) (Reid, 1971), xiloglucano (ver a seguir) e galactano (Crawshaw e Reid, 1984), sendo este último uma cadeia lateral de pectina.

Os mananos puros formam fibras pouco solúveis localizadas na parede das células do endosperma de sementes de plantas da família Palmae, conferindo ao tecido uma grande rigidez e uma baixa permeabilidade à água. Nos galactomananos (característicos de Leguminosae), as ramificações de galactose aumentam a solubilidade do polissacarídeo (Dea e Morisson, 1975), assim como sua capacidade de reter água. Nas sementes que acumulam galactomanano, portanto, o polissacarídeo pode influenciar a embebição de toda a semente. Esta capacidade levou Reid e Bewley (1979) a considerar o galactomanano uma molécula multifuncional, agindo não apenas como reserva de carbono, mas também atuando no controle hídrico. Como outros polissacarídeos de reserva acumulados na parede possuem propriedades hidrodinâmicas semelhantes às do galactomanano, é possível que estas moléculas venham a ser caracterizadas, também, como multifuncionais (Buckeridge et al., 1992; Buckeridge e Reid, 1996). Garwood (1996) chega a colocar o balanço hídrico como uma função típica dos cotilédones.

Xiloglucano de reserva

Desde 1839 já se sabia que algumas sementes acumulam na parede uma grande quantidade de uma substância que é corada com uma solução de iodo/iodeto de potássio. Como esta coloração é tipicamente utilizada para detectar amido, o xiloglucano foi denominado amilóide (Vogel e Schleiden, 1839). Ainda no século passado (Heinricher, 1888; Reiss, 1889), foi observada a mobilização do então chamado amilóide para o eixo embrionário, o que caracterizou sua função de reserva. No entanto, apenas neste século foi determinado que, em *Tamarindus indica* L., a substância era formada por glucose, xilose e galactose, nas proporções 3:2:1 (Krishna e Ghose, 1942, 1943). Em seguida, White e Rao (1953) sugeriram que o polissacarídeo seria composto por uma cadeia principal de glucose ligada 1,4 com ramificações de xilose 1,6 e galactose ligada a esta última por uma ligação 1,2. No início da década de 60, Kooiman (1960) realizou uma extensa pesquisa sobre a presença de amilóide em sementes, e detectou sua presença em sementes de várias espécies. Apesar da ampla distribuição, apenas em algumas espécies o xiloglucano foi estudado (*Tamarindus indica* L. - Kooiman, 1961; - *Annona muricata* - Kooiman, 1967; *Tropaeolum majus* L. - Le Dizet, 1972; *Impatiens balsamina* - Courtois e Le Dizet, 1974). Com base nestes estudos, acredita-se hoje que o polissacarídeo de reserva das sementes possua uma estrutura bastante semelhante ao de parede primária (Albersheim, 1976; Hayashi, 1989).

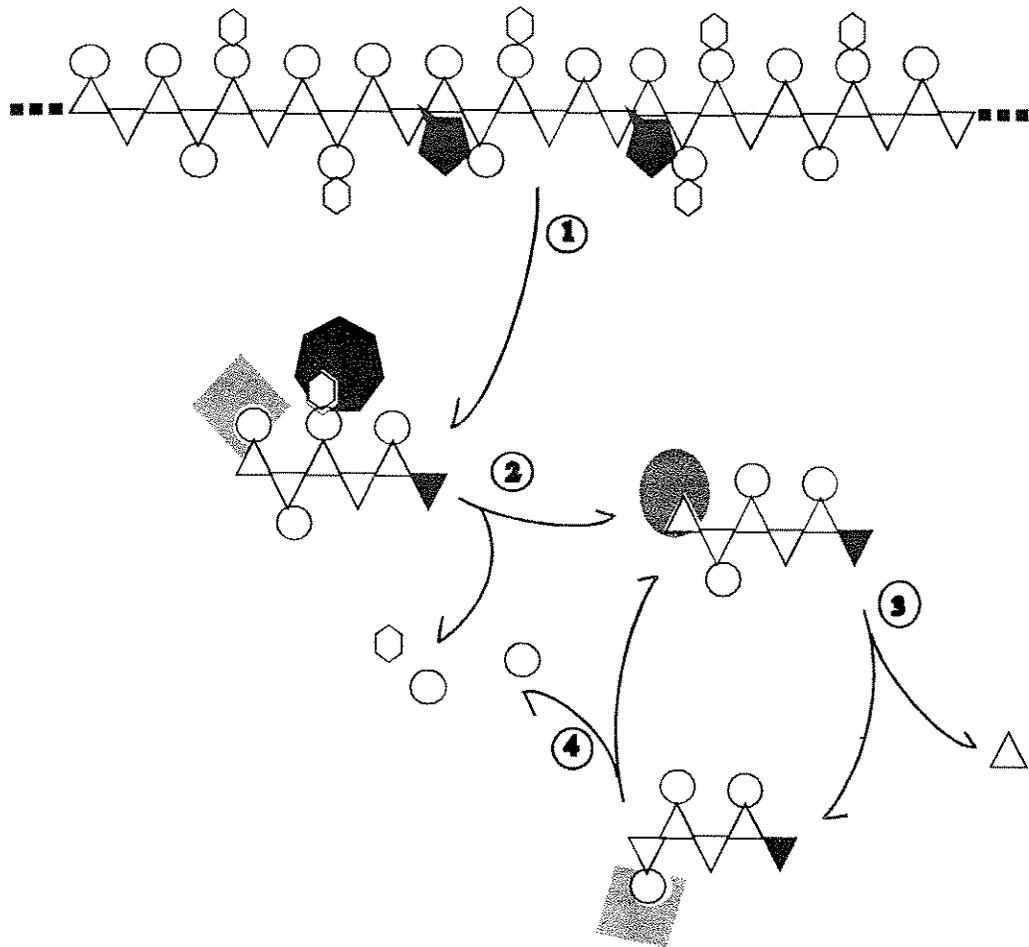
Em 1985, Edwards et al. acompanharam a mobilização do xiloglucano em *Tropaeolum majus* e observaram um aumento da atividade das enzimas envolvidas na degradação do mesmo (β -glucosidase, β -galactosidase, α -xilosidase e endo- β 1,4-glucosidase) durante a mobilização deste para o eixo embrionário. Em 1987, Reis e colaboradores acompanharam o mesmo processo em *T. indica* e observaram o acúmulo de amido no interior da célula durante a degradação do polissacarídeo da parede, supostamente devido ao excesso de carboidrato no citoplasma (como sugerido por Harris e Chrispeels, 1975). Os autores identificaram 3 etapas na mobilização do xiloglucano da semente: uma etapa de

hidratação da semente e mobilização dos corpos protéicos, uma etapa de mobilização do xiloglucano e uma etapa pós-mobilização onde o cotilédone permanece ligado ao eixo embrionário com cerca de 10% do peso inicial, sem alterações significativas nas massas de matéria fresca e seca.

Desde então, as principais enzimas de degradação de xiloglucano de *T. majus* foram isoladas e caracterizadas pelo grupo do professor Grant Reid da Universidade de Stirling na Escócia: a α -xilosidase (Fanutti et al., 1991), a β -galactosidase (Edwards et al., 1986; Fanutti et al., 1993) e a endo- β 1,4-glucanase (Edwards et al., 1986). Estas enzimas, junto com a β -glucosidase, agem em conjunto sobre o polissacarídeo para liberar os monossacarídeos constituintes que seriam internalizados pela célula (figura 4). A descoberta, em *Copaifera langsdorfii*, de uma β -galactosidase que, ao contrário da enzima de *T. majus*, hidrolisa apenas algumas galactoses em posições específicas, sugere a existência de mecanismos sutis e sofisticados de degradação do polissacarídeo (Alcântara et al., submetido à publicação).

Sabe-se hoje que a endo- β -glucanase é na realidade um membro da família de transglicosidases de xiloglucano (XET) expressa exclusivamente nos cotilédones (Rose et al., 1996) e não uma endo-glucanase com alta especificidade para o xiloglucano como alguns autores sugeriram (Farkas et al., 1992; Fanutti et al., 1993)

Análises da estrutura fina do xiloglucano de sementes de *Tropaeolum majus* L.; *Tamarindus indica* L. e *Copaifera langsdorfii* L. mostraram que a digestão exaustiva do polissacarídeo de reserva com celulase de *Trichoderma viride* libera os mesmos oligossacarídeos: XLLG, XXLG, XLG e XLLG. Todos formados de 4 resíduos de glucose com variados graus de ramificação (Figura 5). A proporção entre estes blocos varia de espécie para espécie, e até mesmo de população para população de uma mesma espécie (Buckeridge et al., 1992).



 endo β -glucanase

 β -galactosidase

 α -xilosidase

 β -glucosidase

 glucose

 glucose redutora

 xilose

 galactose

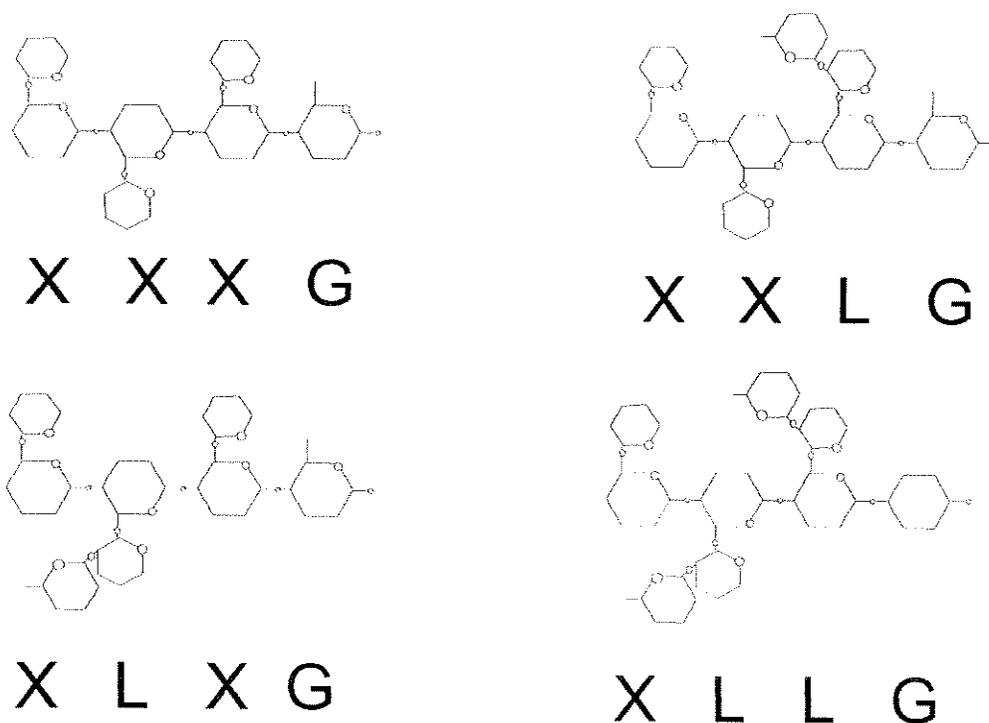


Figura 5: oligossacarídeos obtidos pela digestão de xiloglucano de sementes de *T. majus*, *T. indica* ou *C. langsdorfii* com celulase de *Trichoderma viride*.

A deposição do xiloglucano durante a formação da semente tem sido menos estudada. Em 1986, Hoth e colaboradores observaram o acúmulo transitório de amido durante a maturação da semente de *T. majus*. Este amido desaparecia ao final do processo de deposição do xiloglucano, sendo, provavelmente, utilizado como fonte de carboidratos para a síntese do polissacarídeo de parede. Contudo, a quantidade de xiloglucano formada durante a degradação do amido correspondia apenas a metade desta reserva armazenada, o que sugeriu uma alta atividade em outras vias metabólicas no período (respiração, síntese protéica, etc.). Ao fornecer xilose marcada radioativamente, o amido foi o primeiro polissacarídeo a ser marcado. Segundo os autores, o sistema de biossíntese de xiloglucano não seria capaz de utilizar diretamente xilose livre do citoplasma. A via proposta para o metabolismo da xilose seria a isomerização desta para xilulose, fosforilação e entrada na via das pentoses (xilulose-5-P é um intermediário da via das pentoses). Uma vez no metabolismo primário, a xilulose seria convertida em glucose-6-P e formaria UDP-glucose. A UDP-glucose seria

oxidada a UDP-ácido galacturônico e este seria descarboxilado, formando UDP-xilose que, então, poderia servir de substrato para a biossíntese de xiloglucano.

Alguns anos mais tarde, Ruel e colaboradores (1990) acompanharam as alterações na ultraestrutura da parede durante a deposição de xiloglucano nas sementes da mesma espécie. Os autores verificaram que, durante a deposição, havia 3 camadas na parede: a primária, a de reserva e uma terceira camada entre a esta última e a membrana plasmática. Esta terceira camada parece ser o sítio de deposição do xiloglucano antes de sua incorporação definitiva à parede. A camada de reserva, por sua vez, apresenta-se heterogênea, rica em alvéolos que, apesar de conterem polissacarídeo, apresentam uma reação menos intensa ao método de coloração que o resto da parede.

A deposição e a mobilização do xiloglucano de reserva seriam processos resultantes da separação temporal do metabolismo da parede. Nessa visão, o processo de deposição da reserva de xiloglucano ocorreria pela eliminação das atividades de glicosidases na parede (reduzindo, portanto, o "turnover" dos polissacarídeos) com um aumento do envio de polissacarídeos do citoplasma para a mesma. Já no processo de mobilização das reservas, a situação seria invertida, com o aumento da atividade glicolítica e concomitante interrupção do envio de polissacarídeos para a parede (figura 6).

Justificativa

Por séculos o homem tem utilizado sementes como fonte de vários compostos, em especial de produtos alimentícios como óleos, proteínas e carboidratos (Dufus e Slaughter, 1980). Além do amido, a principal fonte de carboidrato da humanidade (Langenheim e Thimann, 1982), vários outros polissacarídeos apresentam uso comercial. A pectina, por exemplo, é um dos principais responsáveis pela consistência das geléias. O galactomanano vem sendo utilizado como espessante de sorvetes, sopas e xampus, devido à viscosidade que ele confere a estas soluções, mesmo em baixas concentrações. Por ter propriedades semelhantes à do galactomanano, o xiloglucano apresenta um potencial de uso semelhante ao deste último.

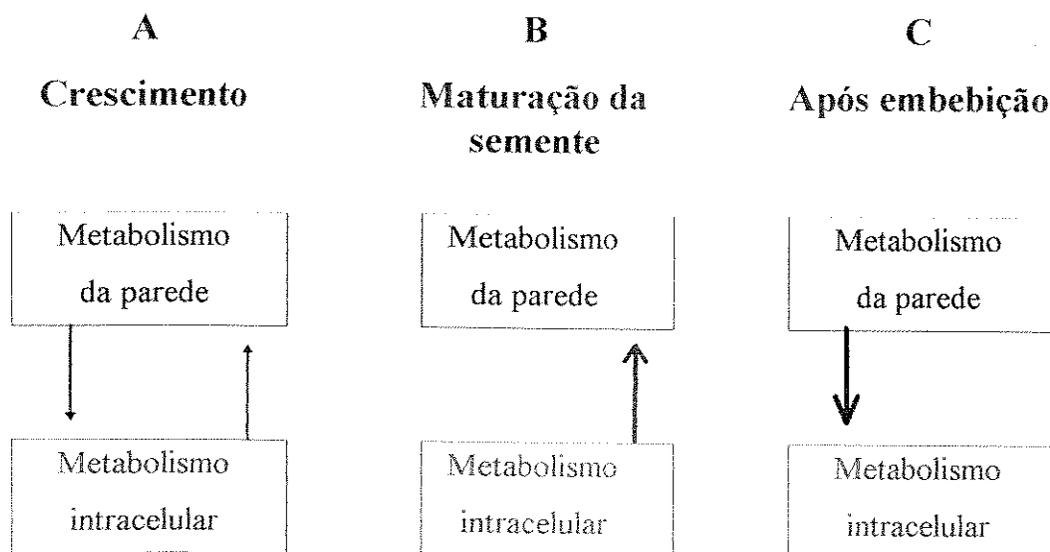


Figura 6: separação temporal do “turn-over” da parede durante o crescimento. (A) a troca permanente de carboidratos entre a célula e o citoplasma possibilita o crescimento da célula (ver figura 3 para detalhes). (B) a interrupção (ou drástica redução) da degradação dos polissacarídeos e o aumento na biossíntese destes leva ao acúmulo de polissacarídeos na parede durante a maturação da semente. (C) o aumento das atividades glicolíticas, associado à interrupção de deposição de polissacarídeo leva à mobilização das reservas acumuladas após a embebição. No caso do xiloglucano, a seta azul pode ser considerada uma simplificação do esquema mostrado na figura 4.

Estudos a respeito espécies nativas são importantes não apenas para que se possa desenvolver novas tecnologias e produtos, mas também para que se possa avaliar o patrimônio genético de uma área, um importante parâmetro na definição de estratégias para conservação e manejo (Gómez-Pompa e Burley, 1991). Embora Lima e colaboradores (1993) tenham definido a estrutura do xiloglucano de *H. courbaril* como sendo um xiloglucano “ortodoxo” (ou seja, formado basicamente por repetições de blocos de quatro glucoses, como o xiloglucano de *Tamarindus indica* e *Tropaeolus majus*, figura 5), dados recentes a respeito do jatobá (Buckeridge et al., 1997) revelaram a existência de uma nova classe de oligossacarídeos gerados por digestão com celulase. Cerca de metade do xiloglucano de reserva seria composto por um polissacarídeo baseado em

oligossacarídeos formados por 5 glucoses, ao contrário das estruturas já descritas, formadas basicamente por grupos de 4 glucoses.

Segundo Vincken e colaboradores (1995), o xiloglucano seria formado por repetições de oligossacarídeos de grau de polimerização igual a 4 (figura 5) pois este seria o tamanho ideal para interação com a microfibrila de celulose. A existência de oligossacarídeos com grau de polimerização 5 traz uma série de perguntas a respeito da interação deste novo polissacarídeo com a celulose e com outras moléculas de xiloglucano.

O jatobá (*Hymenaea courbaril*) é uma leguminosa arbórea que tem sido explorada comercialmente por fornecer uma madeira dura e resistente à putrefação, que pode ser usada em construções pesadas e obras hidráulicas (Carvalho, 1994). Como uma espécie típica de estágios avançados de sucessão, o jatobá é uma espécie bastante exigente quanto às condições de crescimento e desenvolvimento. Com a redução das áreas de mata nativa do país, esta espécie, assim como várias outras, correm o risco de entrar em extinção. Estudos a respeito de sementes de espécies tropicais são um passo importante na definição de estratégias de manejo e conservação de florestas onde estas ocorrem (Janzen e Vázquez-Yanes, 1991).

Apesar das diferenças nas proporções de monossacarídeos entre o xiloglucano de parede primária e o de reserva, este último é um bom modelo de estudo de polissacarídeo de parede. A sua abundância facilita a obtenção de material para estudos, e por requerer uma grande quantidade de enzimas para sua hidrólise, facilita também a obtenção destas para uso como ferramentas no estudo dos polissacarídeos. Além disso, a existência de um espessamento rico em xiloglucano levanta outras perguntas a respeito da capacidade de auto-interação deste polissacarídeo, pois nos modelos de parede existentes, o xiloglucano está sempre associado à celulose e entremeado por outros polímeros.

A análise fina do polissacarídeo e de seus produtos de degradação pode se revelar mais promissora do que a simples detecção da atividade enzimática durante o processo, como foi feito para a maioria das outras espécies. A atividade enzimática medida *in vitro* pode ser trazer uma série de artefatos como: (1) a homogeneização do tecido, com a perda de toda a compartimentalização da célula, (2) uso de substrato sintético, para o qual a enzima provavelmente

apresenta uma afinidade diferente em relação ao seu substrato natural. Por outro lado, a análise dos carboidratos, ignorada na maioria dos trabalhos publicados, possibilita a análise direta do produto da reação.

Objetivo

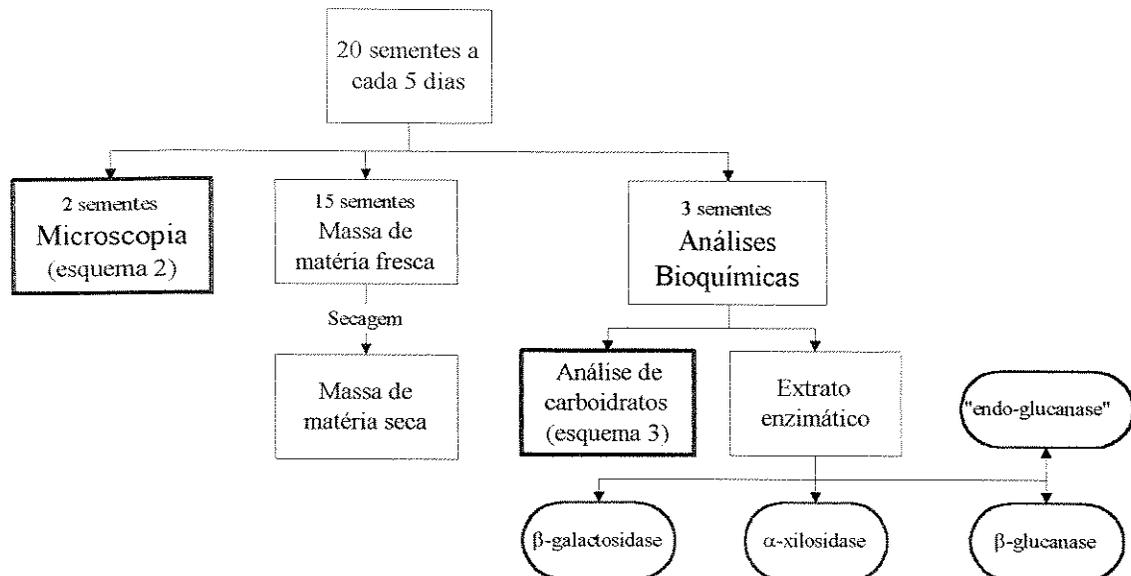
O presente trabalho teve como objetivo estudar a mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones de *Hymenaea courbaril* através da análise dos açúcares presentes ao longo do processo e do acompanhamento das atividades de enzimas envolvidas, correlacionando estas informações com possíveis alterações citoquímicas ocorridas nos cotilédones.

Material e métodos

Padronização do material e procedimento

Sementes de *Hymenaea courbaril* foram gentilmente cedidas pela Seção de sementes do Instituto de Botânica de São Paulo. No lote utilizado, a massa média foi de $4,75 \pm 1,18$ g, em mil sementes, sendo que nos experimentos, apenas as sementes com massa entre 3 e 6,5g foram utilizadas. As sementes foram escarificadas mecanicamente do lado oposto ao embrião, pesadas individualmente, esterilizadas em água sanitária comercial por 5 minutos, imersas em água destilada por 12 horas, e enterradas completamente em vermiculita saturada em nistatina $100 \text{ unidades.ml}^{-1}$ (Micostatin®, drágeas-Bristol-Myers Squib) em copos plásticos numerados (4 sementes por copo) de forma a possibilitar a identificação posterior da semente. Ao longo do experimento as sementes foram regadas com esta mesma solução.

