UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Thalita Beatriz Carrara da Encarnação

**MODULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE
GALACTOMANANO POR SUA PRÓPRIA
ESTRUTURA FINA**

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Thalita Beatriz Carrara da Encarnação

**MODULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE
GALACTOMANANO POR SUA PRÓPRIA ESTRUTURA FINA**

**MODULATION OF ENZYMATIC DEGRADATION OF
GALACTOMANNAN BY ITS FINE STRUCTURE**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências Biológicas, na área de Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Encarnação, Thalita Beatriz Carrara

Modulação da degradação enzimática de galactomanano por sua própria estrutura.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 211p.

1. Galactomanano 2. α -galactosidase 3. Estrutura fina de polissacarídeos
4. Mobilização de reserva 5. Parede celular 6. Purificação enzimática
7. *Sesbania virgata* (CAV.) Pers. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Orientador

Aos meus pais, Milton e Sandra, por todo amor, carinho, dedicação e muito
apoio em todos os momentos da minha vida;
Ao meu anjo Augusto por existir em minha vida.

Dedico

" Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le coeur.
L'essentiel est invisible pour les yeux."
Le Petit Prince, Antoine de Saint-Exupéry (1946).

Agradecimentos

Ao Instituto de Biociências da USP, principalmente ao Departamento de Botânica;

À CAPES pela bolsa de estudo concedida;

À todo o corpo docente e aos funcionários do Departamento de Botânica por tornarem o ambiente de trabalho muito favorável ao desenvolvimento da pós-graduação;

Ao Professor Dr. Marcos Silveira Buckeridge pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, sua orientação durante todo o desenvolvimento do Mestrado e sua amizade;

À Dra. Sonia Dietrich agradeço pelo tempo que estive ao seu lado, aprendendo com o seu conhecimento, me inspirando para desenvolver este trabalho, que faz parte do seu legado, e principalmente me inspirando a ser Pesquisadora, como ela simplesmente foi e sempre será (*In memoriam*);

À Professora Dra. Magdalena Rossi pela ajuda e paciência nas análises moleculares presentes no trabalho;

Ao Professor Dr. Luis Netto e a toda equipe pela abertura do laboratório à realização da purificação da α -galactosidase, em especial, à técnica Simone Vidigal pela paciência, ajuda no uso do FPLC e respostas rápidas aos e-mails de reserva do equipamento sempre feito de última hora;

À Pesquisadora Adriana Franco Paes Leme e as técnicas Romênia e Bianca pela abertura do Laboratório de Espectrometria de Massas para a realização do sequenciamento interno da α -galactosidase de *Sesbania virgata* e a grande ajuda nesta empreitada!

Ao Clóvis Oliveira da Silva ou C1 ou Clovitos, como eu o chamava todo dia de manhã, por ter aparecido do céu e me ensinado e me acompanhado durante toda a parte experimental do meu projeto. Saiba Clovitos que sem você talvez não tivesse chego até a metade, meu super obrigado!

À todas as meninas do Laboratório: Amanda, Dri Grandis, Bru, Dé, Egleezita, Vivi, Gi, Cris, Eveline, por toda a ajuda em todos os quesitos, por estarem comigo e confiarem em mim mesmo quando nem eu acreditava mais em mim! Obrigada por absolutamente tudo!!! Aos meninos do lab também, não que eles sejam muitos, Ivan, Maraba, Luis, Vinícius pelas ótimas risadas que demos juntos, pelos desabafos, pelo dia-a-dia;

Ao Dr. Eduardo Aratangy, à minha terapeuta Vanessa Batista e à minha nutricionista Fernanda Psicolaro, anjos que após muita luta apareceram em minha vida e me ajudaram a sair da anorexia. A vocês nada do que disser será suficiente, então só direi o meu muito obrigada por TUDO!

A todos da Academia Arena, principalmente ao Prof. José Ricardo, que cuidaram de mim desde o primeiro dia, pegavam no meu pé e me ajudaram a ser a Thalita novamente!