As sementes foram mantidas em uma câmara de crescimento a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em fotoperíodo de 12 horas. A cada 5 dias, 20 sementes foram coletadas até que o experimento completasse 75 dias após a semeadura, quando já não havia plântulas suficientes com cotilédones para uma próxima coleta. Deste material, 3 foram congeladas para experimentos bioquímicos, 2 foram fixadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para microscopia e 15 sementes tiveram seus eixos embrionários e cotilédones pesados individualmente logo após a coleta e após 48 horas em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ para a determinação da massa de matéria fresca e seca, respectivamente (esquema 1). O material controle (0 dias de embebição) foi coletado logo após a imersão em água destilada por 12 horas. Ao longo da embebição, todas as sementes foram coletadas com a testa, devido à impossibilidade de retirá-la nas sementes ainda não embebidas.



Esquema 1: visão geral do procedimento realizado com sementes de *H. courbaril*. A mesma seqüência metodológica foi seguida durante 75 dias. As caixas em verde se referem a outros esquemas detalhados a seguir (microscopia e análise de carboidratos) e as caixas azuis se referem a dosagens realizadas.

Foi feita, ainda, uma repetição do primeiro experimento para a determinação da atividade enzimática nos cotilédones. Nessa repetição, foram coletados 3 grupos de 5 sementes entre 35 e 50 dias após sementeira, onde, de acordo com o primeiro experimento, era esperado encontrar a maior atividade enzimática. Os cotilédones foram processadas na hora sem serem congeladas.

Microscopia fotônica e eletrônica de varredura

Fixação e processamento

As sementes e plântulas coletadas para observações em microscopia foram fixadas em paraformaldeído 4% (p/v)/glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 24 horas a 5 °C (Kierman, 1981) e desidratadas em uma série de álcool butílico terciário (70, 85, 95 e 100% por pelo menos 24 horas cada) à temperatura ambiente. O material foi mantido em álcool butílico 100% até que fosse dada continuidade no processamento. Em seguida pastilhas de Paraplast foram colocadas no álcool e, após 24 horas, o material foi colocado na estufa a

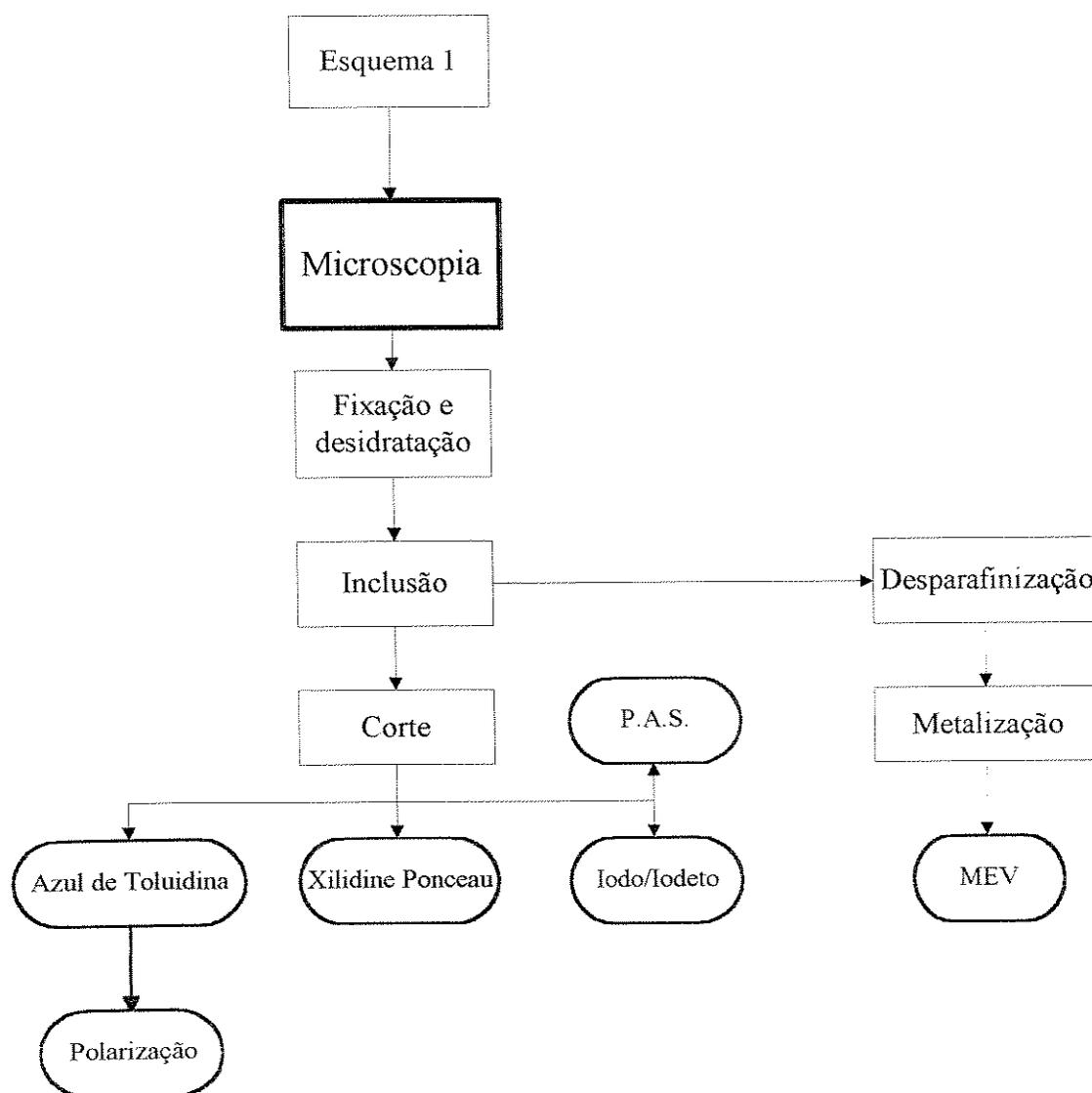
60°C para a evaporação do álcool, deixando o material imerso em Paraplast fundido, o qual foi trocado mais 3 vezes ficando o material imerso pelo menos 24 horas cada. Em seguida o material foi emblocado e cortado longitudinal ou transversalmente em secções com 8 micrômetros de espessura.

A desparafinização dos cortes foi feita com 2 imersões sucessivas em xilol (30 minutos cada), álcool-xilol 1:1 (v/v) por 20 minutos e metanol-clorofórmio 1:1 (v/v), pelo menos 2 horas, sendo que os cortes normalmente ficavam nessa solução até o dia seguinte. Em seguida os mesmos foram reidratados em banhos sucessivos de 5 minutos em soluções de etanol cada vez mais diluídas (100, 95, 85, 70%-Lison, 1963) (esquema 2).

Coloração com Xylidine Ponceau (XP)

Este corante aniônico é comumente utilizado para a detecção de proteínas pois, nas condições de pH utilizadas rotineiramente (em torno de 2,5 e, portanto, abaixo do ponto isoelétrico da maioria das proteínas), estas se apresentam positivamente carregadas. Os demais componentes da célula (ácidos nucleicos, pectinas, carboidratos neutros, etc.) estariam neutros ou negativamente carregados.

Para a observação dos corpos protéicos foi utilizada a coloração pelo XP. Os cortes foram cobertos com uma solução de XP 0,1% em ácido acético 3%, pH 2,5 por 15 minutos e lavados em ácido acético 3% por 30 minutos e em água destilada por 5 minutos. Seguiu-se uma desidratação em etanol (95 e 100%), xilol e montagem em resina Eukitt. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente (Cortelazzo, 1992).



Esquema 2: visão geral do procedimento para observações em microscopia. P.A.S.= oxidação com ácido periódico seguido de coloração com Reativo de Schiff. MEV= Microscopia Eletrônica de Varredura.

Coloração com Azul de Toluidina (AT)

Ao contrário do XP, este corante se liga a radicais ácidos livres. Nas condições e pH utilizadas, detecta-se pectinas não esterificadas e os ácidos nucléicos.

Os cortes foram cobertos com uma solução de AT 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0 por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram lavados rapidamente com água destilada e o material seco ao ar. A lâmina foi, então, imersa em xilol por 5 minutos e montada em Eukitt (Vidal, 1977).

Microscopia de polarização

Na microscopia de polarização, os materiais de natureza cristalina como a parede primária (devido às fibrilas de celulose) e os grãos de amido aparecem como corpos brilhantes contra um fundo escuro. Nesta técnica, os grãos de amido apresentam uma cruz escura no centro, devido à forma como a estrutura do grão interage com o sistema de polarizadores.

Para este tipo de observação, foram utilizadas as lâminas coradas pelo AT. Um par de filtros polarizadores foi adaptado ao microscópio de forma a obter a extinção total da luz, quando os eixos óticos dos polarizadores estivessem perpendiculares.

Impregnação com Iodo/Iodeto de potássio

Esta impregnação é tipicamente utilizada para a observação de grãos de amido, que se apresentam negros nesta coloração. O xiloglucano, nesta técnica, apresenta uma coloração azulada.

Para a observação do xiloglucano de reserva foi utilizada a impregnação por Iodo/Iodeto de potássio. O corte foi imerso em uma solução de Iodo metálico 1% (p/v)/Iodeto de potássio 1% (p/v), coberto com uma lamínula, observado e fotografado imediatamente.

Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.)

Como forma de corar polissacarídeos neutros, foi utilizado o método de oxidação com ácido periódico e coloração com reagente de Schiff. Os cortes foram cobertos com uma solução de ácido periódico 0,5%, recém preparada, por 10 minutos. Em seguida foram lavados com água destilada, secos ao ar e cobertos com reativo de Schiff (Lillie, 1954) por 8 minutos no escuro. Após a coloração os cortes foram submetidos a 3 banhos sucessivos de 3 minutos em água sulfurosa recém preparada (18 partes de água, 1 parte de HCl 1M e 1 parte de metabissulfito de sódio 10%), seguidos de uma desidratação em série etanólica, banho em xilol e montagem em resina Eukitt (Cortelazzo, 1992).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação da superfície das paredes celulares, alguns blocos de cotilédones que já haviam sido observados em microscopia ótica foram desparafinizados em 2 banhos de 24 horas em xilol, reidratados em série etanólica e armazenados em etanol 70%. Em seguida os blocos foram transferidos para etanol absoluto e este foi substituído por CO₂ líquido que foi evaporado por ponto crítico. Os blocos foram metalizados e observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL jsm-T3000) utilizando 10KV de aceleração dos elétrons.

Extração e análise de carboidratos

Padronização das extração dos carboidratos

As sementes congeladas para as análises bioquímicas foram separadas em dois lotes: uma parte foi homogeneizada em tampão para a determinação de atividades enzimáticas e a outra parte foi pesada, seca a 80 °C com circulação de ar por 48 horas, moída em um moinho de facas com uma peneira de 20 mesh e pesada. Foi verificado inicialmente que havia necessidade de extrair a testa das sementes, pois a presença de pó de testa no material levava a artefatos de dosagem dos carboidratos. Diante disto, os dados relativos às dosagens dos dois primeiros dias (0 e 5 dias) serão ignoradas. A partir de 10 dias após semeadura a testa das sementes pôde ser separada manualmente, o que possibilitou o cálculo dos teores de carboidratos nos cotilédones.

A otimização do tempo de extração com água foi feita em um ensaio piloto em tubos eppendorf de 2,0 ml. Em cinco tubos foram colocados 100 mg de pó de cotilédones e cada um foi submetido a duas extrações com etanol 80% a 80 °C (1 e 0,5 ml, respectivamente) seguidas de centrifugação a 7800g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado restante foi seco ao ar. Em seguida, cada tubo foi submetido a cinco extrações em água destilada (1 ml na primeira extração e 0,75 ml nas demais) a 80 °C por tempos diferentes (15, 40, 100, 180 e 250 minutos). Após cada extração o tubo foi centrifugado (7800 g, 2 minutos) e o

sobrenadante coletado individualmente. A concentração de açúcar total para cada extração (1^a a 5^a) em cada tempo de extração (15, 40, 100, 180 e 250 minutos) foi obtida pelo método fenol-sulfúrico (item “dosagem de açúcar total”) (figura 7).

Podemos ver na figura 7 que entre as extrações de 15 minutos realizadas, a 4^a foi a extração com melhor rendimento, enquanto nas extrações de 40 minutos, a 2^a extração foi a de melhor rendimento. Nas demais extrações, aquela com melhor rendimento foi a primeira. Para as extrações subsequentes do trabalho, foi escolhido o tempo de 180 minutos, pois com isso obteríamos o melhor rendimento de polissacarídeo no menor tempo possível.

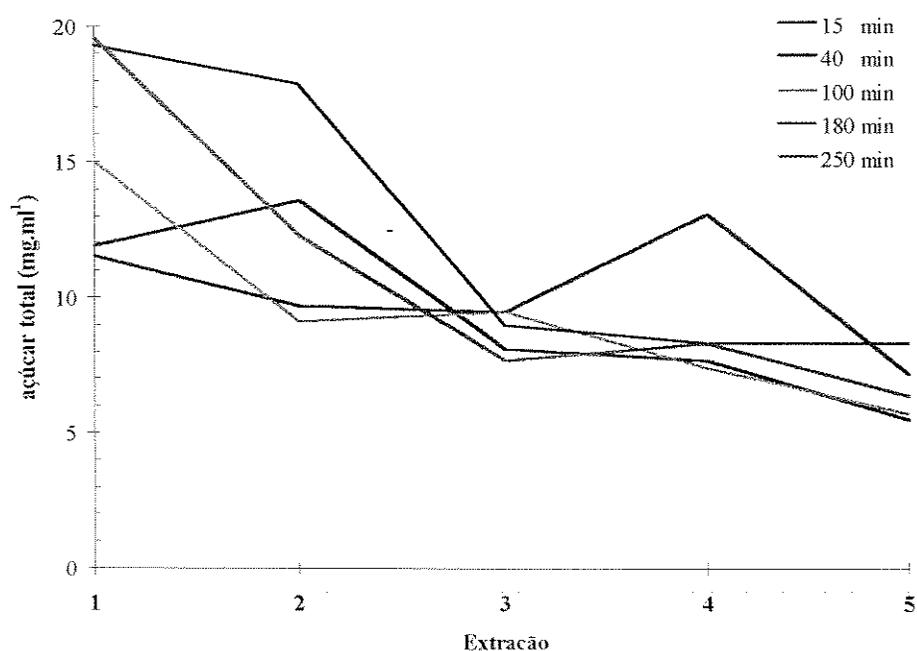


Figura 7: concentração de polissacarídeos solúveis em água no sobrenadante das cinco extrações em água a 80 °C. Foram testados 5 tempos diferentes de extração (15, 40, 100, 180 e 250 minutos).

Extração dos carboidratos

A extração dos carboidratos foi feita em tubos eppendorf de 2 ml onde foram colocados 100 mg de pó de cotilédones e 750 μ l de etanol 80%. A extração foi feita a 80 °C por 10 minutos com agitação eventual. Após a incubação o tubo foi centrifugado a 7800g por 3 minutos e o sobrenadante foi coletado. Mais 500 μ l de

etanol 80% foram adicionados ao material insolúvel e a extração foi repetida outras 3 vezes perfazendo um total de 4 extrações de 10 minutos cada a 80 °C em etanol 80%. Os sobrenadantes das extrações foram unidos e secos a baixa pressão com centrifugação (Spedvac-Hetovac VR1-HETO), ressolubilizados em 500 µl de água destilada e centrifugados a 7800g por 10 minutos. O material insolúvel foi separado do sobrenadante, que continha carboidratos de baixo peso molecular (mono e oligossacarídeos).

O material insolúvel em etanol foi liofilizado e as extrações foram repetidas utilizando água destilada. Na primeira extração foram adicionados 1,5 ml de água e o sistema foi incubado a 80 °C por 3 horas com agitações eventuais seguido de centrifugação a 7800g por 5 minutos. Nas 3 extrações subsequentes foram adicionados apenas 0,75 ml de água. O material assim obtido continha polissacarídeos facilmente extraíveis da parede (principalmente xiloglucano).

O material não extraível com água foi então submetido a 3 extrações com álcali (KOH 4 M, borohidreto de sódio 26mM por 3 horas à temperatura ambiente). Na primeira extração foi adicionado 1 ml de KOH+NaBH₄ e nas 2 extrações subsequentes foram adicionados apenas 750 µl. Após cada extração o tubo foi centrifugado a 13200g por 5 minutos e o sobrenadante coletado (ver esquema 3 para visualização geral das extrações e análises feitas).

Dosagem de açúcar total

A dosagem de açúcar total foi feita pelo método Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956). Em um tubo de vidro foram colocados uma alíquota da amostra a ser dosada e água para um volume final de 0,5 ml, 0,5 ml de fenol (5 % em água) e 2,5 ml de ácido sulfúrico PA, nessa ordem, com homogeneização vigorosa após a adição de cada solução. O sistema foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos antes da leitura da absorbância a 490 nm. A quantificação de açúcar foi feita comparando os valores obtidos com os de uma curva padrão de glucose de 25 a 75 µg.

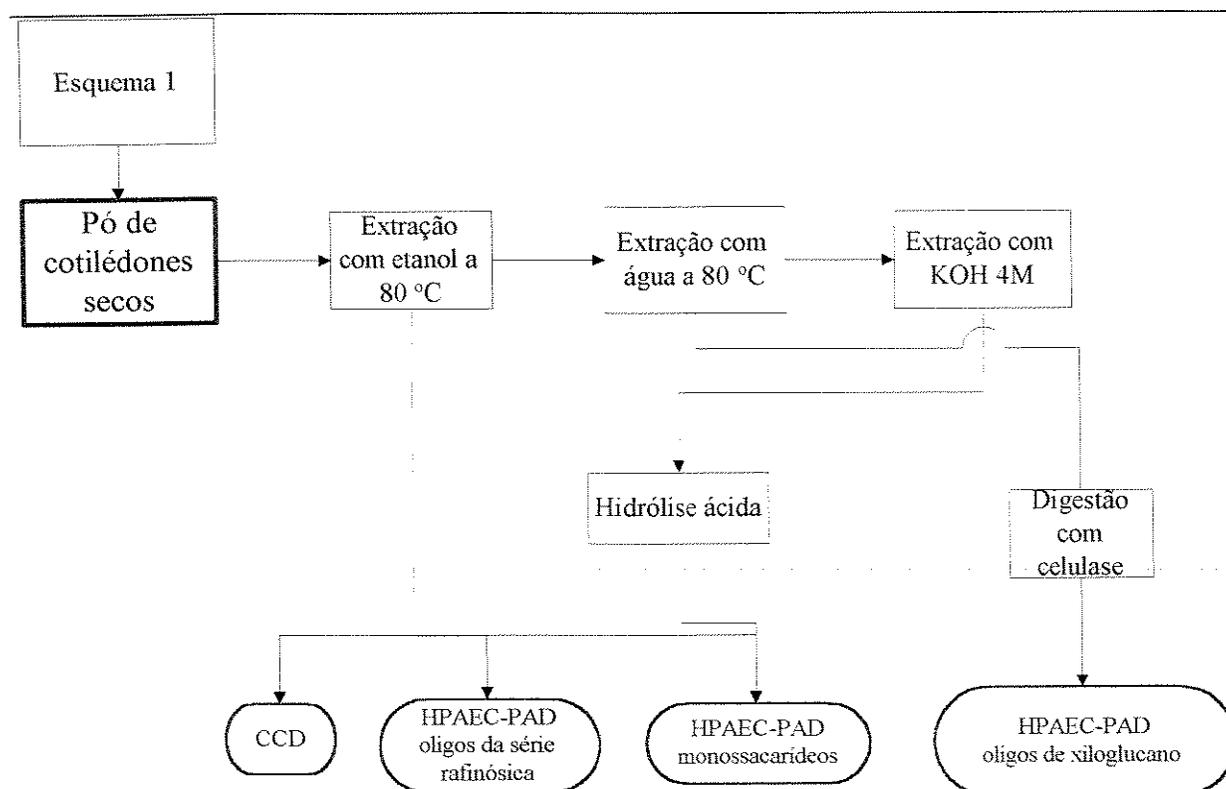
Dosagem de açúcar redutor

A dosagem de açúcar redutor foi feita segundo Somogyi (1945). Em um tubo de vidro foram colocados água e uma alíquota da amostra a ser dosada com um

volume total de 1 ml, 1 ml da solução de Somogyi (9 partes de solução B e 1 parte de solução A misturadas previamente³) e o sistema foi incubado a 100 °C por 15 minutos. Após o resfriamento foram adicionados 1 ml de solução de Nelson⁴ e 2 ml de água e foi feita a leitura da absorbância a 520 nm. A concentração de açúcar foi obtida pela comparação com um padrão de glucose de 25 a 75 µg.

Análise por cromatografia em camada delgada

Os oligossacarídeos presentes na fração de material solúvel em etanol foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Para estes oligossacarídeos, placas de sílica gel F60 (Schleicher e Schuell) foram cortadas



Esquema 3: extrações e análises realizadas em cada fração dos carboidratos presentes em cotilédones de *H. courbaril*. A caixa inicial se refere à origem do material aqui analisado.

³ A- CuSO₄.5H₂O 10% em água

B-28g de Fosfato de Na⁺ bibásico em 700 ml de água, 40g de Tartarato duplo de Na⁺ e K⁺, 100 ml de NaOH 1N e 120g de Sulfato de Na⁺ anidro. Corrigir com água o volume para 900 ml.

⁴ 25g de [NH₄⁺]₆ Mo₇ O₂₁.4H₂O em 450 ml de água, 21 ml de H₂SO₄ concentrado aos quais são adicionados 3g de NaHAsO₄.7H₂O em 25 ml de água.

em tamanhos adequados (cerca de 10 cm de altura e uma largura que permitisse a aplicação das amostras, com 5 mm de distância entre os pontos de aplicação das amostras e 7 mm das bordas para a primeira e última amostras). Após a dosagem de açúcar total nas frações de material solúvel em etanol, foi aplicado na placa de CCD o equivalente ao que seria extraído de uma porcentagem fixa de um cotilédone. Neste caso, a aplicação na placa de uma quantidade de carboidrato que seria extraída de 0,0118 % de apenas um cotilédone daria uma quantidade de açúcar total da ordem de 20 μg , o que seria adequado ao sistema utilizado. Foram realizadas duas corridas ascendentes na placa com butanol-1: ácido acético: água (2:1:1) e a revelação foi feita aspergindo sobre a placa ácido sulfúrico 5 % em etanol e aquecendo a placa a 110 °C.

Análises por HPAEC

Os monossacarídeos e oligossacarídeos presentes nas frações de material solúvel em etanol foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance (High Performance Anion Exchange Chromatography-HPAEC) AS500 (Dionex-Sunnyvale, CA) com coluna CARBOPAC PA1 associada à detecção por pulso amperométrico (PAD). Para monossacarídeos o programa utilizado foi uma eluição isocrática em NaOH 23 mM ($0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) por 20 minutos seguida de recuperação da coluna com NaOH 500 mM por 5 minutos e estabilização com NaOH 23 mM por 5 minutos. Para oligossacarídeos da série refinósica foi utilizada uma eluição isocrática com NaOH 150 mM ($1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) por 20 minutos seguido de NaOH 500 mM por 5 minutos e estabilização com NaOH 150 mM por 5 minutos. Em ambos os casos a coleta de dados para o cromatograma foi feita apenas nos primeiros 20 minutos. Tanto para os oligossacarídeos da série refinósica quanto para os monossacarídeos, a área dos picos obtidos foi corrigida em função da sensibilidade do detector para cada açúcar.

Para oligossacarídeos de xiloglucano, foi feita uma eluição com um gradiente linear de acetato de sódio 500 mM de 15 a 23,3% em uma concentração

constante de NaOH 150 mM⁵ por 40 minutos (1ml.min⁻¹). Em seguida a coluna foi recuperada com 100% de NaOH 150 mM por 2 minutos e estabilização do sistema com o eluente inicial por 5 minutos. Os dados do cromatograma foram coletados durante 40 minutos.

Preparo dos extratos enzimáticos

As sementes coletadas foram picadas com um bisturi e os fragmentos de cerca de 5 mm de lado foram misturados para que a amostra representasse uma média dos 3 cotilédones. Cada amostra foi separada em 2 porções (como descrito no esquema 1): uma foi seca e utilizada na análise dos carboidratos e outra parte foi homogeneizada em tampão e utilizada na dosagem das atividades enzimáticas. Os fragmentos de cotilédones separados para a dosagem enzimática foram pesados e homogeneizados em um homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Alemanha) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 com 200 mM NaCl. O tampão foi adicionado até que a viscosidade do extrato fosse tal que pudéssemos pipetar com o mínimo de erro possível. O volume dos extratos foi medido e o extrato foi congelado a -20 °C.

Sementes com 0 e 5 dias após a semeadura, por não terem soltado a testa, foram quebradas em grandes fragmentos (cerca de 1,5 cm de lado). Alguns desses fragmentos foram secos junto com os demais enquanto os fragmentos restantes foram mantidos a 5°C por 24 horas submersos no tampão de preparo dos extratos. Após esse período, a testa foi retirada e os fragmentos de cotilédones processados como os demais.

Preparação de xiloglucano e obtenção de oligossacarídeos

Vinte sementes tiveram suas testas retiradas manualmente após serem fervidas por 6 horas. Os cotilédones foram isolados e homogeneizados em um liquidificador, gerando uma solução altamente viscosa à qual foi adicionado NaOH para uma concentração final de 1M em excesso de borohidreto de sódio. Após a extração alcalina por 1 hora a 90 °C o material foi filtrado a vácuo em uma

⁵ 15% de acetato de Na⁺ 500 mM e 85 % de NaOH 150 mM, até 23,3% de acetato de sódio 500 mM (em NaOH 150 mM) e 76,7% de NaOH 150 mM por 40 minutos (1 ml.min⁻¹).

membrana de nylon e o filtrado foi precipitado a 5 °C com 3 volumes de uma solução de etanol: ác. acético (10:1).

O precipitado foi coletado por filtração a vácuo e lavado seqüencialmente com etanol 70 %, etanol 93% e acetona. Após a evaporação da acetona, o precipitado foi ressolubilizado em água destilada, gerando uma solução altamente viscosa que foi liofilizada. A partir deste material liofilizado foi feita uma solução 1,2 % para ser utilizada no ensaio de XET (ver item “determinação da atividade de endo- β -glucanase”) e na produção de oligossacarídeos.

Na preparação de oligossacarídeos foram utilizados 13 ml da solução de xiloglucano 1,2 % (p/v), 1 ml de tampão acetato de amônio 1M pH 5 e 50 μ l de celulase pura (Megazyme). O sistema foi incubado “overnight” a 30 °C. Ao final da incubação foram adicionados 3 volumes de etanol absoluto para a precipitação do material não digerido e o sistema foi centrifugado a 12000g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, seco sob centrifugação a baixa pressão em Speed-Vac e o material hidrolisado foi ressuspendido em água destilada e a concentração de açúcar dosada pelo método Fenol-Sulfúrico. Após a dosagem, a concentração foi corrigida com água para uma concentração final de 20 mg.ml⁻¹.

Determinação da atividade de β -glucosidase

A fim de determinar o melhor pH para dosagem da atividade enzimática, foi feita uma curva de atividade em diferentes pHs de 2,6 a 7,6. Para este ensaio, foi preparada uma solução de ácido cítrico e fostato de sódio bibásico (500 mM cada) à qual HCl ou NaOH foi adicionado até que o pH desejado fosse atingido, quando então uma alíquota de 1 ml era coletada e congelada para os ensaios. Ao restante da solução foi adicionado mais ácido ou base até que o próximo pH fosse atingido.

As condições do ensaio para atividade de β -glucosidase foram: 10 μ l de tampão no pH desejado, 10 μ l de extrato enzimático e 10 μ l de substrato (para nitro fenil- β -D-glucopiranosídeo 50 mM- pNP- β -glc). Após 15 minutos a 40 °C, a reação foi interrompida com a adição de 1 ml de carbonato de sódio 0,1 N e a absorbância determinada a 405 nm. Pela curva de pH obtida (figura 8) o pH escolhido para os demais ensaios enzimáticos foi 5,0, embora um aumento de

atividade em pH próximo a 3 sugerisse a presença de uma outra enzima com um ótimo de atividade em ambiente ácido.

Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram feitos em tubos eppendorf onde foram colocados 10 μ l de tampão acetato de amônio 1M pH5, 10 μ l de pNP- β -glucopiranosídeo 50 mM e 10 μ l de extrato enzimático. O ensaio foi realizado como descrito para o ensaio de pH.

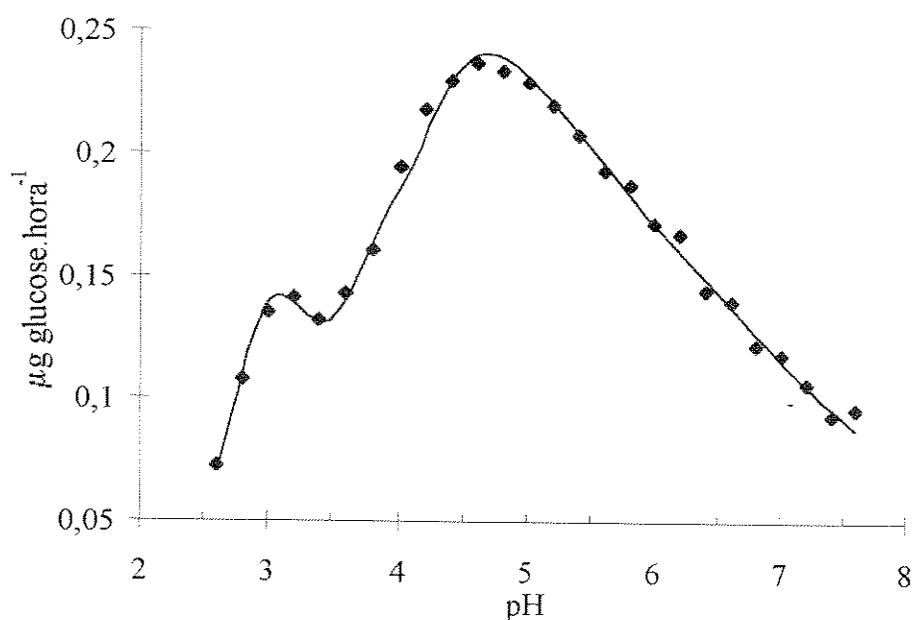


Figura 8: atividade de β -glucosidase em extrato bruto de cotilédones de *H. courbaril* sobre pNP- β -D-glucopiranosídeo em função do pH.

Uma vez que o coeficiente de extinção molar do pNP é conhecido (14400), sabendo a absorbância da solução pode-se facilmente determinar a concentração de pNP dividindo a absorbância pelo coeficiente de extinção molar. Como a relação pNP e glicose no substrato é 1:1, conhecida a concentração de pNP, a concentração de glicose livre seria a mesma. Dessa forma foi possível determinar a liberação de glicose no ensaio e, através de cálculos matemáticos simples, estimar a atividade por cotilédone.

Determinação da atividade de α -xilosidase

Segundo Fanutti e colaboradores (1991), a α -xilosidase atua apenas sobre oligossacarídeos de xiloglucano, e não sobre substratos sintéticos ou

polissacarídeo. Neste trabalho, foi utilizada como substrato uma solução de oligossacarídeos de xiloglucano de jatobá. Os oligossacarídeos de xiloglucano utilizados foram obtidos como descrito anteriormente.

Também para a atividade de α -xilosidase foi feita uma curva de pH com o tampão citrato-fosfato descrito anteriormente (figura 9). O extrato apresentou uma maior atividade de α -xilosidase na faixa de pH de 4 a 5. Com isso, decidimos realizar o ensaio desta enzima em pH 5, nas condições descritas a seguir.

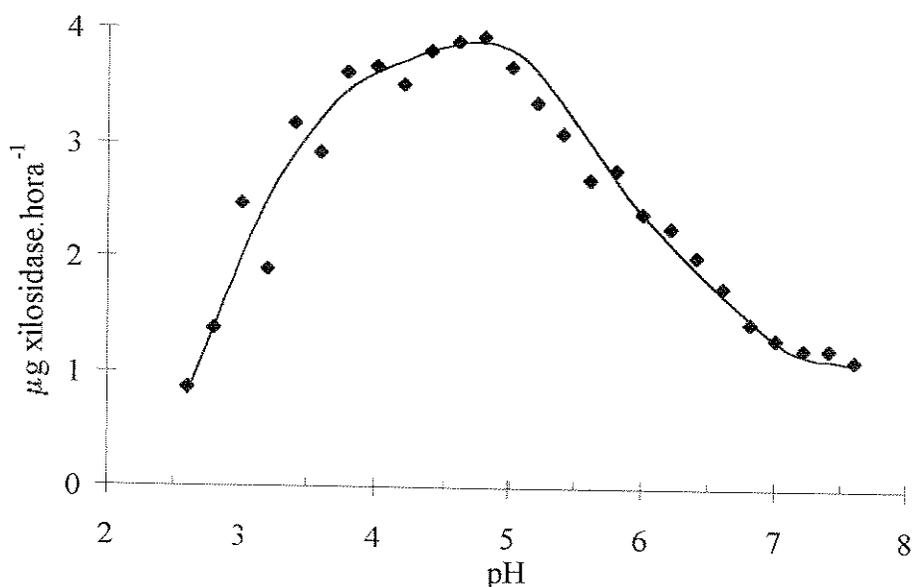


Figura 9: atividade de α -xilosidase em extrato bruto de cotilédones de *H. courbaril* sobre oligossacarídeos de xiloglucano em função do pH.

A atividade de α -xilosidase foi determinada pela liberação de pentoses livres, de acordo com Roe e Rice (1948): em um tubo eppendorf com 25 μ l de tampão acetato de amônio 1M pH 5, foram adicionados 20 μ l da solução de oligossacarídeo de xiloglucano (20 mg.ml⁻¹) e 20 μ l de extrato enzimático. O sistema de reação foi incubado a 30 °C por 24 horas. O conteúdo do tubo foi separado em 2 aliquotas de 30 μ l em tubos de vidro contendo 970 μ l de água destilada. A cada um desses dois tubos foram adicionados 5 ml de uma solução de *p*-Bromoanilina (2% em ácido acético saturado com tiouréia). Um dos tubos foi aquecido a 70 °C por 10 minutos enquanto o outro foi mantido à temperatura ambiente no escuro. Ambos os tubos foram, então, incubados a 30 °C por 1 hora e foi feita a leitura da absorbância a 520 nm, sendo o tubo que não foi incubado a 70 °C utilizado como branco.

Para a determinação da concentração de xilose foi feita uma curva padrão de 20 a 40 μg .

Determinação da atividade de endo- β -glucanase

Como as soluções de polissacarídeos de sementes, em geral, são muito viscosas, é comum que a atividade de "endo-hidrolases" seja determinada por ensaio viscosimétrico. A atividade de hidrólise nos pontos internos da cadeia principal provoca uma redução exponencial do tamanho médio das moléculas, o que acarreta uma redução na viscosidade da solução. Com isso, é possível detectar a atividade de "endo-hidrolases" através do acompanhamento da viscosidade de uma solução onde esteja ocorrendo a reação. A atividade destas enzimas foi determinada como descrito a seguir.

Durante incubação a 30 °C, foi medido a cada 5 minutos (até 30 minutos) o tempo que 0,1 ml dos sistemas acima levava para escoar por uma pipeta de 0,2 ml. Após cada medição a pipeta foi lavada com água fervente e água à temperatura ambiente para evitar contaminações de extratos enzimáticos e esfriar a pipeta, respectivamente. A redução do tempo de escoamento do sistema pela pipeta é uma estimativa da viscosidade da solução e, sendo a viscosidade do sistema causada pela presença de moléculas de alto peso molecular, a redução deste tempo de escoamento foi tomada como uma medida quantitativa da atividade "endo-hidrolítica" do sistema sobre o polissacarídeo.

De posse dos dados de escoamento ao longo do período de incubação, foi aplicado o logaritmo decimal nos tempos de escoamento e traçada uma reta com abcissa (x) igual ao tempo de incubação e ordenada igual ao logaritmo decimal do tempo de escoamento (y). Nessa reta, quanto mais rápida for a queda do tempo de escoamento, maior seria a atividade "hidrolítica", ou seja, quanto maior o módulo do coeficiente angular da reta, maior seria a atividade enzimática (ver "Exemplo de cálculo de atividade de XET", a seguir).

A adição de oligossacarídeos ao sistema de reação mostrou-se uma condição necessária à queda de viscosidade em vários extratos. Diante disto, foi feito um experimento para determinar a quantidade de oligossacarídeos a ser utilizada nos ensaios.

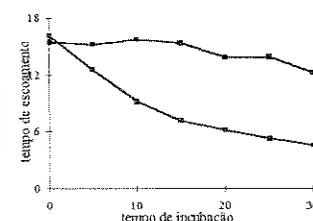
Exemplo de cálculo de atividade de XET

Tempo de escoamento (em segundos) de 0,1 ml pela pipeta para dois sistemas com quantidades diferentes de oligossacarídeos ao longo do tempo de incubação (a 30 °C):

TI ¹ (min)	0	5	10	15	20	25	30
0 µg ²	15,51	15,29	15,78	15,41	13,96	13,98	12,29
100 µg	16,15	12,57	9,23	7,20	6,24	5,31	4,56

¹ Tempo de incubação.

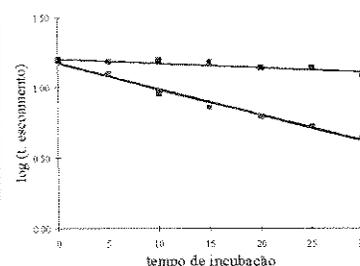
² Massa de oligossacarídeos de xiloglucano.



Transformação logarítmica para os tempos de escoamento da tabela acima:

TI ¹ (min)	0	5	10	15	20	25	30
0 µg	1,19	1,18	1,20	1,19	1,14	1,15	1,09
100 µg	1,21	1,10	0,97	0,86	0,80	0,73	0,66

¹Tempo de incubação.



Retas ajustadas à transformação logarítmica do tempo de escoamento:

$$0 \mu\text{g} \rightarrow -0,0096x + 1,215$$

$$100 \mu\text{g} \rightarrow -0,0183x + 1,1786$$

Como esperado, o coeficiente angular da reta é negativo, uma vez que o tempo de escoamento cai à medida que o tempo de incubação passa. Multiplicando o coeficiente angular por -100 (para termos um valor próximo à unidade) obtemos um valor arbitrário para a atividade enzimática: **0,31** para o ensaio com 0 µg (controle sem oligossacarídeos) e **1,83** para o ensaio com 100 µg de oligossacarídeos.

A curva de atividade de XET em função da concentração de oligossacarídeos foi feita a partir da solução de oligossacarídeos 20 mg.ml⁻¹ (item "Preparo de xiloglucano e obtenção de oligossacarídeos"). Para cada ensaio foram adicionados: 400µl de xiloglucano de jatobá 1,2%; 50 µl de extrato enzimático bruto; tampão (acetato de Na⁺ 1M, pH 5) e oligossacarídeos em um volume total de 70 µl. Foram utilizados para a curva 0, 10; 20; 50; 100, 200, 400 e 800 µg de oligossacarídeos. Como a solução de oligossacarídeos é uma mistura de oligômeros de diferentes tamanhos e em proporções indeterminadas, não foi possível fazer a conversão de massa para concentração molar (figura 10).

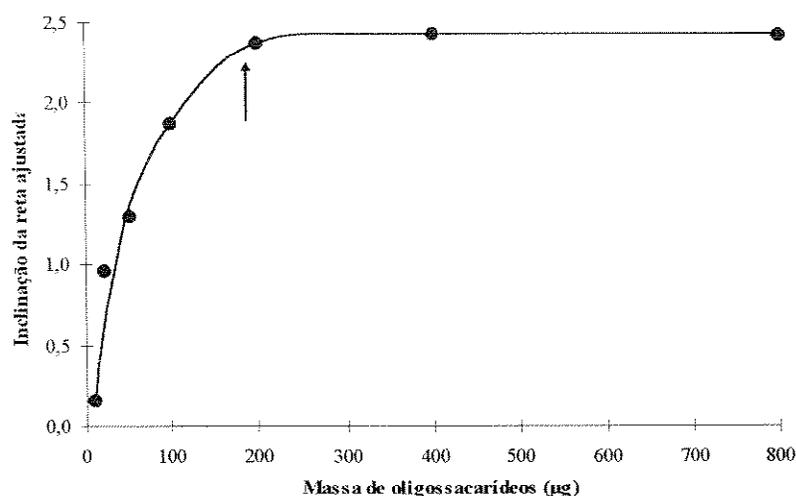


Figura 10: atividade de XET em função da concentração inicial de oligossacarídeos. A seta indica a massa de oligossacarídeos utilizada nos ensaios subsequentes.

Para detectar a falsa atividade de XET devido à diluição do ensaio com água, foi preparado em todas as demais dosagens de atividade enzimática um tubo branco onde a enzima havia sido fervida. Nos ensaios com os extratos de cotilédones, desconsideramos as quedas no tempo de escoamento inferiores a metade do tempo inicial, ou seja, caso o tempo de escoamento de um dado ensaio não caísse à metade após 30 minutos, o extrato era considerado sem atividade.

Assim como para as demais enzimas, foi feita uma curva para determinar o pH no qual o ensaio deveria ser feito (figura 11). Para a curva de pH, assim como na determinação da atividade de “endo-hidrolase” de xiloglucano, foram incubados a 30 °C os seguintes sistemas de reação:

	XG 1.2% (µl)	oligo ¹ (µl)	extrato bruto (µl)	tampão ² (µl)
Branco	400	—	50 ³	60
s/oligo	400	—	50	60
c/oligo	400	10	50	50

¹ solução de oligossacarídeos de xiloglucano 20 mg.ml⁻¹.

² citrato-fostato 500mM cada, no pH desejado, ou tampão acetato de amônio 1M pH 5 para os ensaios de determinação da atividade enzimática.

³ extrato fervido por 5 minutos.

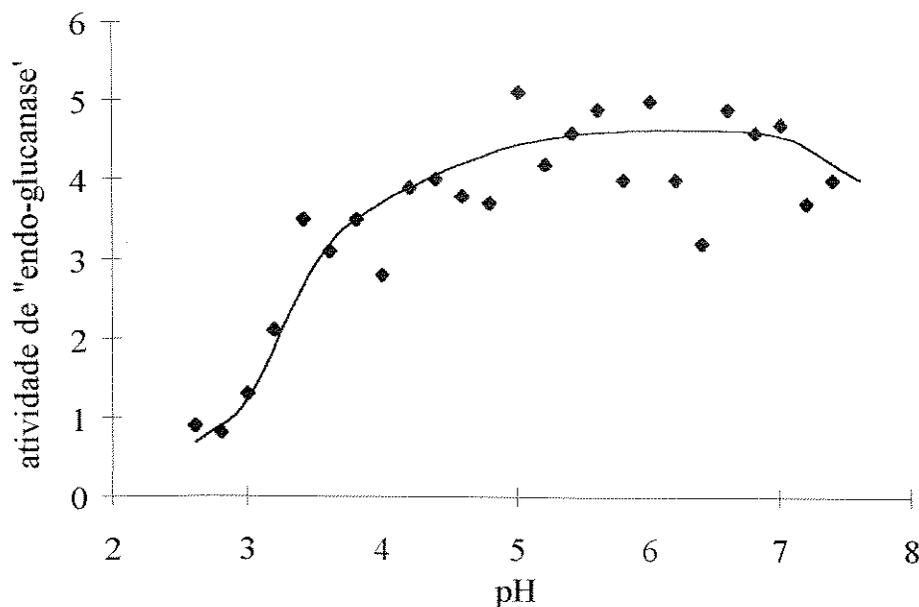


Figura 11: atividade (unidades arbitrárias*100) de XET em extrato bruto de cotilédones de *H. courbaril* sobre xiloglucano em função do pH.

Como a atividade de "endo-hidrolase" apresentou-se pouco sensível às variações de pH na faixa de 4,5 a 7 (figura 11), o pH escolhido para as dosagens nos extratos foi 5,0, com o mesmo tampão que foi utilizado para a determinação da atividade das outras enzimas.

Determinação da atividade de β -galactosidase

A determinação da atividade desta enzima no extrato bruto foi feita de forma semelhante à da atividade de β -glucosidase. A única diferença foi o uso de pNP- β -galactopiranosídeo (Sigma) como substrato.

A β -galactosidase mostrou alta atividade em pHs bastante baixos (figura 12), estando o pH ótimo em torno de 3,5. Diante desta diferença entre os pHs ótimos da β -galactosidase e das outras enzimas (figuras 8, 9 e 11), as medições de atividade de β -galactosidase foram feitas em 2 pHs: 3,5 e 5,0.

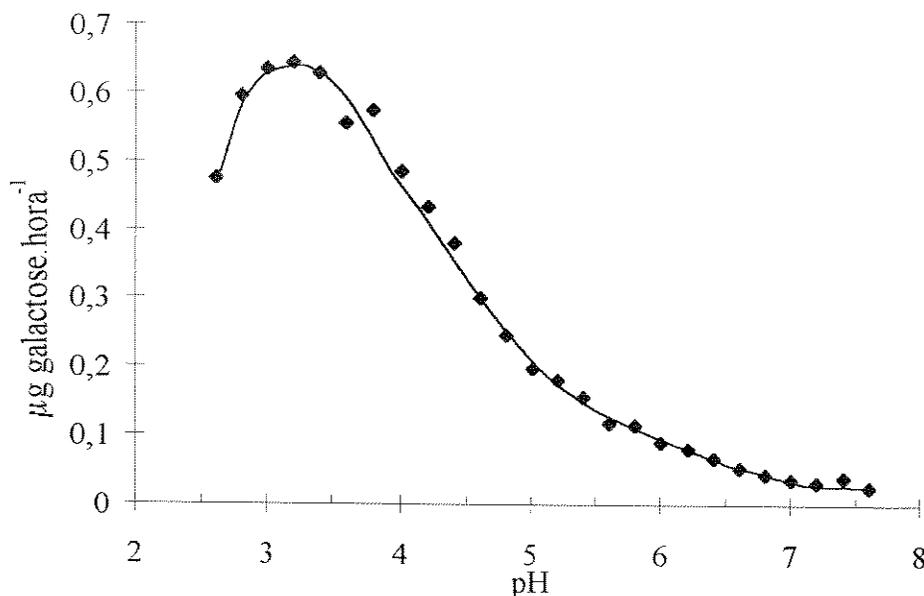


Figura 12: atividade de β -galactosidase em extrato bruto de cotilédones de *H. courbaril* sobre pNP- β -D-galactopiranosídeo em função do pH.

Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi feita com o Kit de dosagem de proteína pelo método Bradford (BioRad, Califórnia) para microensaios (dosagens de extratos com menos de $25\mu\text{g.ml}^{-1}$ de proteína) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteína foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina.

Análise do polissacarídeo

Hidrólise ácida

A análise da composição de monossacarídeos presentes nos polissacarídeos extraídos com água e KOH ao longo da mobilização das reservas de xiloglucano foi feita através da hidrólise ácida do polissacarídeo e análise da composição de monossacarídeos por HPAEC-PAD (ver "Análises por HPAEC"). Após a dosagem de açúcar total das frações de material solúvel em água, um volume que contivesse o equivalente a 5 mg de glucose de cada fração foi

liofilizado e o material seco foi transferido para tubos cônicos de vidro. Este material foi incubado a 30 °C em 100µl de ácido sulfúrico com maceração eventual com um bastão de vidro até que todo o polissacarídeo estivesse dissolvido, quando, então, era adicionado 1,7 ml de água destilada, o que diluía o ácido para 4%. Em seguida o sistema foi coberto com uma esfera de vidro e autoclavado por 1 hora a 120 °C. Após a hidrólise, o material hidrolisado foi neutralizado com carbonato de bário até pH 7. Três mililitros de água deionizada foram adicionados e o sistema foi centrifugado em tubos eppendorf. O sobrenadante foi aplicado em colunas com resinas DOWEX catiônica (50x80-200) e aniônica (1x8-50) em série para a deionização e as colunas foram lavadas com um volume de água deionizada igual a 5 vezes o volume de hidrolisado aplicado. Todo o material eluído das colunas foi liofilizado e ressuscitado em água deionizada para as análises por HPAEC-PAD.

Obtenção dos oligossacarídeos

Um volume correspondente a 100µl de polissacarídeo foi incubado a 30 °C por 24 horas com 10 µl de tampão acetato de amônio 0,1M pH 5 e 1 µl de celulase de *Trichoderma viride* (Megazyme). Após a digestão o polissacarídeo foi precipitado com 5 volumes de etanol absoluto, centrifugado a 13200g por 5 minutos. O sobrenadante liofilizado foi ressuscitado em 500 µl de água deionizada.

Resultados

Acompanhamento de partição de matéria

O acompanhamento de partição de matéria mostrou oscilações que sugerem a ocorrência de vários fenômenos distintos ao longo do período de observação (figura 13). No período de 0 a 10 dias após semeadura, a massa de matéria fresca aumenta. Como o mesmo não ocorreu com a determinação de massa de matéria seca, este aumento de massa deve ser decorrente da imbebição da semente. Em seguida ocorre uma queda nas massas de matéria fresca e seca até 20 dias após semeadura, supostamente devido à queda da testa das sementes. A massa do cotilédone passa, então, por um período de pouca alteração até 45 dias após semeadura. Somente a partir da germinação (35 dias) a massa do eixo embrionário começa a aumentar, com a concomitante redução da massa dos cotilédones (de 40 a 65 dias após semeadura). Ao final do processo, a soma da massa de matéria seca do eixo embrionário e dos cotilédones corresponde a apenas 39% da massa de matéria seca da semente quiescente.

Microscopia

Xylidine Ponceau

A coloração pelo XP mostrou a presença de corpos protéicos no interior das células (figura 14). Na semente quiescente, estes se apresentaram heterogêneos e com granulações no interior (figura 14A). Após a imbebição, houve um aumento no tamanho e uma redução no número de corpos protéicos, que se apresentaram mais homogêneos (figura 14B). Cerca de 40 dias após semeadura, as reservas de proteína já estão praticamente esgotadas (figura 14C), enquanto as reservas de xiloglucano na parede não apresentam alterações aparentes. Durante o período de mobilização das reservas protéicas (até 40 dias após semeadura), os fiexes vasculares apresentaram uma intensa reação a este corante.

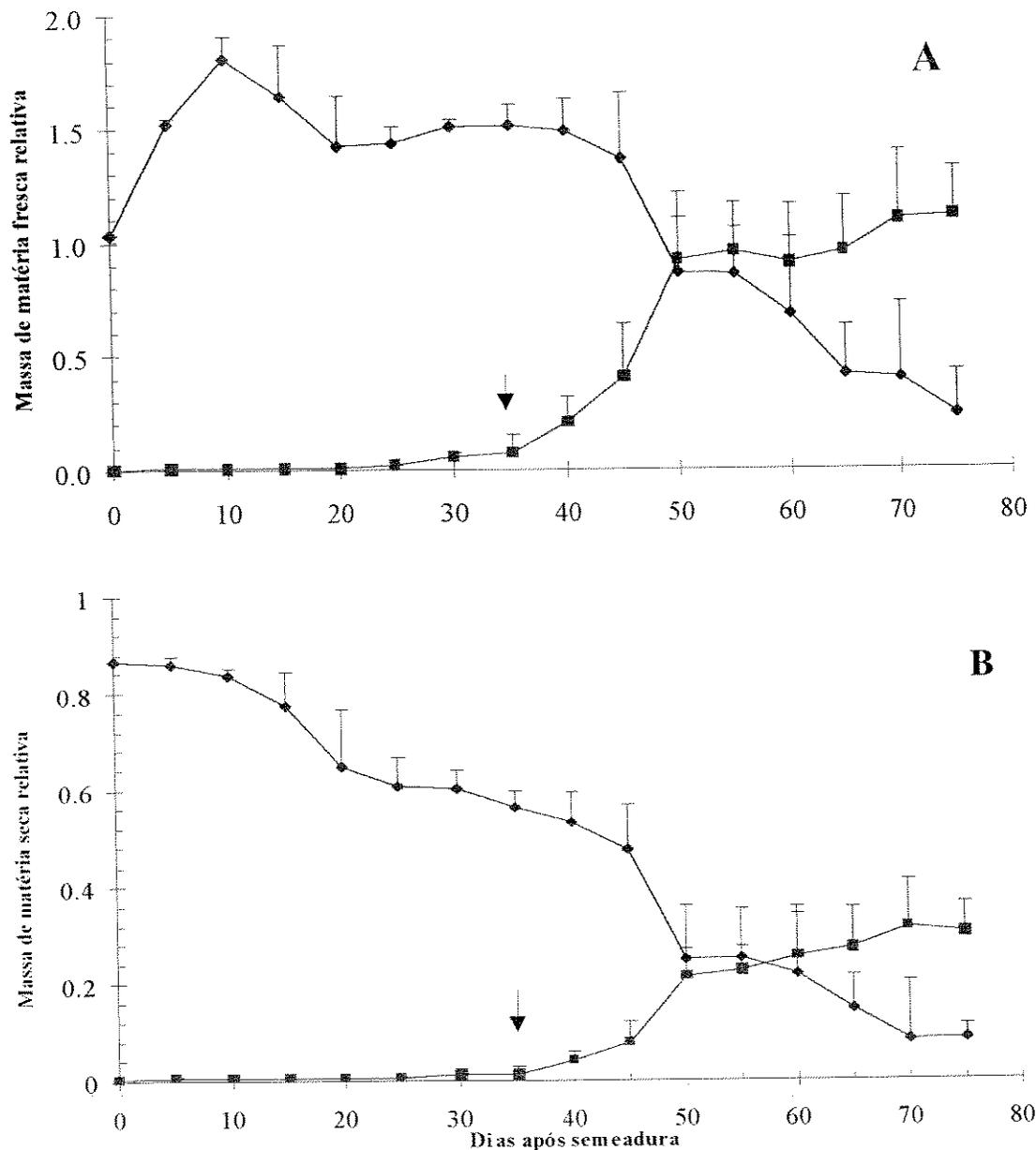
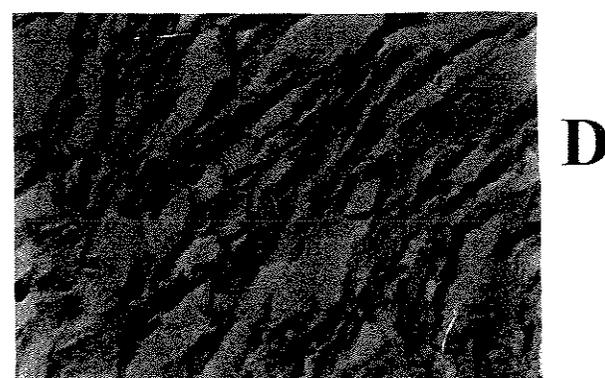
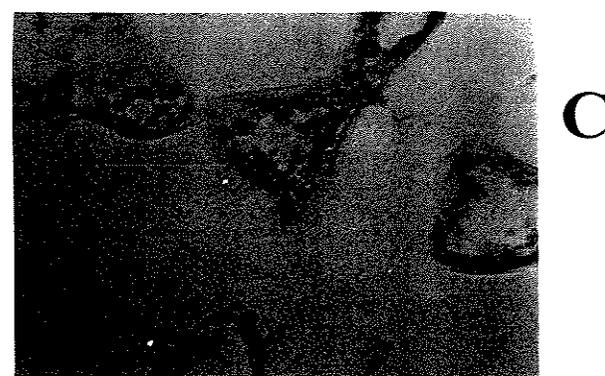
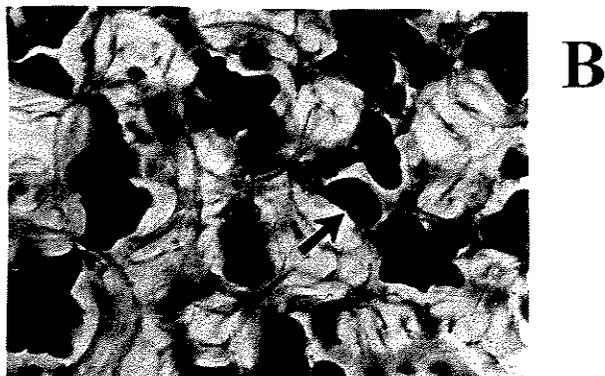


Figura 13: acompanhamento das massas de matéria fresca (A) e seca (B) dos cotilédones (◆) e eixo embrionário (■) de *H. courbaril*. Os dados estão expressos em massa relativa, ou seja, a massa da semente no momento da coleta ou após secagem a 80 °C (massa de matéria fresca e seca, respectivamente) dividido pela massa inicial da semente quiescente, o que elimina variações decorrentes e diferenças na massa inicial da semente. Cada ponto corresponde à média de 15 sementes (ou eixos) e as barras indicam o desvio padrão das medidas, exceto nos pontos onde os desvios são pequenos demais para serem mostrados. A seta indica a coleta a partir da qual a maioria das sementes havia germinado (35 dias). Uma cópia deste gráfico está reproduzida na orelha da dissertação para referências rápidas.

Figura 14: cortes de cotilédones de *H. courbaril* corados pelo XP (420x). Na semente quiescente (A) podemos observar corpos protéicos (➔) de conteúdo heterogêneo no citoplasma, que apresenta prolongamentos avançando em direção aos campos de perfurações primárias(⇔). Após a embebição (B), os corpos protéicos tornam-se maiores, menos numerosos e as granulações desaparecem. Após 40 dias de semeadura (C), as células do parênquima cotiledonar praticamente não apresentam corpos protéicos de reserva. Com esta coloração, foi possível observar o colapso do órgão senescente (D), com a desorganização geral dos tecidos.



Azul de Toluidina

Também nesta coloração foi possível observar as granulações nos corpos protéicos (Figura 15A). Na parede, apenas a região mais externa apresentou reação para este corante, provavelmente devido às pectinas da lamela média. As regiões de campos de perfurações primárias se apresentaram fortemente coradas, sugerindo que esta seja uma região rica em pectina e, portanto, uma região diferenciada da parede. O polissacarídeo da parede de reserva não foi corado por esta técnica, como esperado, pois o xiloglucano é um polissacarídeo neutro.

Cerca de 60 dias após a semeadura, as paredes se apresentam delgadas e as células já estão destituídas de qualquer material de reserva que possa ser observado pela microscopia ótica, embora as células preservem o seu formato e o seu tamanho (figura 15B). Com o passar do tempo, os tecidos se desorganizam (figura 15C).

Ácido periódico - Schiff (P.A.S.)

Nos estágios iniciais da mobilização das reservas, os resultados obtidos com esta coloração não foram satisfatórios (Figura 16A), havendo, aparentemente, solubilização do polissacarídeo corado, que se difundiu sobre o corte. Cerca de 40 dias após semeadura, a difusão de material corado foi menor, embora a parede celular ainda não esteja muito bem definida (figura 16B). Neste estágio foi possível observar a existência de protuberâncias P.A.S. positivas que se projetavam da parede em direção ao espaço intercelular, assim como a presença de grãos de amido no citoplasma, posteriormente confirmada pela microscopia de polarização.

Figura 15: cortes de cotilédones de *H. courbaril* corados pelo AT (420 x). Na semente quiescente (A) podemos observar as granulações nos corpos protéicos (→) e uma baixa afinidade da parede de reserva pelo corante. Nas regiões dos campos de perfurações primárias, no entanto, vemos o acúmulo de material ácido, possivelmente pectina (⇔). Em (B) pode-se ver as células dos cotilédones após a mobilização das reservas (60 dias após semeadura). As paredes se apresentam menos espessas, sendo que a região dos campos de perfuração primária continua como uma região diferenciada da parede. Quando o cotilédone está prestes a cair (C), os tecidos estão completamente desorganizados.

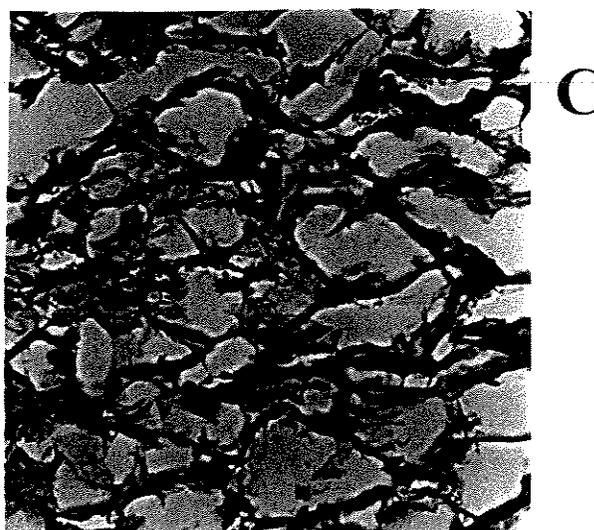
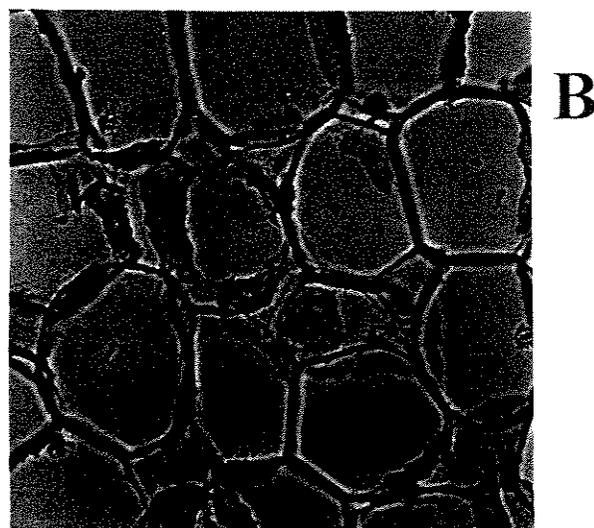
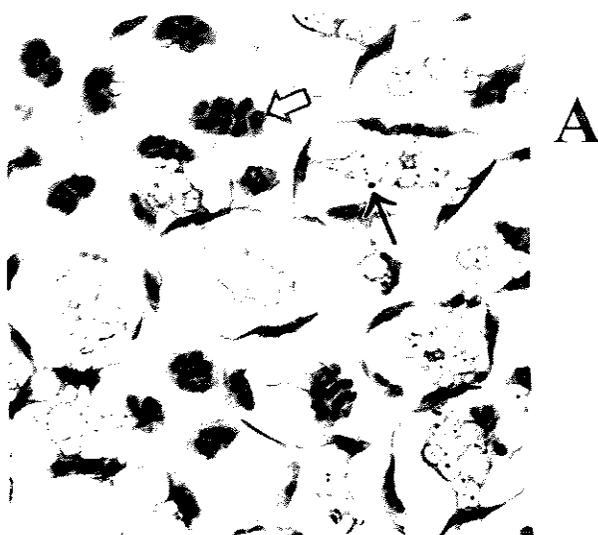


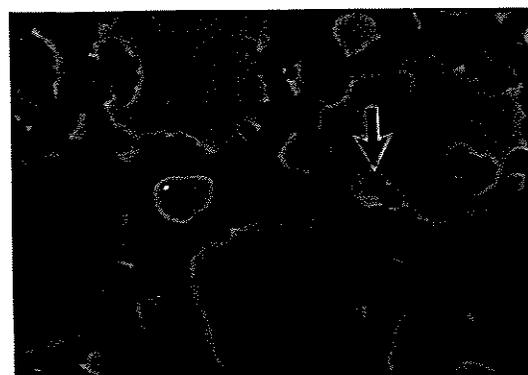
Figura 16: cortes de cotilédones de *H. courbaril* corados pelo método de P.A.S. (420x). Em sementes quiescentes o método não se mostrou satisfatório (A), devido à solubilização do material corado que se difundiu sobre o corte. Após 40 dias de semeadura (B) o método apresentou resultados melhores, sendo possível observar grãos de amido no citoplasma (→) e protuberâncias na parede (⇨). No detalhe vemos os grânulos citoplasmáticos em microscopia de polarização: os grânulos são birrefringentes e apresentam uma cruz escura típica de grãos de amido. Após a mobilização do polissacarídeo de parede (C), os grãos de amido (→) são degradados e o órgão senescente entra em colapso com a desorganização dos tecidos (D).



A



B



C



D

Os grãos de amido podem ser observados no interior das células ao longo de todo o processo de degradação do xiloglucano de parede (figura 16C). Ao final do processo de mobilização das reservas, as células dos cotilédones se degeneram e o tecido se desorganiza (figura 16D), o que já havia sido observado com a coloração com XP e AT. Neste momento, as células possuem paredes delgadas (possivelmente apenas a parede primária, sem o espessamento de reserva) e sem grãos de amido no citoplasma.

Impregnação com Iodo/Iodeto de potássio

Este se mostrou o melhor método de coloração para a visualização de xiloglucano de reserva. Na semente quiescente, as paredes mostraram uma coloração azul típica de xiloglucano, enquanto o citoplasma e os corpos protéicos coram-se em marrom (figura 17A). Este método corroborou a observação feita com o método P.A.S. a respeito do surgimento de grãos de amido no citoplasma por volta de 40 dias após semeadura (figura 17B), assim como a redução drástica dos espessamentos da parede por volta de 60 dias após semeadura (figura 17C).

As protuberâncias da parede vistas inicialmente pelo método P.A.S. também foram visualizadas com este método (figura 17B). A cor das protuberâncias é idêntica à do resto da parede, sugerindo a presença de xiloglucano nestas.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 18A, podemos observar uma célula de cotilédone de semente logo após a embebição. A célula apresenta corpos protéicos e paredes espessadas. O aspecto externo da parede é fibroso e, em corte transversal, a parede de reserva parece ser formada por camadas. Esta técnica, no entanto, não é a mais indicada para a observação da textura dos componentes celulares, devido às diversas etapas de fixação e desidratação pelas quais o material passou.

A seqüência de eventos durante a mobilização das reservas foi análoga à observada nas colorações anteriores. Primeiro os corpos protéicos se tornaram maiores e menos numerosos (figura 18 A) e, em seguida, ocorre a mobilização do xiloglucano de reserva, com o acúmulo de grãos de amido no interior das células e redução da espessura da parede (figura 18B). Após 60 dias da semeadura, as

células apresentaram uma parede delgada e citoplasma pobre em corpúsculos (figura 18C).

A visualização das protuberâncias em MEV permitiu compor uma seqüência de eventos que levariam à sua formação (figura 19), corroborando o mecanismo de formação segundo Potgieter e Wyk (1992): durante o afastamento das células (provocado pela acomodação do tecido durante a embebição ou durante a degradação da parede de reserva), alguns pontos da parede permaneceriam ligados (figura 19A). Com o aumento da distância, a coluna formada pela ligação da parede ficaria sob tensão (figura 19B) e arrebentaria (figura 19C), deixando na superfície da parede uma protuberância (figura 19D).

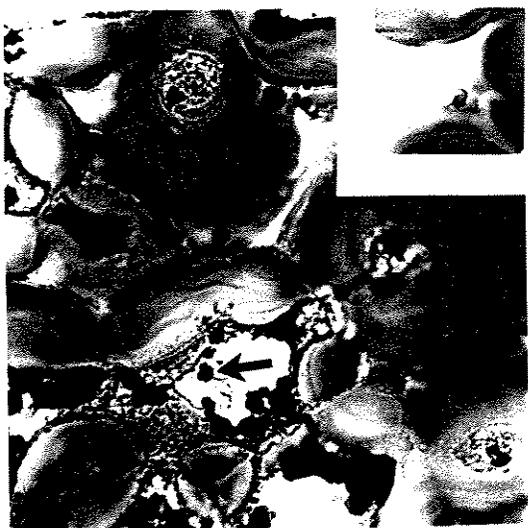
Microscopia de polarização

Na microscopia de polarização, os grânulos que aparecem no citoplasma das células do parênquima cotiledonar no período de 40 a 60 dias após a semeadura apresentaram-se birrefringentes com uma cruz escura no meio. Este padrão é típico de grãos de amido (figura 16B). Foi observado, também, o acúmulo de amido nas células da medula do eixo embrionário (figura 20).

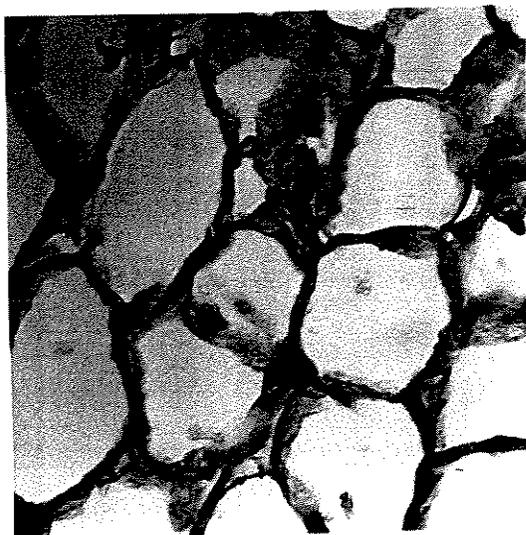
Figura 17: cortes de cotilédones de *H. courbaril* impregnados com Iodo/Iodeto de potássio (420x). Em sementes quiescentes (A) vemos o espessamento de xiloglucano de reserva (em azul) e corpos protéicos no citoplasma (marrom). Durante a mobilização do polissacarídeo (B) podemos observar grãos de amido no citoplasma (→). Foram observadas ainda, protuberâncias da parede que se projetavam no espaço intercelular (detalhe). Após 60 dias de semeadura (C), o espessamento de xiloglucano praticamente já havia sido esgotado e os grânulos de amido já não eram visíveis.