À você, Augusto, amor da minha vida, por estar ao meu lado em absolutamente todos os momentos, por me fazer feliz, sonhar, por me fazer uma pessoa melhor a cada dia, por me amar incondicionalmente! Obrigada pela ajuda direta e indireta neste trabalho, obrigada por todos dias nestes últimos 7 anos e alguns meses!

Aos meus pais, Sandra e Milton, por todo investimento em mim, por acreditarem e me apoiarem em todas as decisões, por me amarem e estarem absolutamente sempre ao meu lado! Saibam que este Mestrado é muito mais de vocês do que meu, sem cada ensinamento, apoio, carinho, recebido de vocês nada disso teria sido possível. Muito Obrigada por tudo. Amo vocês!

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE TABELAS.....	22
RESUMO	23
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO.....	28
1.1. SEMENTES	28
1.2. GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO.....	29
1.3. RESERVAS DE SEMENTES	30
1.4. PAREDE CELULAR DE RESERVA DE SEMENTES	31
1.5. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR	32
1.5.1. (ARABINO)GALACTANOS	33
1.5.2. XILOGUCANOS	35
1.5.3. MANANOS	38
1.6. GALACTOMANANOS	39
1.6.1. ESTRUTURA QUÍMICA DOS GALACTOMANANOS	40
1.6.2. PROPRIEDADES DOS GALACTOMANANOS	41
1.6.3. MOBILIZAÇÃO DOS GALACTOMANANOS	42
1.6.4. REGULAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE RESERVA DE GALACTOMANANO	46
1.7. CARACTERIZAÇÃO DE A-GALACTOSIDASE	47
1.8. CARACTERIZAÇÃO DA ENDO-B-MANANASE	49
1.9. ESPÉCIE <i>SESBANIA VIRGATA</i>	51
1.9.1. JUSTIFICATIVA PARA O USO DA ESPÉCIE.....	51
OBJETIVOS	53
CAPÍTULO 1.....	55
SEMIPURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ENZIMA A-GALACTOSIDASE PRESENTE EM SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.	55
I. RESUMO	56
II. INTRODUÇÃO	58
III. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL	61
3.2. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E PICO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	61
3.2.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES QUIESCENTES	62
3.2.2. DETERMINAÇÃO DO PESO FRESCO DO ENDOSPERMA E TEGUMENTO	62
3.2.3. EXTRAÇÃO PROTÉICA, DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA A-GALACTOSIDASE E ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	63
3.3. PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE DE SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.	65
3.3.1. INCUBAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> PARA PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE.....	65
3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA E PH ÓTIMO DA A-GALACTOSIDASE EM EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO 66	
3.3.2.1. TEMPERATURA ÓTIMA	66
3.3.2.2. PH ÓTIMO	66
3.3.3. PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO ...	66
3.3.4. SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: CROMATOGRAFIA DE TROCA-ÍÔNICA COM COLUNA ANIÔNICA (MONO-Q)	68
3.3.5. TERCEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (SUPEROSE) 69	
3.3.6. TABELA DE PURIFICAÇÃO	70

3.3.7.	CARACTERIZAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS E DA A-GALACTOSIDASE DE <i>CYAMOPSIS TETRAGONOLOB</i> (GUAR) (MEGAZYME®) QUANTO A TEMPERATURA ÓTIMA, pH ÓTIMO E ASPECTOS CINÉTICOS	71
3.3.7.1.	TEMPERATURA ÓTIMA	71
3.3.7.2.	pH ÓTIMO	71
3.3.7.3.	ASPECTOS CINÉTICOS – K_M E $V_{MÁX}$	72
3.3.8.	SEQUENCIAMENTO INTERNO DA A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS	72
3.4.	ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE A-GALACTOSIDASE PREVIAMENTE IDENTIFICADAS EM PLANTAS	74
IV.	RESULTADOS	75
4.1.	DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E PICO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	75
4.2.	PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE DE SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.	77
4.2.1.	CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA E pH ÓTIMO DA A-GALACTOSIDASE EM EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO	77
4.2.1.1.	TEMPERATURA ÓTIMA	77
4.2.1.2.	pH ÓTIMO	78
4.2.2.	PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	79
4.2.3.	SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: CROMATOGRAFIA DE TROCA-ÍÔNICA COM COLUNA ANIÔNICA (MONO-Q)	82
4.2.4.	TERCEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE: CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (SUPEROSE)	85
4.2.5.	TABELA DE PURIFICAÇÃO	89
4.2.6.	CARACTERIZAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS. E DA A-GALACTOSIDASE DE <i>CYAMOPSIS TETRAGONOLOB</i> (GUAR) (MEGAZYME®) QUANTO A TEMPERATURA ÓTIMA, pH ÓTIMO E ASPECTOS CINÉTICOS	90
4.2.6.1.	TEMPERATURA ÓTIMA	90
4.2.6.2.	pH ÓTIMO	92
4.2.6.3.	ASPECTOS CINÉTICOS – K_M E $V_{MÁX}$	93
4.2.6.4.	ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DE TODAS AS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	95
4.2.7.	SEQUENCIAMENTO INTERNO DA A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.	96
4.3.	ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE A-GALACTOSIDASES PREVIAMENTE IDENTIFICADAS EM PLANTAS	98
V.	DISCUSSÃO	100
5.1.	DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E PICO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	100
5.2.	PURIFICAÇÃO DA A-GALACTOSIDASE DE SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.	101
5.3.	ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE A-GALACTOSIDASE PREVIAMENTE IDENTIFICADAS EM PLANTAS	110
VI.	CONCLUSÃO	113
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPÍTULO 2.		120
ESTRUTURA FINA DO GALACTOMANANO E A MODULAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE RESERVA EM SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> (CAV.) PERS.		120
I.	RESUMO	121
II.	INTRODUÇÃO	122
III.	MATERIAL E MÉTODOS	126
3.1.	MATERIAL VEGETAL	126
3.2.	EXTRAÇÃO DO MANANO E GALACTOMANANO	126
3.2.1.	EXTRAÇÃO DO MANANO DE RESERVA DAS SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> E <i>EUTERPE EDULIS</i>	127
3.2.2.	EXTRAÇÃO DO GALACTOMANANO DE RESERVA DAS SEMENTES DE <i>SESBANIA VIRGATA</i> , <i>SENNA ALATA</i> , <i>DIMORPHANDRA MOLLIS</i> , <i>CYAMOPSIS TETRAGONOLOB</i>	127
3.3.	ANÁLISE DE MONOSSACARÍDEOS	128