A

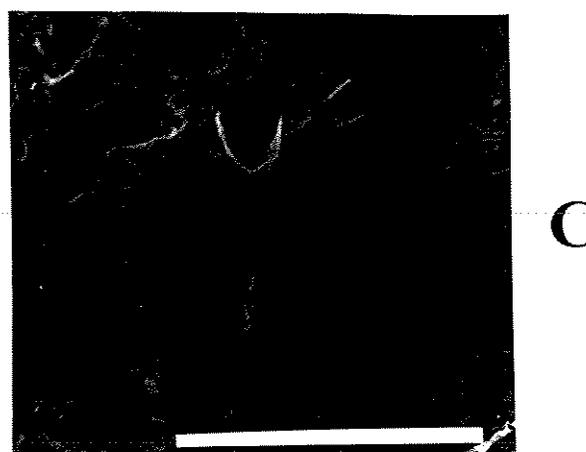
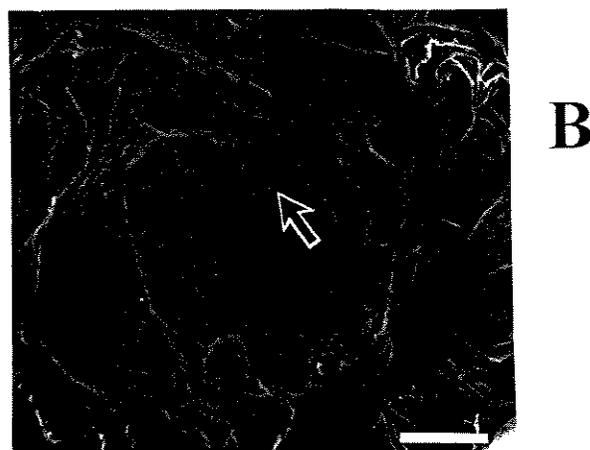
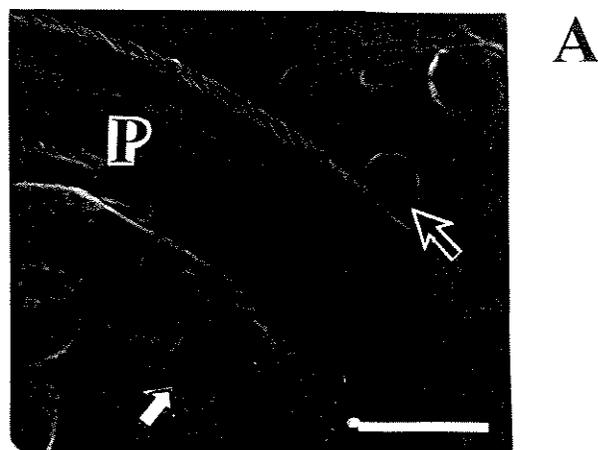


B



C

Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura de cotilédones de *H. courbaril* ao longo do processo de mobilização das reservas. (A) logo após a embebição podemos ver os corpos protéicos (\Rightarrow) e algumas protuberâncias (\rightarrow) no lado externo da parede (P). (B) após a mobilização dos corpos protéicos, o citoplasma se apresenta rico em grãos de amido (\rightarrow) e a parede tem a sua espessura reduzida. (C) após a mobilização das reservas, a célula apresenta paredes delgadas e citoplasma pobre em corpúsculos. Barra = 10 μ m



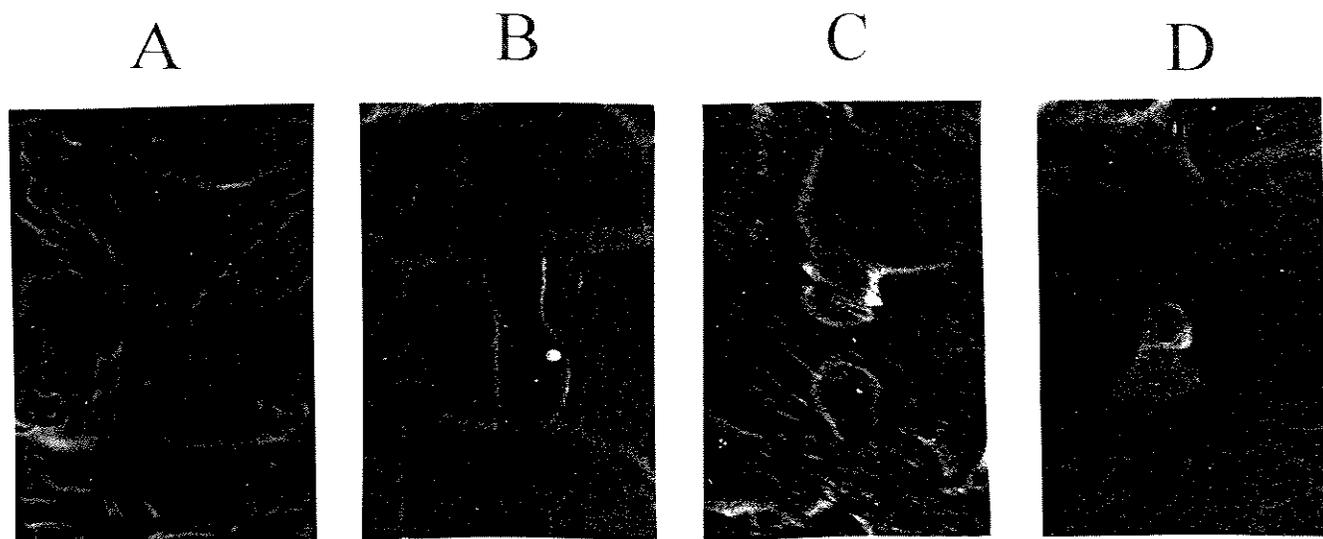


Figura 19: seqüência proposta para a formação das protuberâncias da parede. À medida que duas células se afastam, alguns pontos da parede permanecem unidos (A). Com o aumento da distância entre as células, a ligação vai sendo distendida (B) até se romper (C), deixando uma saliência na parede (D).

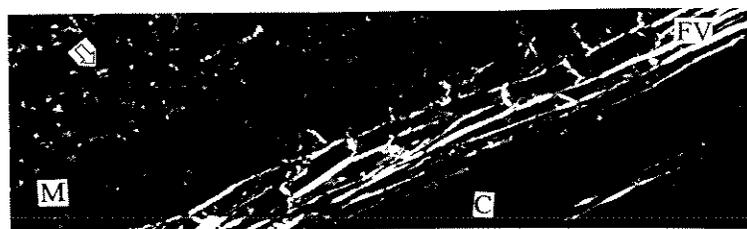


Figura 20: microscopia de polarização do eixo embrionário. No centro vemos as paredes birrefringentes dos feixes vasculares (FV), separando o com o córtex (C) da medula (M). À esquerda podemos observar o acúmulo de amido (\Rightarrow), o que não ocorre nas células do córtex (32x).

Extração e análise de carboidratos de baixo peso molecular

Extração de carboidratos

A quantificação de carboidratos extraíveis de cada cotilédone mostrou oscilações inesperadas, tanto na fração solúvel em etanol, quanto na fração solúvel em água.

Na fração solúvel em etanol (figura 21), a concentração de açúcar redutor foi cerca de 1000 vezes inferior à de açúcar total. A quantidade de açúcar total extraível de um cotilédone com etanol 80% mostrou uma tendência geral de queda ao longo do processo de mobilização das reservas, havendo um ligeiro aumento em torno de 30 dias após semeadura. As amostras de carboidratos com 0 e 5 dias após semeadura foram obtidas por um processo distinto das demais, devido à impossibilidade de separar a testa do resto da semente neste período, por isso, serão desconsiderados aqui os dados a respeito destes extratos. Após o aumento de 30 dias, a quantidade de açúcar presente nesta fração caiu gradativamente, porém de modo mais acentuado que antes de 30 dias.

Na estimativa de carboidrato extraível com água também foram observados dois picos: em 5 e em 40 dias após semeadura (figura 22). Cerca de 30 dias após semeadura, ocorreu um aumento de carboidrato solúvel em água, sendo o máximo de extração 40 dias após semeadura, seguido de uma queda no carboidrato solúvel em água no cotilédone. A estimativa de carboidrato extraível de um cotilédone com KOH (após a extração com água) também cai 40 dias após semeadura, acompanhando a queda de carboidrato extraível que ocorre no material extraível em água.

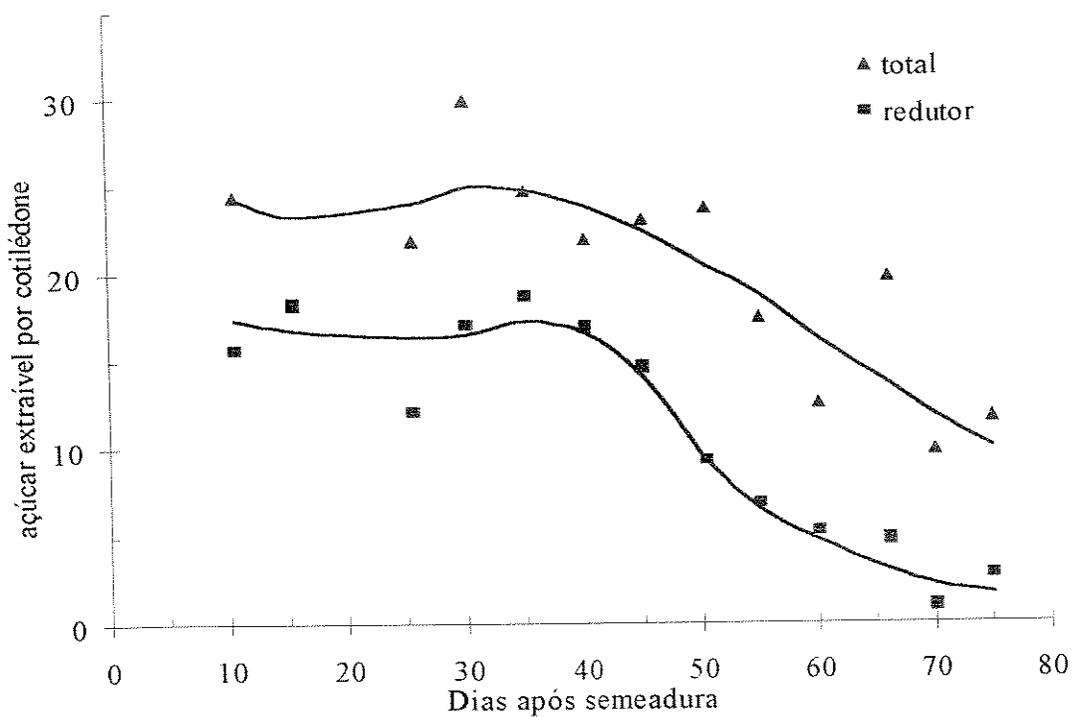


Figura 21: estimativa da massa de carboidrato total (em mg-▲) e reductor (em µg-■) extraível de cada cotilédone de *H. courbaril* com etanol 80% (em equivalentes de glucose).

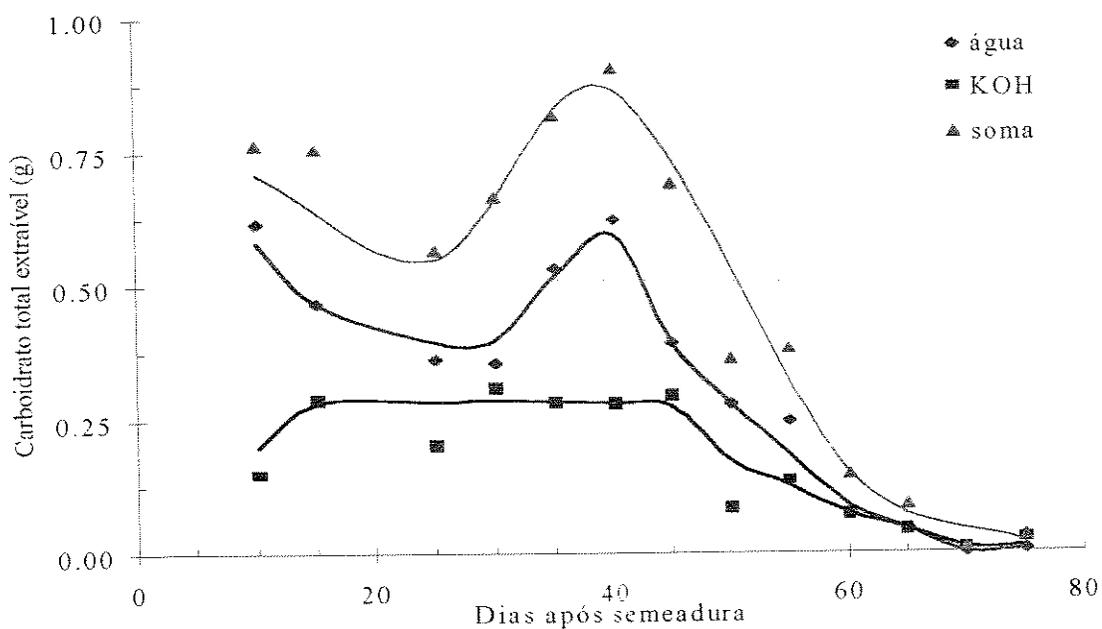


Figura 22: estimativa de carboidrato total extraível de um cotilédone com água (◆), KOH 4M (■) e a soma das duas (▲) ao longo do processo de mobilização das reservas.

Cromatografia em camada delgada

A análise dos açúcares presentes na fração solúvel em etanol por cromatografia em camada delgada mostrou a presença de oligossacarídeos da série rafínosica até 15 dias após semeadura (figura 23). A partir deste momento, o único oligossacarídeo detectado foi a sacarose.

Análise por cromatografia líquida de alta performance

A análise por cromatografia líquida de alta performance da fração de açúcares solúveis em etanol confirmou a presença de oligossacarídeos da série rafínosica (rafinose e estaquiose), assim como a sua queda nos primeiros dias após semeadura (figura 24). A queda da estaquiose foi mais acentuada do que a da rafinose. A sacarose foi o carboidrato mais encontrado em todas as frações até 40 dias após semeadura. Após este período, ocorreu um aumento brusco nos teores de glucose e frutose, sendo a glucose o principal carboidrato presente nas frações de material solúvel em etanol a partir de 40 dias após semeadura, mesmo havendo um declínio na sua quantidade a partir do aumento em 45 dias. Apesar de outros monossacarídeos terem sido identificados (galactose e arabinose, por exemplo), suas concentrações ficaram muito abaixo das concentrações de sacarose, glucose e frutose, e não variaram ao longo do processo de mobilização das reservas de carboidratos da série rafínosica e xiloglucano.

Na figura 25, são apresentados 3 cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD utilizando o programa para análise de monossacarídeos. Podemos ver a mudança nas proporções entre os picos, com o aumento da proporção de glucose e frutose, assim como a queda da sacarose.

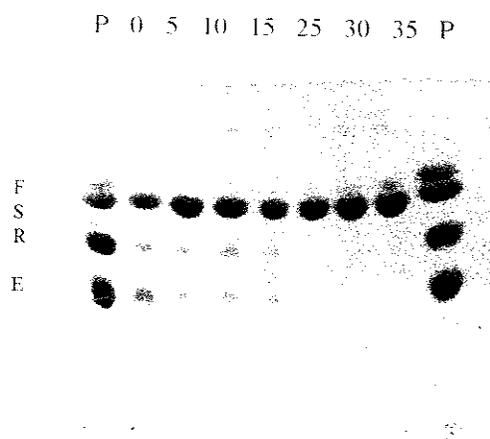


Figura 23: análise por cromatografia em camada delgada dos oligossacarídeos presentes na fração solúvel em etanol em cotilédones de *H. courbaril*. O padrão aplicado em ambos os lados da placa (P) continha frutose (F), sacarose (S), rafinose (R) e estaquiase (E) (10 μg de cada). A massa de carboidrato aplicada foi equivalente a uma porcentagem constante do que seria extraído de um cotilédono (0.0118%).

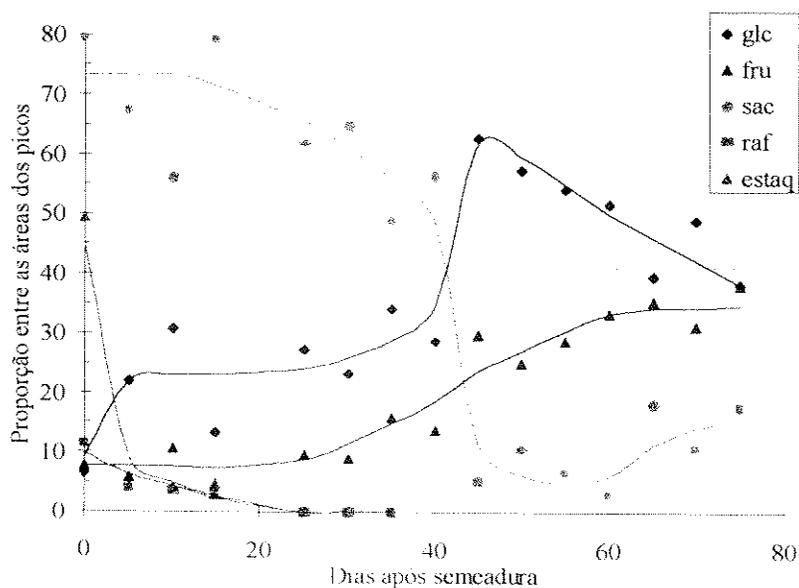
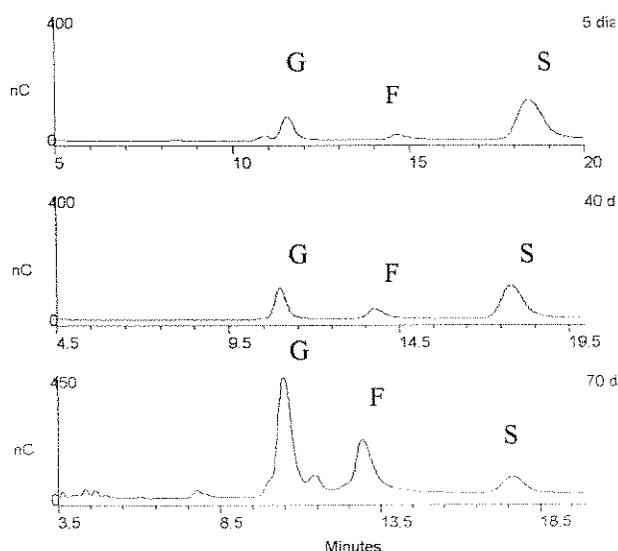


Figura 24: proporção entre os açúcares presentes na fração solúvel em etanol extraída de cotilédones de *H. courbaril* obtidas por HPAEC-PAD. Como os dois programas separaram a sacarose, este dissacarídeo foi utilizado como um padrão interno, possibilitando a inserção na mesma figura de dados obtidos a partir de programas diferentes. Cada ponto do gráfico corresponde à média de 3 cromatogramas. As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar.

Figura 25: análise por HPAEC-PAD do material solúvel em etanol. As proporções entre os açúcares de baixo peso molecular mostram uma tendência de queda se sacarose (S) e aumento de frutose (F) e principalmente glucose (G) ao longo do processo de mobilização das reservas.



Dosagem das atividades enzimáticas

No primeiro experimento, as enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano de reserva mostraram um aumento de atividade por cotilédone no período entre 35 e 45 dias. No entanto, os picos de atividade não se apresentaram muito bem definidos. A dosagem de atividade de β -galactosidase mostrou o mesmo perfil em pH 3,4 e 5,0, havendo apenas uma redução da atividade nos ensaios feitos em pH 5,0. Na figura 26 está mostrada apenas a atividade em pH 3,5. Para que pudéssemos obter um perfil mais preciso da atividade enzimática no período de mobilização do xiloglucano, foi realizado um segundo experimento com um maior número de cotilédones (3 amostras de 5 cotilédones) menor intervalo entre as coletas (a cada 3 dias) (figura 26). Contudo, mesmo nessas condições não foi possível melhorar a resolução dos picos (figura 26). O desvio padrão das atividades no cotilédone sugerem uma grande heterogeneidade na amostra, o que é comum ocorrer em espécies nativas (Silva et al., 1997). A não detecção de atividade de “endo- hidrolases” nos extratos anteriores a 50 dias após semeadura (figura 26B), pode ser devida à diluição feita para reduzir a viscosidade dos extratos, ou seja, os extratos poderiam estar muito diluídos (é importante lembrar que ensaios cujo tempo de escoamento não diminuiu pelo menos à metade em 30 minutos, foram considerados sem atividade).

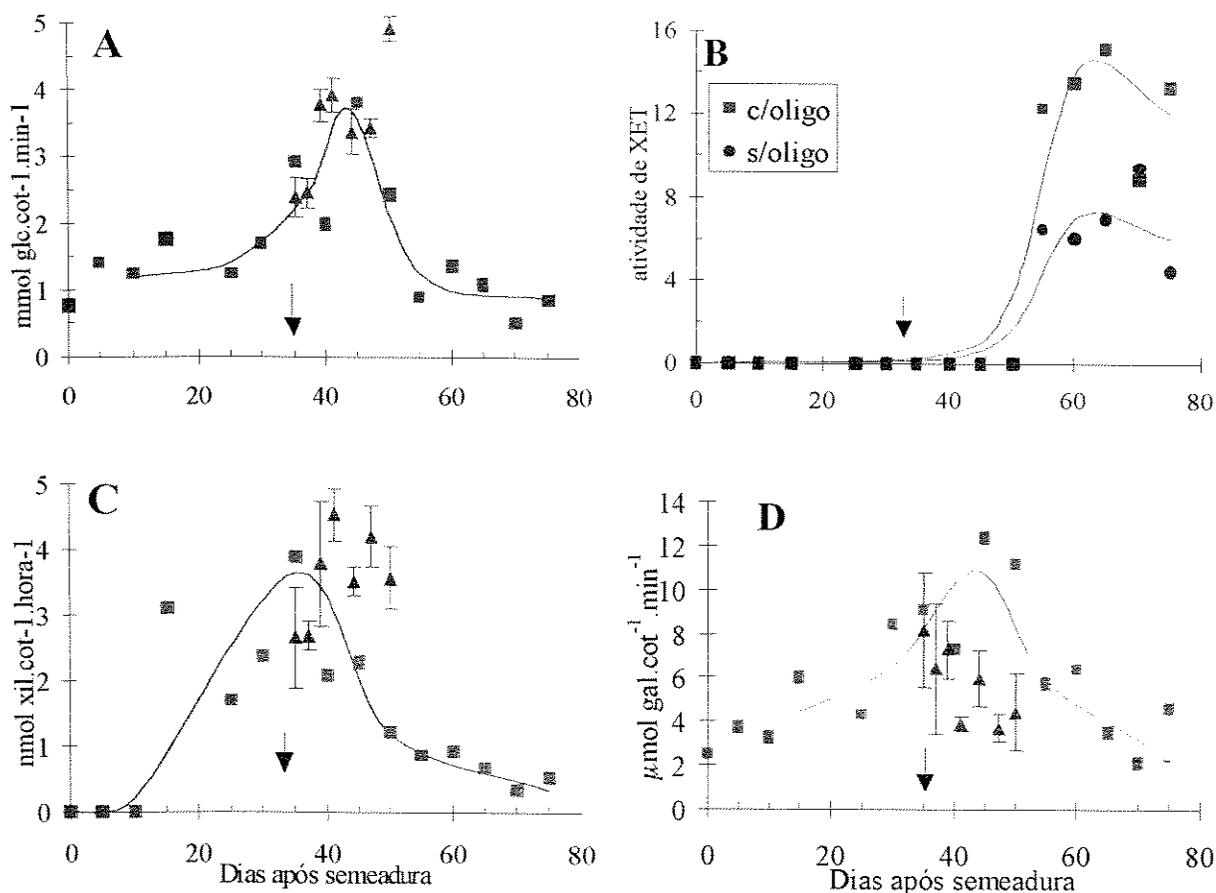


Figura 26: atividade enzimática detectada em extrato bruto de cotilédones de *H. courbaril*. **A-** atividade de β -glucosidase. **B-** atividade de endo-transglucosilase (expressa em unidades arbitrárias por cotilédones- ver materiais e métodos para detalhes), medida na presença e ausência de oligossacarídeos. **C-** α -xilosidase. **D-** atividade de β -galactosidase em pH 3,5. Os pontos em vermelho se referem às atividades obtidas no primeiro experimento (0 a 75 dias), enquanto os pontos verdes são as médias das dosagens do segundo experimento (35 a 50 dias), com o desvio padrão da atividade indicado. As setas indicam a coleta a partir da qual a maioria das sementes havia germinado.