3.4.	<i>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDO-B-MANANASE E A-GALACTOSIDASES</i>	128
3.5.	<i>ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE (GALACTO)MANANO</i>	130
3.5.1.	<i>ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE (GALACTO)MANANO POR HPAEC-PAD (HIGH PERFORMANCE ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY WITH PULSED AMPEROMETRIC DETECTION)</i>	130
3.5.2.	<i>ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE (GALACTO)MANANO POR TLC (THIN LAYER CROMATOGRAPHY)</i>	131
3.6.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO GALACTOMANANO DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS. ATRAVÉS DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS COM ENDO-B-MANASE DE ASPERGILUS NÍGER (MEGAZYME), A-GALACTOSIDASE DE CYAMOPSIS TETRAGONOLOB (MEGAZYME) E A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS.</i>	131
3.6.1.	EXPERIMENTO I	132
3.6.2.	EXPERIMENTO II	133
3.6.3.	EXPERIMENTO III	134
3.6.4.	EXPERIMENTO IV	135
3.6.5.	EXPERIMENTO V	136
3.7.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO (GALACTO)MANANO DE 6 ESPÉCIES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE RAMIFICAÇÕES COM GALACTOSE</i>	137
IV.	RESULTADOS.....	138
4.1.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO GALACTOMANANO DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS. ATRAVÉS DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS COM ENDO-B-MANASE DE ASPERGILUS NIGER (MEGAZYME), A-GALACTOSIDASE DE CYAMOPSIS TETRAGONOLOB (MEGAZYME) E A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS.</i>	138
4.1.1.	EXPERIMENTO I	138
4.1.2.	EXPERIMENTO II	145
4.1.3.	EXPERIMENTO III	151
4.1.4.	EXPERIMENTO IV	154
4.1.5.	EXPERIMENTO V	156
4.2.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO (GALACTO)MANANO DE 6 ESPÉCIES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE RAMIFICAÇÕES COM GALACTOSE</i>	159
V.	DISCUSSÃO	165
5.1.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO GALACTOMANANO DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS. ATRAVÉS DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS COM ENDO-B-MANASE DE ASPERGILLUS NIGER (MEGAZYME[®]), A-GALACTOSIDASE DE CYAMOPSIS TETRAGONOLOB (MEGAZYME[®]) E A-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA DE SESBANIA VIRGATA (CAV.) PERS.</i>	165
5.2.	<i>ANÁLISE DA ESTRUTURA FINA DO (GALACTO)MANANO DE 6 ESPÉCIES COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE RAMIFICAÇÕES COM GALACTOSE</i>	179
VI.	CONCLUSÃO	181
VII.	BIBLIOGRAFIA	183
	DISCUSSÃO GERAL	185
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190
	ANEXO	198

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura e mobilização do galactano. (A) Estrutura do galactano mais frequente composto por ligações β -(1,4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16-21 resíduos da cadeia principal (não mostrada). Ainda existe um segundo tipo de galactano formado por ligações β -(1,3)(1,6). (B) Reações envolvendo a mobilização do polissacarídeo de reserva em *Lupinus sp.* β -(1,4)-D-galactano é o polímero dominante, sendo descrito como uma ramificação do rhamnogalacturanano, por vezes ramificado por ligações α -(1,5)-arabinano. Uma molécula de α -(1,3), (1,6)-D-galactano também está representado embora ocorre em quantidades menores. Neste sistema de degradação, apenas exoenzimas foram detectadas, uma das quais (exo- α -(1,4)-galactanase a partir de *Lupinus angustifolius*) é capaz de libertar a maior parte (cerca 60%) das paredes celulares intactadas da mesma espécie. In vivo, outras galactosidases e arabinosidases parecem agir no ramos deixando apenas rhamnogalacturonano. O destino dos produtos é meramente hipotético neste esquema. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000b) e Buckeridge *et al.* (2000c). 34

Figura 2: Estrutura e mobilização de xiloglucano de reserva de sementes. (A) Estrutura molecular do xiloglucano de reserva contendo cadeia principal de glucose unida por ligações β -(1,4), onde ocorrem ramificações regulares com xilose ligada α -(1,6). Algumas destas xiloses ainda podem apresentar ramificações por galactose ligadas α -(1,2). (B) Representação esquemática da degradação de reserva de xiloglucano em sementes. Uma sequência de XLGXLLGXXXGXXLG é usada como um exemplo de um segmento de um polímero de xiloglucano com a extremidade não-redutora voltada para a esquerda. O primeiro ataque é feita por xiloglucano-endo- β -transglicosilase (XET) e β -galactosidase (β -gal proveniente de *Nasturtium* apenas). Os oligossacáridos produzidos pela ação endo da XET são atacados por β -galactosidases (N β -gal=*Nasturtium* β -galactosidase; C β -gal= *Copaifera* β -galactosidase, o último sendo capaz de atacar oligossacarídeos apenas em certas posições (galactoses colocadas na ponta não-redutora). A α - xilosidase e a β -glucosidase agem em hidrólises alternadas do final não-redutor. (*) Em leguminosas (*Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*), após uma rodada de ação destas duas enzimas, a galactose estará novamente próximo do terminal não-redutor. Desata forma, a β -galactosidase pode agora agir sobre o oligossacarídeo XLG, libertando assim a galactose e permitindo a continuidade da ação das outras duas exo-glicosidases. Nestas duas espécies, a galactose retirada dos oligossacarídeos é possivelmente limitadora da degradação, pois a enzima possui um pH ótimo de 3,2, enquanto as demais enzimas possuem um pH ótimo de 4,5. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000c) e Buckeridge *et al.* (2000b). 37

Figura 3: Estrutura molecular do polissacarídeo galactomanano e explicação para a leitura das “abreviações” dos oligossacarídeos Gal^XMan_Y. (A) Cadeia principal linear de resíduos de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), na qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações α -(1,6), formando ramificações simples. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000a). (B) A cadeia principal de manose é numerada a partir da extremidade redutora (à direita). O número subscrito ligado à manose indica a quantidade de resíduos de manose que a cadeia principal do oligossacarídeo possui, enquanto o número sobrescrito ligado a galactose indica a posição do resíduo de galactose relativo ao resíduo de manose a partir da extremidade redutora (McCleary *et al.*, 1983). 40

Figura 4: Rotas bioquímicas envolvidas no catabolismo do galactomanano somado ao metabolismo pelo embrião dos monossacarídeos liberados na degradação da reserva. Quando a camada de aleurona não está presente, aparentemente as hidrolases são produzidas dentro das células endospermáticas e secretadas para fora da parede celular onde as mesmas vias metabólicas ocorrem. Man = manose; Gal = galactose; SPS = sacarose fosfato sintase; Man-6-P = manose-6-fosfato; Fru-6-P = frutose-6-fosfato; UDP-gal = uridina difosfatada de galactose; Suc-6-P = sacarose-6-fosfato. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000b). 44

Figura 5: Representação esquemática dos subsítios de reconhecimento ($\alpha - \epsilon$) e ligação da endo- β -mananase ao oligossacarídeo hipotético com 5 resíduos de manose (A-E) ligados β -(1,4). Figura retirada de McCleary & Matheson, 1983. 50

Figura 6: Porcentagem de germinação das sementes de *Sesbania virgata* (cav.) Pers. ao longo de 7 dias (168 horas) após a embebição. 76

Figura 7: Atividade enzimática específica da enzima α -galactosidase presente em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ao longo de 7 dias (168 horas) após a embebição..... 77

Figura 8: Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática da α -galactosidase em extrato bruto enzimático de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. após 4 dias de incubação em BOD. 78

Figura 9: Determinação do pH ótimo de atividade enzimática da α -galactosidase em extrato bruto enzimático de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. após 4 dias de incubação em BOD. 79

Figura 10: Padronização da etapa de purificação da Precipitação com Sulfato de Amônio. Determinação da saturação de sulfato de amônio responsável pela precipitação da enzima α -galactosidase através quantificação da atividade enzimática específica da α -galactosidase em extrato bruto e em cada precipitado ressuspensionado referente à utilização de uma porcentagem de saturação de sulfato de amônio. 80

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% do extrato bruto enzimático; precipitados ressuspensionados de 20%, 40%, 60% e 80% de saturação de sulfato de amônio e o descarte resultante da precipitação com sulfato de amônio, com cerca de 50 μ g de proteína nas amostras aplicadas. 81

Figura 12: Comparação da atividade enzimática da enzima α -galactosidase no: extrato bruto (Ext.Bruto); ressuspensionado do precipitado com 40% de saturação de Sulfato de Amônio (40%); ressuspensionado do precipitado com 80% de saturação de Sulfato de Amônio (80%); sobrenadante resultante da precipitação com 80% de saturação de Sulfato de Amônio (Descarte), após Primeira etapa de purificação: Precipitação com Sulfato de Amônio em 40% e 80% de saturação..... 82

Figura 13: Perfil cromatográfico da purificação em FPLC Äkta do extrato bruto enzimático submetido à coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). Identificação com letras (A-C) das frações coletadas que apresentaram atividade enzimática de α -galactosidase, onde: (A) Frações 47 a 51; (B) Frações 63 a 65; (C)