A dosagem de proteína solúvel no extrato enzimático mostrou uma queda no teor de proteínas ao longo do processo de mobilização das reservas, havendo apenas um aumento 35 dias após semeadura, seguido de uma queda acentuada até 50 dias após semeadura (figura 27). É importante notar que os dados apresentados na figura 27 são referentes às proteínas solúveis nas condições do ensaio. Nos primeiros extratos foi possível observar a presença de um precipitado

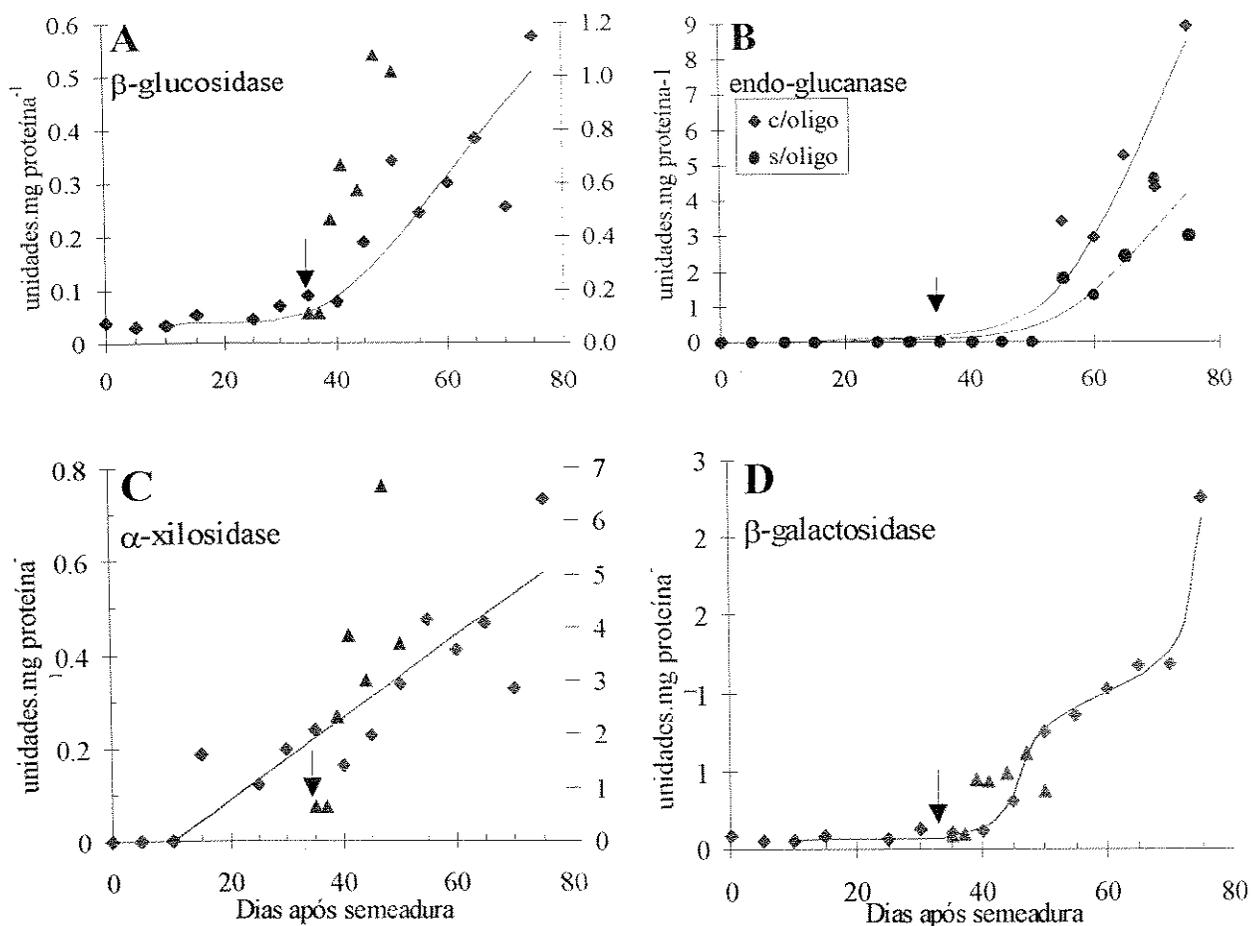


Figura 28: atividade específica de β -glucosidase (A, 1 unidade= $1\mu\text{mol glucose}\cdot\text{min}^{-1}$), “endo-glucanase” (B, em unidades arbitrárias), α -xilosidase (C, 1 unidade= $1\mu\text{g xil}\cdot\text{hora}^{-1}$) e β -galactosidase em pH 3,5 (D, 1 unidade= $1\mu\text{mol galactose}\cdot\text{min}^{-1}$) em cotilédones de *H. courbaril*. Os dados em vermelho correspondem às dosagens do primeiro experimento, e os verdes se referem ao segundo. A linha contínua foi ajustada apenas aos pontos do primeiro experimento. A seta corresponde ao ponto a partir do qual a maioria das sementes havia germinado. Os eixos da direita (gráficos de atividade de β -glucosidase e α -xilosidase) referem-se às dosagens do segundo experimento.

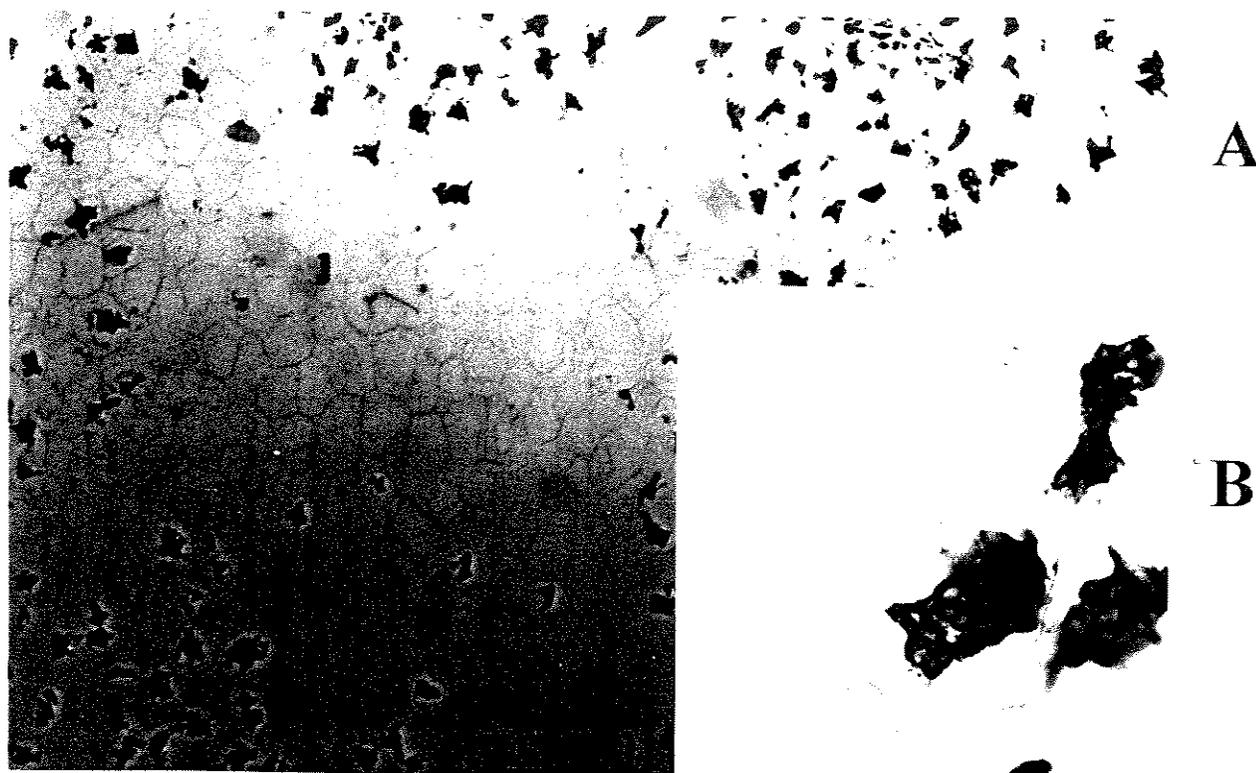


Figura 29: mobilização de proteínas de reserva ao longo do cotilédone. Em (A) vemos que este processo ocorreu de forma heterogênea no órgão (105x). Em (B) vemos células adjacentes em estágios bastante distintos de mobilização das reservas protéicas (420x). Compare as células vistas neste campo com a figura 14. Coloração com XP.

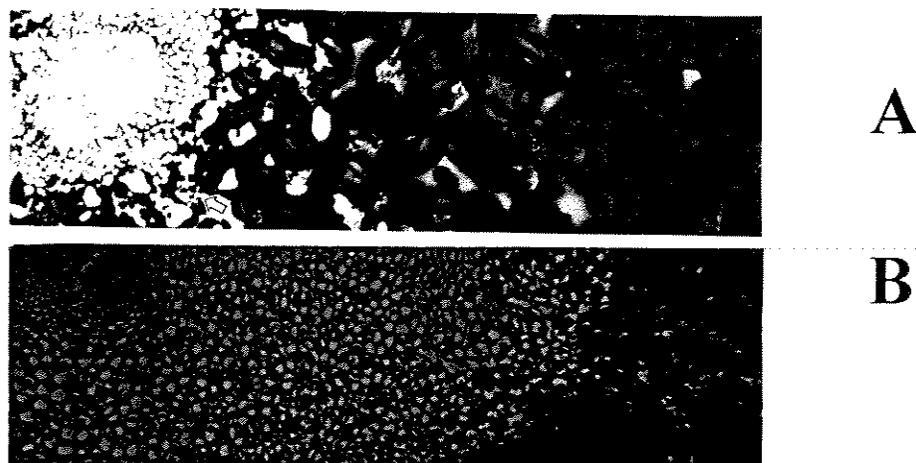


Figura 30: mobilização do xiloglucano. Esta também procedeu de forma heterogênea ao longo do órgão. Em (A) pode-se ver que a mobilização começa a partir dos vasos. Em um mesmo campo, podemos observar células com citoplasma rico em grãos de amido (\Rightarrow) e paredes menos espessas próximas aos vasos e células cujo material de parede ainda se difunde durante a coloração (comparar com as figuras 16A, B e C)(105x). Este padrão pode ser observado ao longo de toda a mobilização do polissacarídeo. Em B temos um estágio mais avançado de mobilização que começa nas células próximas aos vasos e segue a partir destes por todo o parênquima (33,6x). Material corado por P.A.S.

Análise do polissacarídeo

Hidrólise ácida

Os principais monossacarídeos obtidos por hidrólise do material solúvel em água e analisados por HPAEC-PAD foram glucose, xilose e galactose (figura 31). A proporção entre estes monossacarídeos na semente quiescente foi 4,0: 3,2: 1,2: 0,2 (glc: xil: gal: ara). No material extraído com álcali, foi detectada uma quantidade relativamente alta de arabinose, sendo a proporção de monossacarídeos nesta fração igual a 4,0: 3,2: 1,2: 0,7 (glc: xil: gal: ara) (tabela 1). A partir de 50 dias após semeadura, a proporção de arabinose aumentou na fração extraída com água até proporções próximas às encontradas na fração de polissacarídeos extraídos com álcali.

Análise dos oligossacarídeos

As proporções entre os picos de oligossacarídeos produzidos por digestão do xiloglucano extraído com água variaram nos primeiros dias após a semeadura (figura 32). A falta de oligossacarídeos purificados para a correção da área dos picos de acordo com a sensibilidade do detector, assim como a presença de picos não identificados, impossibilitou análises quantitativas dos picos.

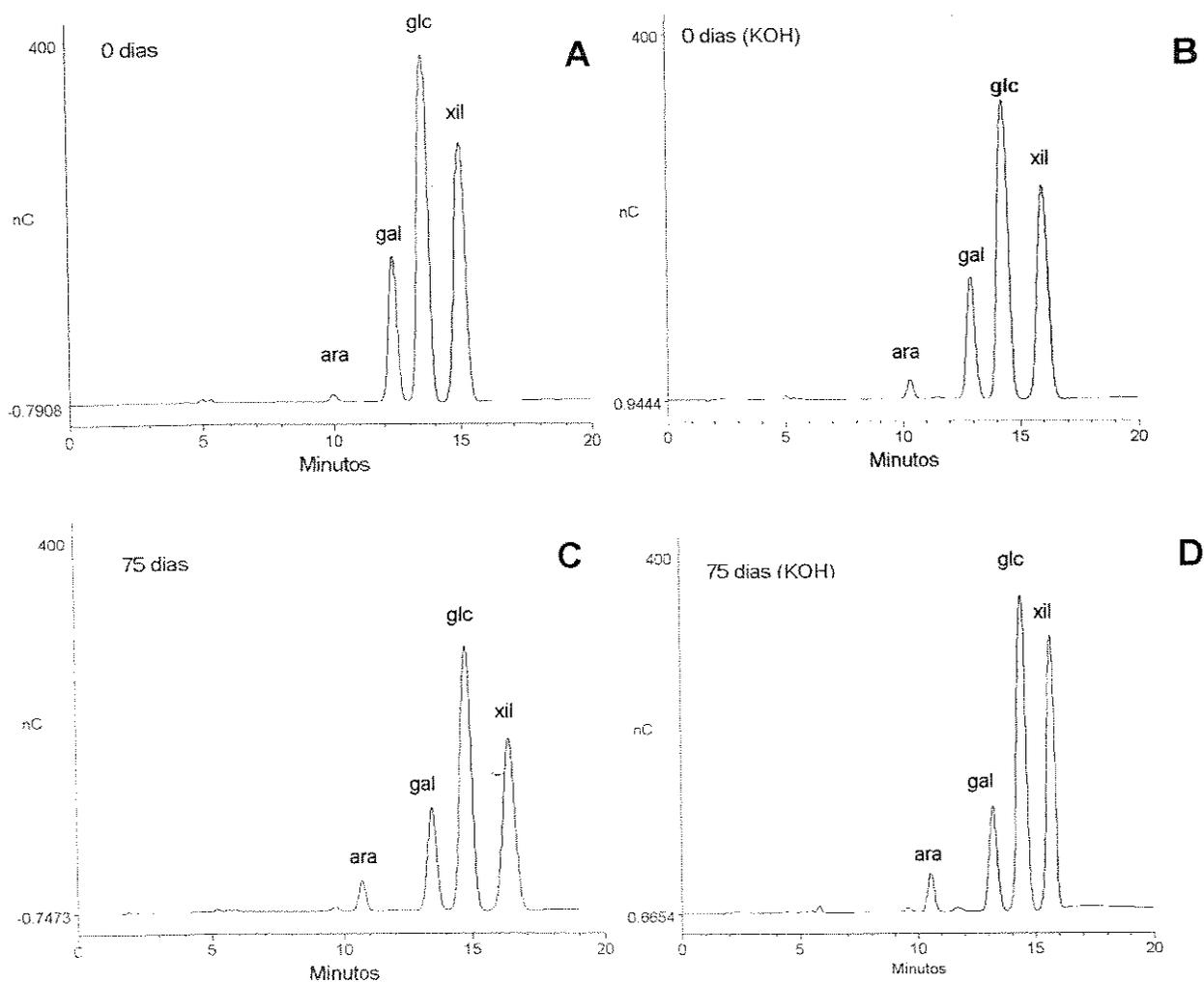


Figura 31: exemplos de cromatogramas obtidos por análise por HPAEC-PAD dos monossacarídeos gerados pela hidrólise ácida do material extraído dos cotilédones com água (A e C) e álcali (B e D). No material extraído com álcali após a extração com água, pode-se observar uma maior proporção de arabinose (ara), enquanto no material extraído com água, o pico de arabinose aumentou ao final do processo de mobilização das reservas.

Tabela 1: proporção entre os monossacarídeos obtidos por hidrólise ácida do material solúvel em água e em álcali. As áreas dos picos de cada monossacarídeo foram corrigidas de acordo com a diferença de sensibilidade do detetor para cada açúcar. Cada ponto representa a média de 2 cromatogramas.

		Dias			
		0	30	45	75
Água	arabinose	0,2	0,2	0,3	1,1
	galactose	1,2	0,9	1,1	1,2
	glucose	4,0	4,0	4,0	4,0
	xilose	3,2	2,9	3,3	3,0
Álcali	arabinose	0,7	0,7	1,1	1,4
	galactose	1,2	0,9	1,0	1,1
	glucose	4,0	4,0	4,0	4,0
	xilose	3,2	2,9	3,0	3,3

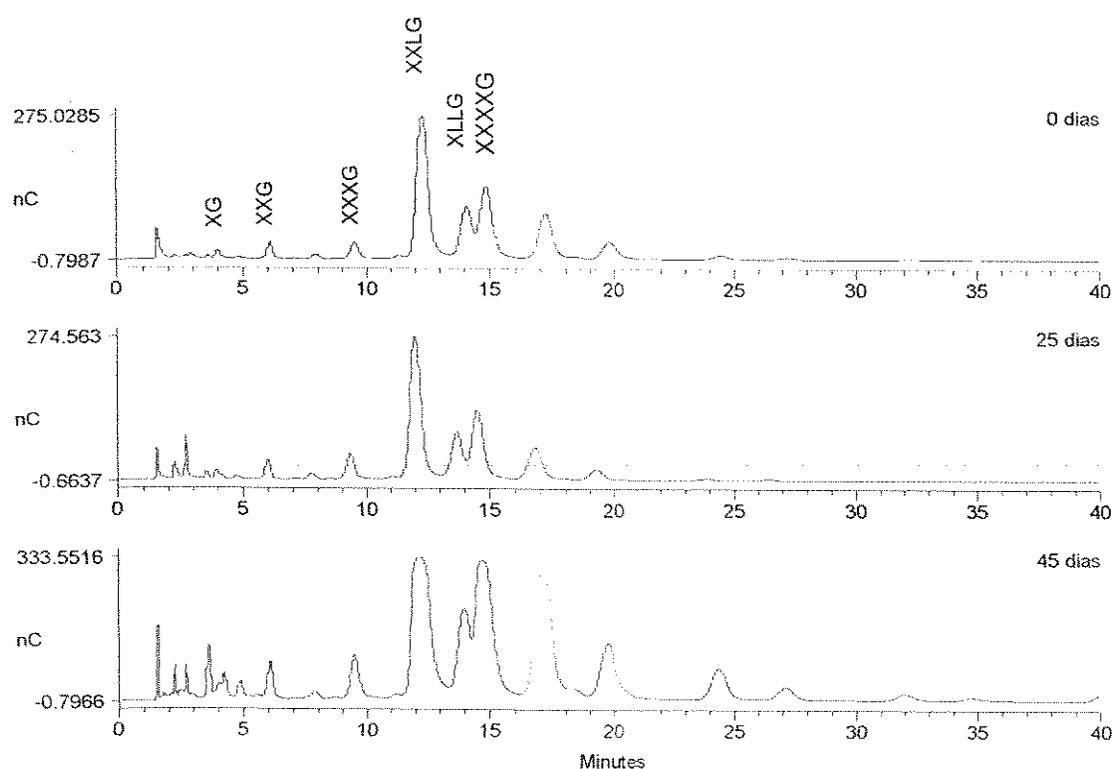


Figura 32: alteração nas proporções entre os oligossacarídeos de xiloglucano obtidos por digestão com celulase antes do período de mobilização deste polissacarídeo para o eixo embrionário. Os picos conhecidos foram denominados de acordo com a nomenclatura atual (Fry et al. , 1995).

Discussão

Compostos de reserva em sementes de *H. courbaril*

Através das técnicas utilizadas neste trabalho foi possível verificar a existência de vários tipos de reservas nos cotilédones de *Hymenaea courbaril*. Foi comprovada a ocorrência de corpos protéicos de reserva, de oligossacarídeos da série rafínósica (rafinose e estaquiose) e confirmada a ocorrência de xiloglucano já constatada por Kooiman (1960).

A ocorrência de grânulos nos corpos protéicos sugere a existência de pelo menos outra reserva. Inclusões em corpos protéicos já foram observadas anteriormente (Bewley e Black, 1978), consistindo, possivelmente, de cristais de fitina (mio-inositol hexafosfato), sendo uma importante reserva de fosfato e outros íons ligados (cálcio, magnésio, etc.). Neste trabalho não foram feitos experimentos para esclarecer a natureza precisa destas granulações.

Com os dados obtidos sobre o metabolismo das reservas presentes em cotilédones de *H. courbaril*, foi possível montar um esquema a respeito da ordem em que as reservas são mobilizadas (figura 33). Os corpos protéicos apresentaram alterações desde a embebição até 40 dias após semeadura, sendo o desaparecimento das granulações a primeira alteração nos cotilédones a ser percebida por microscopia ótica, o que leva a crer que a fitina seja uma das primeiras reservas a ser metabolizada pelas células do parênquima cotiledonar, junto com os oligossacarídeos da série rafínósica.

O fato de os elementos de vasos apresentarem uma forte coloração para o XP, sugere que as reservas protéicas sejam mobilizadas na forma de peptídeos, e não de aminoácidos, pois estes últimos são perdidos (solubilizados) no processamento dos cotilédones para a microscopia. De fato, vários autores acreditam que a proteólise limitada destas proteínas exerça um importante papel tanto na compactação das proteínas para a formação dos corpos protéicos quanto na mobilização para o eixo embrionário (Gayler et al., 1989; Cortelazzo e Vidal, 1991; Müntz, 1996).