Frações 66 a 69. (—) Perfil proteico quantificado por UV; (—) Gradiente de NaCl variando de 0-0.5M em 12 volumes de coluna (||) Frações coletadas com seus respectivos números. 83

Figura 14: Atividade enzimática da α -galactosidase expressa em absorbância a 405nm das frações coletadas durante a purificação em FPLC Äkta do extrato bruto enzimático submetido à coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (a) Frações 47 a 51; (b) Frações 63 a 65; (c) Frações 66 a 69. 84

Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 das frações reunidas 47 a 51 (pico A) após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (→) Banda proteica concentrada de tamanho esperado para α -galactosidase. 85

Figura 16: Perfil cromatográfico da purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare) das frações previamente semipurificadas (frações 47 a 51) em coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). Identificação com letra (D) das frações coletadas que apresentaram atividade enzimática de α -galactosidase, onde: (D) Frações 30-33. (—) Perfil proteico por quantificação por UV; (—) Gradiente de NaCl variando de 0-0.5M em 12 volumes de coluna; (||) Frações coletadas com seus respectivos números. 86

Figura 17: Atividade enzimática da α -galactosidase expressa em absorbância a 405nm das frações coletadas durante a purificação em FPLC Äkta, utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare), da amostra semipurificada em coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (D) Frações 30 a 33. 87

Figura 18: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 das frações reunidas 30 a 33 (pico D) após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (Pharmacia Biotech). (→) Banda proteica concentrada de tamanho esperado para α -galactosidase. 88

Figura 19: Determinação da temperatura ótima da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. 91

Figura 20: Determinação da temperatura ótima da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). 92

Figura 21: Determinação do pH ótimo da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. 93

Figura 22: Determinação do pH ótimo da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme). 93

Figura 23: Curva de saturação do substrato 4-Nitrofenil-D-Galactopiranosídeo na presença da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos com o PNP- α -Gal nas seguintes concentrações (mM): 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10; 13; 15; 17; 20; 25; 30. A partir dos dados coletados foi calculado o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. 94

Figura 24: Curva de saturação do substrato 4-Nitrofenil-D-Galactopiranosídeo na presença da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos com o PNP- α -Gal nas seguintes concentrações (mM): 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10; 13; 15; 17; 20; 25. A partir dos dados coletados foi calculado o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®)..... 95

Figura 25: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 de todas as etapas de purificação. (A) Extrato bruto enzimático; (B) Precipitado de 80% de Sulfato de Amônio (ressuspendido em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,8); (C) Alíquota das frações reunidas após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de troca-iônica aniônica (Mono-Q); (D) Alíquota das frações reunidas após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare)..... 96

Figura 26: Identificação com números, de 1 a 8, das bandas recortadas do gel de poliacrilamida 12% submetidas ao sequenciamento interno para identificação das proteínas, principalmente da α -galactosidase, juntamente com a determinação da sequência interna da α -galactosidase semipurificada de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. 97

Figura 27: Análise das sequências de aminoácidos 35 de α -galactosidase de plantas conjuntamente com a sequência dos fragmentos de α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. semipurificada determinados por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF). Grupos identificados por letras estão de acordo com a filogenia: (A – vermelho) Fabaceae; (B - rosa) Fabaceae; (C – azul escuro) Fabaceae; (D - verde) Rubiaceae; (E – roxo) Poaceae; (F – azul claro) Pinaceae. A coloração dos ramos é a mesma da árvore de relação das 35 sequências de aminoácidos somente localizada na figura 46 do anexo, no entanto, a identificação pelas letras é diferente, ou seja, os ramos coloridos por cada cor são os mesmos em ambas as árvores, mas a letra que o identifica não é a mesma. (•) Bootstrap > 95, ou seja, em 95% ou mais das 1000 árvores de relação geradas os ramos marcados com (•) ficaram agrupados como mostrado nesta árvore de relação..... 99

Figura 28: Análise em HPAEC-PAD (Dionex) com coluna PA-100 dos oligossacarídeos formados após hidrólise enzimática exaustiva com Endo- β -mannanase do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., visando verificar perfil dos oligossacarídeos produto da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mannanase. (F1) dissacarídeos a decassacarídeos galactosilados ou não base do polissacarídeo; (F2) combinação aos pares dos oligossacarídeos de F1; (F3) combinação aos trios dos oligossacarídeos de F1. 139

Figura 29: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U. (I) Controle (galactomanano sem endo-B-mananase); (II) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 0,005U; (III) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 0,05U; (IV) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 1U; (V) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 0,05U; (VI) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -

mananase nas concentrações de 0,005U e 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,05U e 1U. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3) e/ou trissacarídeo (G^1M_2); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios..... 141

Figura 30: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do manano comercial (Megazyme[®]) com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U, 0,05U e 1U. (I) Controle (manano sem endo- β -mananase); (II) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 0,005U; (III) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 0,05U; (IV) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 1U; (V) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 0,05U; (VI) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,05U e 1U. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$). Os oligossacarídeos identificados A-F são denominados oligossacarídeos F1. 144

Figura 31: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. dos oligossacarídeos produto da hidrólise do galactomanano a 1% de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U, 0,05U e 1U (*Experimento I*). (I) Controle (galactomanano a 1% sem enzima); (II) Controle (galactomanano a 1% com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.; (III) Controle (galactomanano a 1% com celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme[®])); (IV) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,005U; (V) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,05U; (VI) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,005U de endo- β -mannanase; (VIII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no Experimento I e Experimento II na concentração de 0,05U de endo- β -mannanase; (IX) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 1U de endo- β -mannanase. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos (possíveis oligossacarídeos presentes: $G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$,

$G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$); (K-L) octassacarídeos e nonassacarídeos sem ramificação; (M) oligossacarídeos >10 resíduos de manose (possivelmente resultado da desramificação do pico I). Os oligossacarídeos identificados A-M são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios..... 149

Figura 32: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 1U com acréscimo ou não da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (I) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase a 1U; (II) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 1U/mL e α -galactosidase de semipurificada *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL; (III) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com α -galactosidase semipurificada *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL; (IV) Controle (galactomanano sem enzima). (Gal) Galactose; (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios..... 154

Figura 33: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U e 1U e α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL. (I) Galactomanano a 1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (II) Galactomanano a 0,1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (III) Galactomanano a 1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (IV) Galactomanano a 0,1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose(M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios. 155

Figura 34: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do manano comercial (Megazyme[®]) com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U, 0,05U e 1U e α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* comercial (Megazyme[®]) a 0,5U/mL. (I) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 0,005U de endo- β -mananase; (II) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 0,05U de endo- β -mananase; (III) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 1U de endo- β -mananase;

(IV) injeção com padrão de manose; (V) injeção com padrão de galactose. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$). Os oligossacarídeos identificados A-F são denominados oligossacarídeos F1. 158

Figura 35: Análise por *Thin Layer Chromatography* (TLC) dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise enzimática exaustiva com endo- β -mannanase (Megazyme[®]) das 6 espécies estudadas. (A) *Euterpe edulis* (150:1); (B) *Coffea arabica* (40:1); (C) *Dimorphandra mollis* (2:1); (D) *Senna alata* (2:1); (E) *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (1:1); (F) *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1). (→) Oligossacarídeos exclusivo de 1 ou mais espécies: (→1, 2) exclusivo de *Cyamopsis tetragonoloba*; (→3) exclusivo de *Sesbania virgata* e *Cyamopsis tetragonoloba*; (→) Comparação dos oligossacarídeos formados entre as espécies (A e B) com reserva de manano: (→1, 2, 3) exclusivo de *Euterpe edulis*; (→4) exclusivo de *Coffea arabica*. (*→) Oligossacarídeos exclusivos das espécies com reserva de manano. (Chave vermelha) Oligossacarídeos e suas combinações em pares (F2) e em trios (F3) exclusivos de espécies com reserva de galactomanano. 162