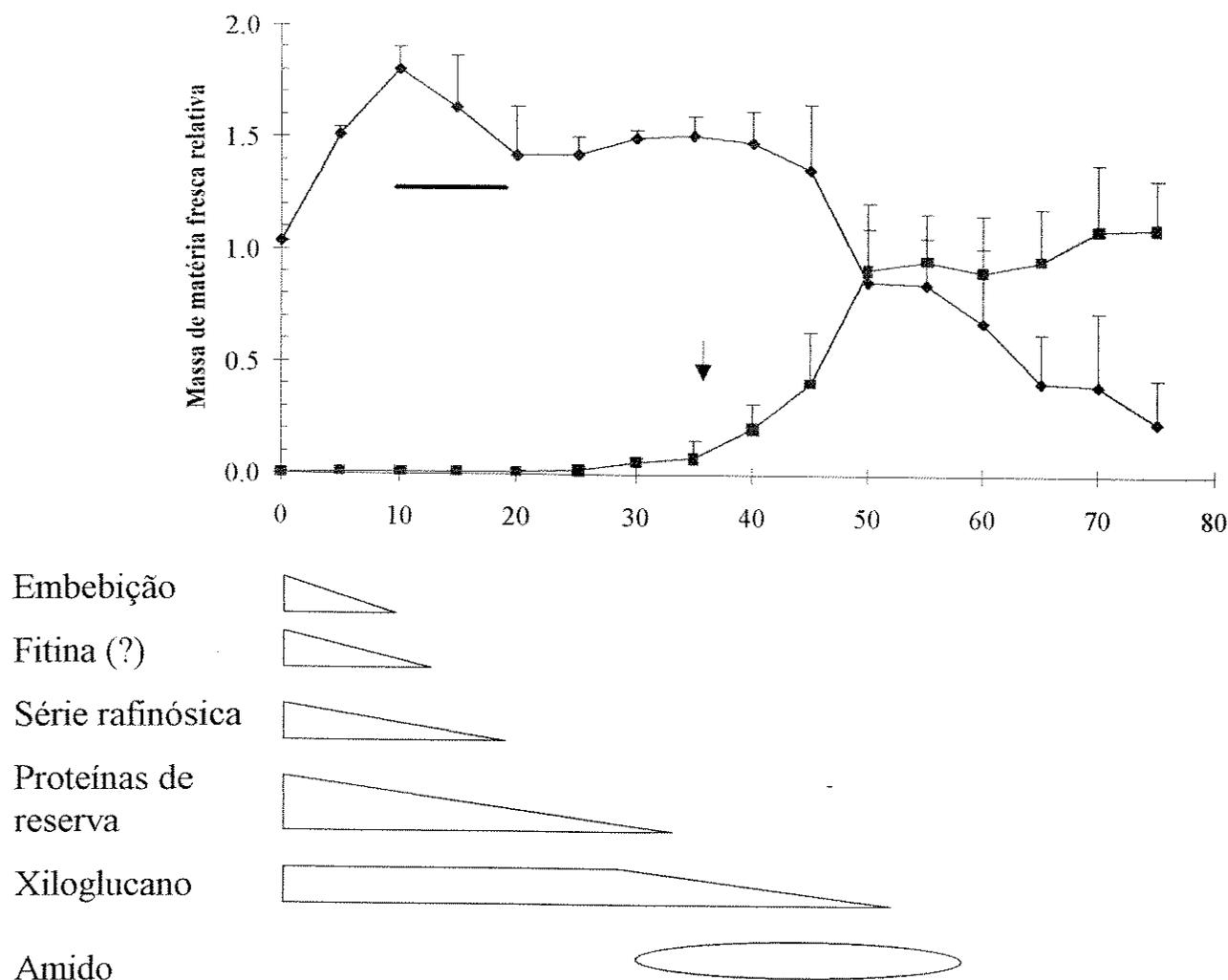


Figura 33: seqüência proposta para a mobilização das reservas observadas em cotilédones de *Hymenaea courbaril*. O gráfico acima é idêntico ao da figura 13. A seta indica a coleta a partir da qual a maioria das sementes havia germinado. Os desenhos abaixo do gráfico correspondem à quantidade estimada de cada uma das reservas detectadas nos cotilédones. A barra indica o período de queda da testa. O momento exato em que os eventos ocorrem não pôde ser determinado com precisão devido ao grande desvio padrão das amostras.

As dosagens de proteínas solúveis nos cotilédones mostram uma queda em seus teores. Esta queda, no entanto, não deve ser considerada como quantificação dos teores de proteínas de reservas, pois nem todas são solúveis nas condições do ensaio, o que pôde ser facilmente verificado devido ao aparecimento de precipitados intensamente corados nos momentos iniciais da

mobilização. As diferenças na solubilidade são evidentes quando lembramos que o critério de classificação das proteínas de reserva (estabelecido por Osborne em 1924) é justamente a solubilidade em diversas condições: solúveis em água (albuminas), solúveis em solução salina (globulinas), solúveis em misturas de água e álcool (prolaminas) e solúveis em álcali ou ácidos diluídos (glutelinas).

Logo após a germinação, é iniciada uma mobilização maciça do xiloglucano de reserva. O período de mobilização de 40 a 60 dias após semeadura pôde ser delimitado pela redução do espessamento da parede visto por microscopia, mas foi também corroborado por diversas evidências : (1) a brusca redução da massa dos cotilédones e aumento da massa do eixo embrionário, (2) o aumento da atividade das enzimas de degradação de xiloglucano, (3) acúmulo de amido no interior da célula neste período, uma forte evidência de aumento de carboidrato no interior da célula, provavelmente proveniente da degradação do polissacarídeo na parede e (4) redução do carboidrato extraível com água dos cotilédones.

Após a mobilização das reservas, o cotilédone entra em um processo de senescência onde suas seus tecidos se desorganizam até sua queda. Nas condições em que este experimento foi conduzido, este período durou cerca de 15 dias, o que sugere a existência, em cotilédones de *Hymenaea courbaril*, de uma fase pós mobilização em que o órgão permanece ligado ao eixo embrionário, assim como descrito por Reis e colaboradores (1987) para cotilédones de *Tamarindus indica*.

Este período de aparente latência das células cotiledonares pode ser uma estratégia para evitar a queda dos cotilédones antes da mobilização de todo o xiloglucano disponível. Uma vez que a mobilização ocorre a partir dos feixes vasculares, as células próximas a estes não podem degenerar imediatamente após exaurirem suas reservas, pois isso criaria uma camada de células mortas entre os vasos e as células do parênquima cujas reservas ainda estão sendo mobilizadas, dificultando o transporte para o eixo embrionário. Esta aparente latência poderia, portanto, ser vista como um período necessário ao melhor aproveitamento das reservas disponíveis nos cotilédones.

É importante lembrar que os tempos citados acima para a ocorrência de cada um dos processos são apenas estimativas. Diante da grande variabilidade nas dosagens de atividade enzimática e do fato de a mobilização das reservas não

ocorrer de forma homogênea ao longo dos cotilédones, não é possível definir momentos exatos para a ocorrência da mobilização de cada tipo de reserva.

A presença de xiloglucano nas protuberâncias da parede vai contra as observações anteriores a respeito da composição destas. Protuberâncias semelhantes (observadas em sementes, folhas, frutos, calos, entre outros) têm sido descritas como sendo constituídas de pectina (Potgieter e van Wyk, 1992), e, embora sua ocorrência seja ampla, não há nenhuma função conhecida descrita na literatura. A partir das imagens obtidas por MEV, foi possível reconstruir a seqüência proposta para a sua formação. Já em 1980, Carr e colaboradores sugeriram que tais saliências na parede seriam geradas durante o afastamento das células, quando regiões da lamela média permaneceriam ligadas, gerando "pontes de pectina" entre as células. A existência de xiloglucano nas protuberâncias, indica que parte da parede primária (ou até mesmo a de reserva) de células adjacentes estão em contato. De fato, as observações em MEV apontam para a existência de pelo menos duas camadas formando a trabécula recém rompida. A estrutura destas em *H. courbaril*, portanto, parece ser bem mais complexa do que se supõe.

O aumento da arabinose no polissacarídeo extraído com água ao longo da mobilização das reservas sugere a existência de subpopulações de xiloglucano na parede. Lima e colaboradores (1993) já haviam observado a presença de uma alta proporção de arabinose na fração extraída com NaOH de cotilédones de *Hymenaea courbaril*, mas atribuíram isso a uma contaminação com arabinano. Uma explicação alternativa seria a existência de arabinose ligada diretamente ao xiloglucano, como descrito por Hisamatsu e colaboradores (1992). Se as enzimas de degradação de xiloglucano possuírem maior afinidade pelo polissacarídeo pobre em arabinose (ou por partes do polissacarídeo pobres em arabinose), haverá um enriquecimento gradual de arabinose ao longo da degradação do polissacarídeo. Esta fração de xiloglucano rica em arabinose estaria mais firmemente fixada à parede, o que explicaria a necessidade de extração com álcali para solubilizá-la. Sendo o xiloglucano um importante componente da parede primária das células, sua mobilização completa e inespecífica levaria, possivelmente, ao colapso da estrutura. Fica clara, então, a necessidade de

limitação da degradação desse polímero, uma vez que o xiloglucano “estrutural” deve permanecer, ao menos na parede primária.

Na figura 13, podemos ver que o período de maior queda na massa do cotilédones corresponde ao período de mobilização do xiloglucano. Simultaneamente, ocorre um aumento na massa do eixo embrionário, o que sugere uma intensa translocação de reserva para este local. Podemos afirmar, com base nestes dados, que o xiloglucano é a reserva mais importante nos cotilédones de *H. courbaril*, ao menos em termos quantitativos.

Mobilização do xiloglucano de reserva

Mecanismo de degradação

No caso do xiloglucano, a degradação total deste requer a ação de pelo menos 3 enzimas hidrolíticas : β -galactosidase, α -xilosidase e β -glucanase. Embora a endo- β -glucanase não seja estritamente necessária, a disponibilidade de terminais não redutores onde as 3 exo-enzimas possam atuar deve ser muito baixa. Sem a ação de uma endo-enzima sobre o polissacarídeo, portanto, sua degradação seria muito lenta e ineficiente.

O aumento de atividade destas enzimas no cotilédone não foi simultâneo. A primeira enzima a aumentar de atividade foi a α -xilosidase (em torno de 15 dias após sementeira), seguida pela β -glucosidase e a β -galactosidase (cuja atividade aumenta a partir de 35 dias, embora haja atividade desde a embebição), e por último foi detectado aumento da endo-glucanase (55 dias após sementeira). A presença de atividade de β -glucosidase e β -galactosidase nos extratos dos tempos iniciais poderia explicar as alterações nas proporções entre os oligossacarídeos constituintes do xiloglucano. Tal alteração sugere modificações no xiloglucano antes da degradação que ocorre aos 45 dias após sementeira. Modificações no xiloglucano poderiam alterar não apenas suas propriedades mecânicas, como também alterar a afinidade da XET pelo substrato. Alterações no xiloglucano após a sua síntese pelas enzimas da parede já foram descritas antes, embora as funções destas alterações não estejam claras (Thompson e Fry, 1997)

A necessidade de oligossacarídeos para a detecção de atividade de endo- β -glucanase sugere que, na realidade, o sistema de degradação do xiloglucano de reserva não possua uma endo-enzima verdadeira, e sim uma xiloglucano endo-transglicolase (XET), como nas sementes de *T. majus* (Fanutti et al., 1993). Neste caso, a enzima não é capaz de gerar novos terminais não redutores no polissacarídeo, mas apenas remodelá-lo na parede. Para que fragmentos de polissacarídeos sejam liberados da parede, ao menos uma das seguintes condições deve ser satisfeita: pode ocorrer hidrólise lenta do polissacarídeo em baixas concentrações de oligossacarídeos (como descrito por Fanutti et al., 1993) e/ou há alguma fonte de oligossacarídeos que possibilita a liberação do polissacarídeo da parede (figura 34). Independente do mecanismo de liberação dos fragmentos de xiloglucano, estes devem ser degradados pelas exo-enzimas após a sua liberação.

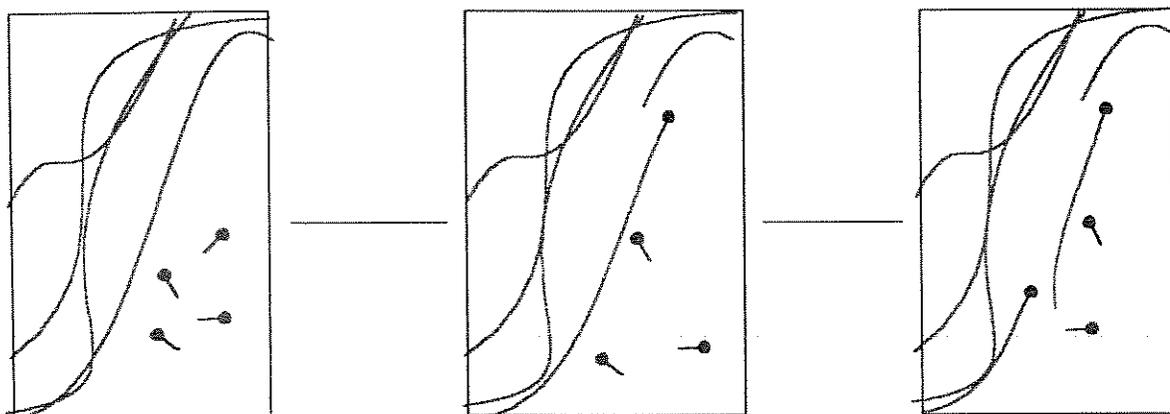
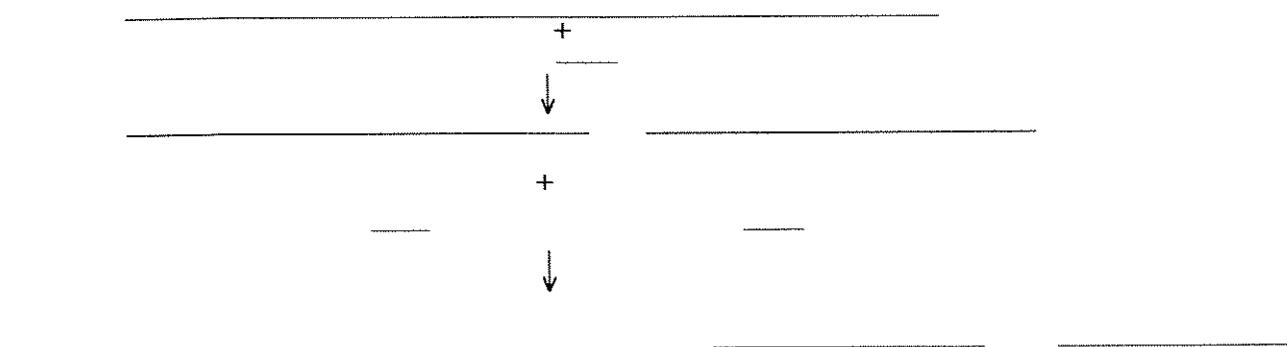


Figura 34: modelo de degradação do xiloglucano (linhas azuis) baseado na ação da XET na presença de oligossacarídeos (em vermelho). A enzima poderia transferir grandes fragmentos do polissacarídeos para oligossacarídeos livres, por transglicosilação, sem que fossem gerados novos terminais redutores (círculos vermelhos).

O modelo de degradação através de transglicosilação leva a um consumo exponencial de oligossacarídeos. Para cada novo terminal não redutor gerado no polissacarídeo, a XET requer um oligossacarídeo. Na primeira "hidrólise" há a necessidade de um oligossacarídeo. Para a "hidrólise" dos dois fragmentos

gerados na primeira reação, seriam necessários dois oligossacarídeos, e assim sucessivamente, como ilustrado no esquema a seguir:



Se este modelo for verdadeiro, teremos dois sistemas paralelos de degradação de oligossacarídeos: as exo-hidrolases e a XET, ambos utilizando oligossacarídeos como substrato. Para manter o sistema em funcionamento, portanto, seria necessária uma fonte de oligossacarídeos.

Uma possível fonte pode ser fornecida pela presença de uma celulase verdadeira em baixas concentrações na parede, o que justificaria a atividade detectada em baixas concentrações de oligossacarídeos. Por outro lado, a atividade celulolítica detectada poderia ser devido à existência de oligossacarídeos endógenos no extrato, uma vez que estes últimos não foram dialisados.

Uma outra possibilidade seria a síntese de oligossacarídeos pela própria célula. Ao longo da deposição de xiloglucano (durante a maturação da semente) o sistema biossintético estaria voltado para a biossíntese do polissacarídeo. Após a germinação, haveria uma modificação no metabolismo celular para a geração de oligossacarídeos durante a degradação do polissacarídeo. Em última análise, a produção dos oligossacarídeos controlaria a taxa de degradação do xiloglucano, uma vez que, sem os oligossacarídeos, não haveria a liberação dos fragmentos de polissacarídeo da parede. A vantagem disso seria que o controle da degradação do polissacarídeo estaria dentro da célula, onde os mecanismos de controle do

metabolismo são precisos. Isto possibilitaria, ainda, uma maior integração do metabolismo intracelular com o metabolismo da parede.

Este modelo requer o transporte dos oligossacarídeos através do espaço periplasmático, onde estariam as exo-hidrolases. Uma forma de impedir a ação da α -xilosidase e β -glucosidase sobre os oligossacarídeos antes que estes sejam utilizados pela XET seria através do controle da atividade da β -galactosidase. Sem a hidrólise prévia dos oligossacarídeos por esta enzima, a α -xilosidase e a β -glucosidase, não poderiam atuar ou atuariam parcialmente sobre os oligossacarídeos. O fato de a β -galactosidase apresentar um pH ótimo bastante distinto do pH ótimo das demais enzimas sugere que a degradação dos oligossacarídeos é um processo mais complexo do que se supunha inicialmente. A modulação do metabolismo de polissacarídeos da parede através do pH não é uma noção nova, sendo este um dos possíveis mecanismos de ação da auxina (Salisbury e Ross, 1992). Ricard e Noat (1986) sugeriram um modelo de controle do crescimento celular baseado principalmente no controle da degradação dos polímeros de parede primária através pelo pH.

O isolamento de uma β -galactosidase de *Copaifera langsdorffii* com ação sobre galactoses em algumas posições específicas do polissacarídeo (Alcântara et al., submetido à publicação) levanta a possibilidade da existência de mecanismos sofisticados de degradação. Alcântara (1995) sugere que a β -galactosidase pode controlar a degradação dos oligossacarídeos de xiloglucano de cotilédones de *C. langsdorffii*, sendo a atividade desta enzima capaz de modular a meia vida dos oligossacarídeos no espaço periplasmático.

A saturação do sistema de transporte de sacarose para o eixo embrionário também traz implicações no mecanismo de degradação do xiloglucano de reserva. Se todas as células do parênquima cotiledonar comesçassem a degradação do polissacarídeo ao mesmo tempo, haveria um aumento brusco na quantidade de sacarose a ser transportada. O fato de a degradação começar a partir dos vasos e não ocorrer em todas as células do cotilédone simultaneamente pode ser um mecanismo para minimizar a saturação do sistema de transporte de carboidratos, uma vez que apenas algumas células estariam produzindo sacarose em um dado momento, enquanto as demais estariam em um outro estágio da degradação. As

etapas da degradação das reservas seguem um padrão espacial (a partir dos vasos), assim como um padrão temporal (a partir da embebição).

Como, em um dado momento, há células em diferentes estágios de degradação das reservas, devemos obter um platô de atividade enzimática neste período e não um pico bem definido. Podemos observar que, de fato, a atividade enzimática por cotilédone permanece alta por um longo período, sem aumentos muito bem definidos.

A origem do sistema de degradação: transferência de funções?

Segundo Buckeridge e Reid (1996), alguns polissacarídeos de parede acumulados nas sementes poderiam ser moléculas multifuncionais. Estes teriam inicialmente uma função estrutural e poderiam assumir, ao longo da evolução, outras funções. Por esta teoria, se um polissacarídeo possui inicialmente uma função principal e uma outra secundária (que pode inclusive ser uma propriedade fortuita), essa última poderia tornar-se cada vez mais relevante ao longo da linha evolutiva que levou à espécie atual, podendo, inclusive, vir a se tornar a função mais importante polímero.

Esta teoria, chamada de transferência de funções, poderia explicar a possível origem do sistema de biossíntese e de degradação do xiloglucano de reserva. Como todas as células da planta, as células do parênquima cotiledonar possuem xiloglucano em sua parede. Ao longo da evolução, tais células poderiam aumentar a deposição deste polissacarídeo na parede durante a maturação da semente e a taxa de degradação durante o estabelecimento da plântula, o que acabaria gerando o sistema existente atualmente em *H. courbaril* e outras sementes de Leguminosae e Tropaeolaceae. Como as células já possuiriam tanto os sistemas de biossíntese quanto os de degradação do polissacarídeo, nenhum dos passos citados representaria um grande salto metabólico, mas apenas mudanças graduais nas velocidades de algumas vias metabólicas.

O metabolismo de biossíntese e de degradação do xiloglucano de reserva pode ter sido "importado" do metabolismo de parede primária. No caso do

metabolismo do xiloglucano de reserva de *H. courbaril*, esta transferência teria sido completa, trazendo da parede primária toda a sua complexidade (degradação via XET) e mecanismos de regulação (controle da degradação via pH).

Transporte dos carboidratos durante a degradação do xiloglucano

Segundo Van Bel (1993) existem dois mecanismos principais de carregamento do floema: simplástico e apoplástico. No carregamento apoplástico, a sacarose é internalizada no floema por simporte com prótons, enquanto no carregamento simplástico as células companheiras do floema recebem a sacarose via plasmodesmata e promovem sua galactosilação, gerando rafinose e impedindo o seu retorno para o parênquima. Neste último caso, o exudato do floema costuma ser rico em rafinose (20 a 80% do açúcar total), enquanto no transporte apoplástico, a sacarose é praticamente o único oligossacarídeo encontrado no exudato do floema. Estas diferenças no mecanismo de carregamento do floema possuem profundas implicações fisiológicas e anatômicas. Embora seja possível haver um mecanismo misto de carregamento do floema, a ausência de outros oligossacarídeos em cotilédones de *H. courbaril* além da sacarose durante a mobilização do xiloglucano de reserva leva a crer que o transporte de carboidratos para o eixo embrionário seja feito via sacarose.

O acúmulo de amido no interior das células do parênquima e a formação de sacarose suportam a teoria de que os monossacarídeos provenientes da degradação do polissacarídeo de reserva sejam internalizados pela célula. Não se conhece o mecanismo de absorção destes açúcares, mas acredita-se que a entrada na célula seja feita na forma de monossacarídeos, e não de oligossacarídeos (Buckeridge e Reid, 1996).

Tal acúmulo de amido no interior da célula poderia funcionar como um “tampão” de carboidrato, evitando o aumento excessivo da concentração citoplasmática de monossacarídeos durante a entrada dos açúcares provenientes da degradação do polissacarídeo de reserva. O excesso de monossacarídeos livres no citoplasma pode ser prejudicial à célula em pelo menos duas formas: por gerar um alto potencial redutor, que pode levar à glicosilação inespecífica de

componentes celulares e; por reduzir o potencial hídrico intracelular, uma vez que estas moléculas são extremamente hidrofílicas. A biossíntese de polissacarídeos como meio de armazenar carboidratos em uma forma “osmoticamente inerte” já foi citada por Lozovaya e colaboradores (1996) como um elemento importante na evolução de vias metabólicas.

A formação de sacarose seria a solução para o primeiro problema, mas, se lembrarmos que a capacidade de exportação da célula já está saturada (caso contrário não haveria acúmulo de carboidrato no interior da célula), o segundo problema vai apenas ser transferido para o dissacarídeo. O desvio de carboidrato para a biossíntese de amido poderia liberar a água da camada de hidratação dos monossacarídeos, pois ao formar amido, as moléculas de glucose provavelmente liberam parte de sua água de solvatação. Ao final da degradação do xiloglucano, a redução de entrada de açúcar na célula possibilitaria a inversão da via metabólica no sentido de degradação do amido para a síntese de sacarose e transporte para o eixo embrionário.

Como em todas as reações químicas, cada reação representaria uma perda de energia. Deste ponto de vista, a síntese e posterior degradação do amido representaria uma perda significativa de energia. Talvez este excesso de interconversões de carboidratos seja o motivo pelo qual a soma das massas de matéria seca dos cotilédones e do eixo embrionário ao final da mobilização das reservas corresponda a apenas 40% da massa de matéria seca inicial da semente. Apesar de podermos atribuir boa parte da perda de massa à queda dos cotilédones (cerca de 25% da massa de matéria fresca da semente), o consumo de cerca de 35% da massa inicial sugere uma alta taxa respiratória nos cotilédones.

Um processo semelhante foi observado por Hoth e colaboradores (1986) durante a deposição do xiloglucano em sementes de *T. majus*. O processo de deposição observado por estes autores deve ser o oposto ao de degradação em *H. courbaril*, uma vez que ocorre deposição de amido transitório no interior das células (possivelmente devido à incapacidade do sistema de biossíntese de incorporar à parede todo o carboidrato que está sendo importado pela célula), e o rendimento de xiloglucano produzido a partir do amido também ser baixo (apenas cerca de 50% do amido depositado é convertido a xiloglucano). O aparecimento de marcação radioativa no amido quando o cotilédone é exposto à xilose marcada

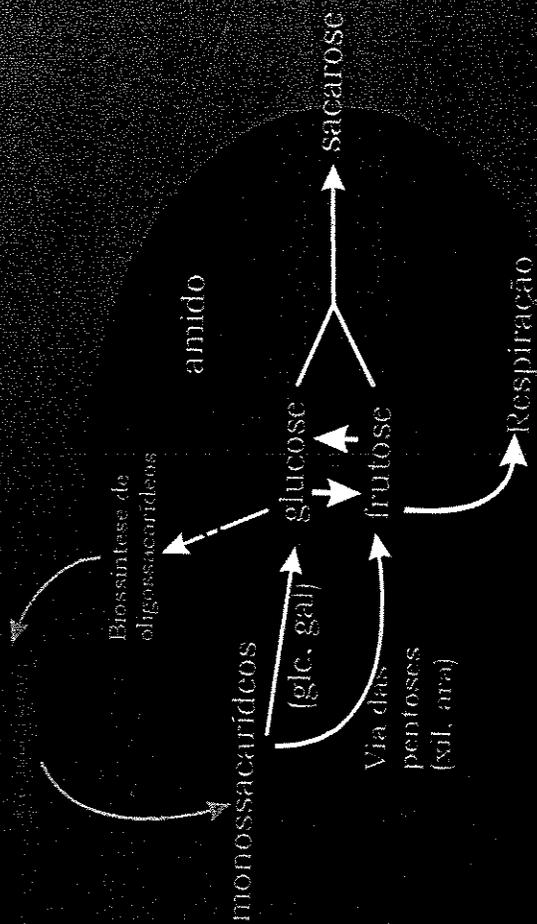
sugere uma complexa passagem do monossacarídeo por vias metabólicas antes da sua incorporação ao polissacarídeo, tal como ocorre com a xilose oriunda do xiloglucano de reserva antes de ser convertida a sacarose e translocada para o eixo embrionário.

A biossíntese de amido no eixo embrionário poderia ser uma forma de evitar o acúmulo de sacarose neste, o que poderia dificultar a importação da sacarose proveniente dos cotilédones. Com isso, mesmo que o eixo embrionário não seja capaz de utilizar toda a sacarose que está sendo sintetizada nos cotilédones, ele é capaz de manter o gradiente de concentração (e, em última análise, a capacidade de drenar a sacarose), armazenando o carbono para uso posterior.

Um modelo de degradação e transporte dos carboidratos derivados do xiloglucano de reserva pode ser sugerido a partir dos dados obtidos neste trabalho (figura 35). Uma vez iniciado o processo de degradação do polissacarídeo, os monossacarídeos provenientes da parede seriam internalizados pela célula do parênquima cotiledonar e formariam um "pool" de monossacarídeos com vários destinos possíveis: (1) síntese de sacarose para o transporte dos carboidratos para o eixo embrionário; (2) síntese de oligossacarídeos para possibilitar a degradação do polissacarídeo da parede ; (3) biossíntese de amido e; (4) uso como fonte de energia e carbono pela própria célula cotiledonar.

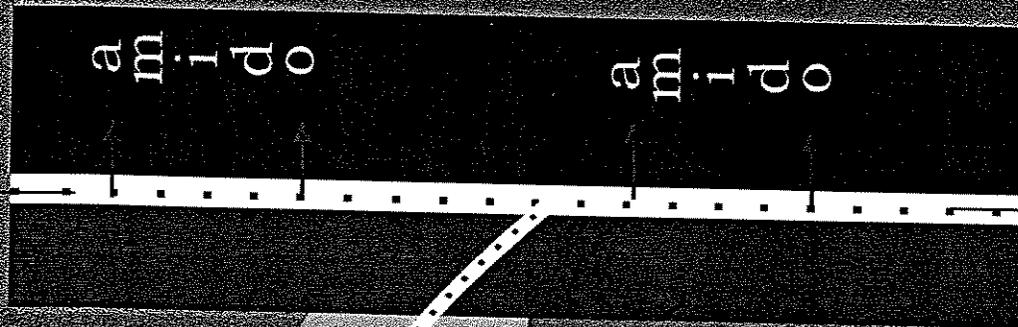
A biossíntese de sacarose seria limitada pela capacidade dos vasos de transportar o dissacarídeo, pois o aumento na síntese de sacarose em um momento em que os vasos já estão com sua capacidade de transporte saturada levaria ao aumento da concentração de sacarose nos cotilédones. O controle da biossíntese de oligossacarídeos estaria bastante integrado ao resto do metabolismo intracelular e sob intensa regulação, visto que, o aumento desta via levaria à degradação descontrolada do polissacarídeo da parede e, conseqüentemente, ao aumento da concentração intracelular de monossacarídeos. A biossíntese de amido poderia absorver o excesso de monossacarídeos do citoplasma.

A



B

Crescimento



Cotiledone

Cotex. Metálica
Eixo Embriofaríngeo

Bibliografia

- Albersheim, P., 1976. The primary cell wall. In Bonner, J., Varner, J.E., eds *Plant Biochemistry*, 3 ed., Academic Press, New York-London, pp 226-274.
- Alcântara, P.H.N., 1995. Purificação e caracterização da β -galactosidase de sementes de *Copaifera langsdorffii* e suas relações com o metabolismo do xiloglucano. Universidade Federal de São Paulo. Dissertação de mestrado, 139 p.
- Alcântara, P.H.N., Buckeridge, M.S. e Dietrich, S.M.C., Purification of a xiloglucan (XLLG/ XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae). Submetido ao Planta.
- Baba, K. Sone, Y., Misaki, A., Hayashi, T., 1994. Localization of xyloglucan in the macromolecular complex composed of xyloglucan and cellulose in pea stems. **Plant Cell Physiol.**, **33(3)**: 439-444.
- Barbour, M.G, Burk, J.H. e Pitts, W.D., 1987. *Terrestrial plant ecology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, California, 633p.
- Baron-Epel, O., Gharyal, P.K. e Schindler, M., 1988. Pectin as mediators of wall porosity in soybean cells. **Planta**, **175**: 389-395.
- Bewley, J.D. e Black, M., 1978. Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Vol 1. Springer-Verlag, Berlin.
- Braga, M.R., Costa, A.P.P. e Dietrich, S.M.C., 1993. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. **Ciência e Cultura**, **45(1)**: 75-80.
- Buckeridge, M.S., Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley M.J. e Vieira, C.J. 1997., A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr. Res.**, **928**.
- Buckeridge, M.S. e Dietrich, S.M.C., 1996. Mobilization of the raffinose oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Sci.**, **117**: 33-43.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R. e Dietrich, S.M.C., 1995. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Revta. Brasil. Bot.**, **18(2)**: 171-175.
- Buckeridge, M.S. e Reid, J.S.G., 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura** **48(3)**: 153-162.

- Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G., e Dietrich, S.M.C., 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savana and forest populations. *Physiol. Planta*, **86**:145-151.
- Carpita, N., 1996. Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.*, **47**:445-476.
- Carpita, N.C. e Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant J.*, **3(1)**: 1-30.
- Carpita, N.C., McCann, M. e Griffing, L.R., 1996. The plant extracellular matrix: News from the cell's frontier. *The Plant Cell*, **8(9)**: 1451-1463.
- Carr, D.J., Oates, K. e Carr, S.G.M., 1980. Studies of intercellular pectic strands, of leaf palisade parenchyma. *Ann. Bot.*, **45**: 403-413.
- Carvalho, P.E.R., 1994. Espécies brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ, Brasília, 640p.
- Coimbra, M.A., Waldron, K.W. e Selvendran, R.R., 1994. Isolation and characterization of cell wall polymers from olive pulp (*olea europaea* L.) *Carbohydr. Res.*, **225**: 245-262.
- Cortelazzo, A.L., 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revta. brasil. Bot.*, **15**:157-62.
- Cortelazzo, A.L. e Vidal, B.C., 1991. Soybean seed proteins: detection *in situ* and mobilization during germination. *Revta. brasil. Bot.*, **14**: 27-33.
- Cosgrove, D.J., 1993. How do cell walls extend? *Plant Physiol.*, **102**: 1-6.
- Crawshaw, L.A. e Reid, J.S.G., 1984. Changes in cell wall polysaccharides in relation to seedling development and the mobilization of reserves in the cotyledons of *Lupinus angustifolius* cv. Unicrop. *Planta*, **160**: 449-454.
- Curtois, J.E. e Le Dizet, P., 1974. Étude de la structure de la galactoxyloglucane (amiloyde) des graines de balsamine (*Impatiens balsamina*). *C.R. Acad. Sci., Ser. C*, **278**: 81-83.
- Dea, I.C.M. e Morrison, A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advan.Carbohydr.Chem.Biochem.*, **31**: 241-312.
- Delmer, D.P. e Amor, Y., 1995. Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**: 987-1000.

- Dey, P.M., 1980. Biochemistry of alpha-D-galactosidic linkages in the plant kingdom. **Adv.Carb.Chem.Biochem.**, **37**: 283-372.
- Driouch, A., Levy, S., Staehelin, L.A., Faye, L., 1994. Structural and functional organization of the golgi apparatus in plant cells. **Plant Physiol.Biochem.**, **32(6)**: 731-749.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **3**: 350-356.
- Dufus, C. E Slaughter, C., 1980. Seeds and their uses, John Wiley and Sons, Fort William, Scotland, 154 p.
- Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V., Reid, J.S.G., 1985. Xyloglucan (amiloid) mobilization in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. **Planta**, **163**:133-140.
- Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V., Reid, J.S.G., 1986. Purification and properties of a novel, xyloglucan-specific endo -(1-4)- β -glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). **J.Biol. Chem.**, **261**: 9489-9494.
- Fanutti, C., Gidley, M.J., Reid, J.S.G., 1991. A xyloglucan oligosaccharide specific α -D-xylofuranosylidase or exo-oligoxylogucan- α -xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Purification, properties and its interaction with xyloglucan-specific endo-(1,4)- β -glucanase and other hydrolases during storage xyloglucan mobilization. **Planta**, **184**: 137-147.
- Fanutti, C., Gidley, M.J., Reid, J.S.G., 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formely called xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. **Plant J.**, **3**: 691-700.
- Farkas, V. e Maclaclan, G., 1988. Stimulation of pea 1,4- β -glucanase activity by oligosaccharides derived from Xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, **184**, 213-219.
- Farkas, V., Sulova, Z., Stratilova, E., Hanna, R., Maclaclan, G., 1992. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. **Arch. Biochem. Biophys.**, **298**: 365-370.
- Fry, S.C., 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, **46**: 497-520.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K. e Matthews, K.J., 1992. Xyloglucan endotransglycolase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem. J.**, **282**: 821-828.

- Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J-P., Kato, Y., Pérez Lorences, E., Maclachlan, G.A., McNeil, M., Mort, A.J., Reid, J.S.G., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J., White, A.R., 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiol. Plant.**, **89**: 1-3.
- Garwood, N.C., 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. In The ecology of tropical forest tree seedling. In Swaine, M.D. *The ecology of tropical forest tree seedlings*. Unesco, Paris, pp 59-130.
- Gayler, K.R., Wachsmann, F., Kolivas, S., Nott, R. e Johnson, E., 1989. Isolation and characterization of protein bodies in *Lupinus angustifolius*. **Plant Physiol.**, **91**: 1425-1431.
- Gómez-Pompa, A., Burley, F.W., 1991. The management of natural tropical forests. In Gómez-Pompa, A, Whitmore, T.C. e Hadley, M., eds *Rain forest regeneration and management*. Unesco e The Partenon Publishing Group, Paris, pp 3-18.
- Goonerate, J., Needs, P.W., Ryden, P., Selvendran, R.R., 1994. Structural features of cell wall polisaccharides from the cotyledons of mung bean *Vigna radiata*. **Carbohydr. Res.**, **265**: 61-77.
- Harris, M. e Chrispeels, M.J., 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung bean. **Plant Physiol.**, **56**: 292-299.
- Hayashi, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **40**:139-168.
- Hayashi, T., 1991. Biochemistry of xyloglucans in regulating cell elongation and expansion. In Loyd, C.W. ed. *The cytoeskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, London, UK.
- Hayashi, T. e Maclachlan, G., 1984. Pea xyloglucan and cellulose. **Plant Physiol.**, **75**:596-604.
- Hayashi, T., Ogawa, K., Mitsuishi, Y., 1994. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiol.**, **35(8)**: 1199-1205.
- Heinricher, E., 1888. Zur biologie der gattung *Impatiens* . **Flora (Jena)**, **71**: 163-185. Apud Buckeridge, M.S. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Stirling, Escócia.
- Hisamatsu, M., York, W.S., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1992. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosil residues. **Carbohydr. Res.**, **277**:45-71.

- Hoson, T., Tabuchi, A., Masuda, Y., 1995. mechanism of xyloglucan breakdown in cell walls of azuki bean epicotyls. **J.Plant Physiol.**, **174**: 219-224.
- Hoth, A., Blaschek, W., Franz, G., 1986. Xyloglucan (amyloid) formation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. Seeds. **Plant Cell reports**, **5**: 9-12.
- Ishii, T., Hiroi, T., Thomas, J.R., 1990. Feruloylated xyloglucan and p-coumaroyl arbinoxilan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. **Phytochem.**, **29(6)**: 1999-2003.
- Janzen, D.H. e Vázquez-Yanes, C., 1991. Aspects of tropical seed ecology of relevance to management of tropical forested wildlands. In Gómez-Pompa, A, Whitmore, T.C. e Hadley, M., eds *Rain forest regeneration and management*. Unesco e The Partenon Publishing Group, Paris, pp 137-157.
- Kato, Y. e Matsuda, K., 1985. Xyloglucan in the cell walls of suspension-cultured rice cells. **Plant Cell Physiol.**, **26**: 437-445.
- Kiefer, L. L., York, W.S., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1989. Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. **Phytochemistry**, **28(8)**: 2105-2107.
- Kiefer, L.L., york, W.S., Albersheim, P. Darvil, A.G., 1990. Structural characterization of an arabinose-containing heptasaccharide enzymatically isolated from sycamore extracelular xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, **197**: 139-158.
- Kierman, J.A., 1981. Histological and histochemical methods. Theory and practice. London, Pergamon, 344p.
- Kooiman, P., 1960. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta. Bot. Neerl.**, **9**: 208-219.
- Kooiman, P., 1961. The constitution of *Tamarindus*-amyloid. **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas**, **80**: 849-865.
- Kooiman, P., 1967. The constitution of the amyloid from seeds of *Annona muricata* L. **Phytochemistry**, **6**:1665-1673.
- Krishna, S. e Ghose, T.P., 1942. Indian Forest Leaflet, **Forest reseach Inst. Dehra Dun.**, **23**. Apud. Kooiman,P. 1961.
- Krishna, S. e Ghose, T.P., 1943. Indian Forest Leaflet, **Forest reseach Inst. Dehra Dun.**, **47**. Apud. Kooiman, P. 1961.
- Langenheim, J.H. e Thimann, K.V., 1982. Botany; plant Biology and it's relation to human affairs. John Wiley & sons, New York, 642p.

- Le Dizet, P., 1972. Quelques précisions sur la structure de l'amyloïde de capucine. **Carbohydr. Res.**, **24**: 505-509.
- Lillie, R.D., 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York, Blaskiston.
- Lima, N.N., Reichter, F., Corrêa, J.B.C., Ganter, J.L.M.S. e Sierakoviski, M.R., 1983. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (Jatobá). **Ciência e Cultura**, **45(1)**: 22-26.
- Lison, L., 1963. Histochemie et citochemie animales. Paris, Gauthier-Villars, 396 p.
- Liyama, K., Lam, T.B., Stone, B.A., 1994. Covalent cross-links in cell wall. **Plant Physiol.**, **104**: 315-320.
- Lozovaya, V.V., Zabolina, O.A. e Widhrom, J.M., 1996. Synthesis and turnover of cell wall polysaccharides and starch in photosynthetic soybean suspension cultures. **Plant Physiol.** **111**: 921-929.
- McQueen-Mason, S.J., 1995. Expansins and cell wall expansion. **J. Exp. Bot.**, **46(292)**: 1639-1650.
- McQueen-Mason, S.J e Cosgrove, D.J., 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Proc. Natl.Acad. USA.**, **91**:6574-6578.
- McQueen-Mason, S.J., Duracho, D.M. e Cosgrove, D.J., 1992. Endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, **4**: 1425-1433.
- Mayer, A.M. e Poljakoff-Mayber, A., 1975. The germination of seeds. Ed. Wareing, P.F. e Galston, A.Y. Pergamon Press, Great Britain, 2 ed. 192 p.
- McCann, M.C. e Roberts, K., 1991. Architecture of the primary cell wall. In Lloyd, C.W., ed. *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, New York.
- McCann, M.C., Wells, B. e Roberts, K., 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. **J. Cell Sci.**, **96**: 323-334.
- McNeil, M., Darvill, A.D., Fry, S.C. e Albersheim, P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annu.Rev.Plant Biol. Plant molec. Biol.**, **53**:625-663.
- Moore, P.J., Swords, K.M.M., Linch, M.A., Staelin, L.A., 1991. Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. **The j. Cell Biol.**, **112(4)**: 589-602.

- Müntz, K., 1996. Proteases and proteolytic cleavage of stored proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **J. Exp. Bot.**, **47(298)**: 605-622.
- Nishitani, K., 1995. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. **J. Plant Res.**, **108**:137-148.
- Osborne, T.B., 1924. The vegetable proteins. Longmans Green, London. Apud. Shewry et al., 1995.
- Potgieter, M.J. e van Wyk, A.E., 1992. Intracellular pectic protuberances in plants: their structure and taxonomic significance. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, **33**: 295-316.
- Reid, J.S.G., 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum.). **Planta**, **100**:131-142.
- Reid, J.S.G. e Bewley, J.D., 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic legume seed. **Planta**, **147**: 145-150.
- Reis, D. Vian, B. Darzens, D. e Roland, J.C., 1987. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. **Planta**, **170**: 60-73.
- Reiss, R., 1889. Über die Natur der Reservecellulose un über ihre auflosungsweise bei der keimung der samen. **Landwirtsch Jahrb.**, **18**: 711-765. Apud. Buckeridge, M.S. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Stirling, Escócia
- Ricard, J. e Noat, G., 1986. Eletrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. **Eur. J. Biochem.**, **155**: 183-190.
- Roberts, K., 1989. The plant extracellular matrix. **Curr. Op.Cell Biol.**, **1**: 1020-1027.
- Roberts, K., 1990. Structures at the cell surface. **Curr. Op. Cell Biol.**, **2**: 920-928.
- Robinson, D.G., 1996. SuSy ergo GluSy: New developments in the field of cellulose biosynthesis. **Bot.Acta**, **109**: 261-263.
- Rodriguez-Gálvez, E. e Mendlen, K., 1995. Cell wall synthesis in cotton root fibers after infection with *Fusarium oxysporum*. **Planta**, **197**: 535-545.
- Roe, J.H. e Rice, E.W., 1948. A photometric method for the determination of free pentose in animal tissues. **J.Biol.Chem.**, **173**: 507-512.

- Rose, J.K.C., Brumell, D.A., Bennett, A.B., 1996. Two divergent xyloglucan endotransglycosylases exhibit mutually exclusive patterns of expression in *Nasturtium*. **Plant Physiol.**, **110**:493-499.
- Ruel, K. e Joseleau, J.P., 1993. Influence of Xyloglucan oligosaccharides on the micromorphology of the walls of suspension-cultured *Rubus fruticosus* cells. **Acta Bot. Neer.**, **42(3)**: 363-378.
- Ruel, K., Joseleau, J.P., Franz, G., 1990. Aspects cytologiques de la formation des xyloglucanes dans les cotylédons des graines de *Tropaeolum majus* L.- (Capucine). **C.R.Acad.Sci.Paris**, **t.310, série III**, p 89-95.
- Salisbury, F.B. e Ross, C.W., 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, California, US, 4 ed. 682p.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. e Tatham, A.S., 1995. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. **The Plant Cell**, **7**:945-956.
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of cell wall proteins. **The Plant cell**, **5**: 9-23.
- Silva, J., Arrowsmith, D., Hellyer, A., Whiteman, S. e Robinson, S., 1994. Xyloglucan endotransglycolase and plant growth. **J. Exp. Bot.**, **45**: 1693-1701.
- Silva, T.R.G., Cortelazzo, A.L. e Dietrich, S.M.C., 1997. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciência e Cultura**, **49**: 219-222.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, **160**: 61-68.
- Steadman, K.J., Pritchard, H.W., Dey, P.M., 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, **77**: 667-674.
- Street, H.E. e Öpik, H., 1984. The Physiology of flowering plants. Edward Arnold, Great Britain, 3 ed. 279p.
- Taiz, L., 1984. Plant cells expansion: regulation of plant cell wall mechanical properties. **Annu. Rev.Plant Physiol.**, **35**: 585-657.
- Thompson, J.E. e Fry, S.C., 1997. Trimming and solubilization of xyloglucan after deposition in the walls of cultured rose cells. **J. Exp. Bot.**, **48(307)**: 297-305.
- Van Bel, A.J.E. 1993. Strategies of phloem loading. **Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **44**: 253-281.
- Vidal, B.C., 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondrial ossification. **Cell Mol. Biol.**, **22**:45-64.

- Vincken, J., Keizer, A., Beldman, G. e Voragen, A.G.J., 1995. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiol.**, **108**:1579-1585.
- Vogel, T. E Schleiden, M.J., 1839. Über das amyloid, eine neue Pflanzensubstanz. **Ann. Phys. Chem.**, **119**:240-252. Apud. Buckeridge, M.S. e Reid, J.S.G. 1996.
- Waldron, K. e Brett, C., 1990. Physiology and Biochemistry of plant cell walls. Unwin Hyman, London, 193p.
- White, E.V. e Rao, P.S., 1953. **J. Am. Chem. Soc.**, **75**: 2617. Apud. Kooiman, 1961.