Figura 36: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática exaustiva com endo- β -mannanase (Megazyme[®]), das 6 espécies estudadas. (A) *Euterpe edulis* (150:1); (B) *Coffea arabica* (40:1); (C) *Dimorphandra mollis* (2:1); (D) *Senna alata* (2:1); (E) *Sesbania virgata* (1:1); (F) *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1). (a) manose; (b) galactose; (c) manobiose; (d) manotriose; (f-h, j-m) oligossacarídeos ainda não-identificados; (i) combinações aos pares e aos trios dos oligossacarídeos identificados (c-h, j-m). Os oligossacarídeos identificados a-h e j-m são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos identificados por i são denominados F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios. 164

Figura 37: Explicação para a leitura das “abreviações” dos oligossacarídeos Gal^XMan_y . A cadeia principal de manose é numerada a partir da extremidade redutora (à direita). O número subscrito ligado à manose indica a quantidade de resíduos de manose que a cadeia principal do oligossacarídeo possui, enquanto o número sobrescrito ligado a galactose indica a posição do resíduo de galactose relativo ao resíduo de manose a partir da extremidade redutora (McCleary et al., 1983). 177

Figura 38: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 1 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. As proteínas realssadas pelo retângulo preto fazem referência a α -galactosidases. 198

Figura 39: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 2 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade

dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. As proteínas realssadas pelo retângulo preto fazem referência a α -galactosidases. 199

Figura 40: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 3 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 200

Figura 41: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 4 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 201

Figura 42: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 5 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 202

Figura 43: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 6 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 203

Figura 44: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 7 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 204

Figura 45: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 8 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase. 205

Figura 46: Análise de 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidase de plantas. Grupos identificados por letras estão de acordo com a filogenia: (A – azul escuro) Fabaceae; (B - verde) Rubiceae; (C - amarelo) Solanaceae; (D - vermelho) Fabaceae; (E – azul claro) Pinaceae; (F – roxo) Poaceae. (•) *Bootstrap* > 95, ou seja, em 95% ou mais

das 1000 árvores de relação geradas os ramos marcados com (•) ficaram agrupados como mostrado nesta árvore de relação. 206

Figura 47: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) dos oligossacarídeos produto da hidrólise do galactomanano a 1% de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U (Experimento I). (I) Controle (galactomanano a 1% sem enzima); (II) Controle (galactomanano a 1% com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®)); (III) Controle (galactomanano a 1% com celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme®)); (IV) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,005U; (V) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,05U; (VI) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,005U de endo- β -mananase; (VIII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,05U de endo- β -mananase; (IX) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 1U de endo- β -mananase. (A) Manobiose (M_2); (B) Manotriose (M_3) e/ou trissacarídeo G^1M_2 ; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos (possíveis oligossacarídeos presentes: $G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$); (K-L) octassacarídeos e nonassacarídeos sem ramificação; (M) oligossacarídeos >10 resíduos de manose (possivelmente resultado da desramificação do pico I). Os oligossacarídeos identificados A-M são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios. 208

Figura 48: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 1U com acréscimo ou não da α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). (I) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase a 1U; (II) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 1U/mL e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (III) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (IV) Controle (galactomanano sem enzima). (Gal) Galactose; (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3) e/ou G^1M_2 ; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios 209

Figura 49: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U e 1U e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL. (I) Galactomanano a 1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL; (II) Galactomanano a 0,1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL; (III) Galactomanano a 1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL; (IV) Galactomanano a 0,1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL. (A) manobiose (M₂); (B) manotriose (M₃) e/ou trissacarídeo G¹M₂; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M₄ e/ou G¹M₃); (D) pentassacarídeos (manopentose – M₅ e/ou G¹M₃ e/ou G³M₄); (E) hexassacarídeos (manohexose – M₆ e/ou G^{1,3}M₄ e/ou G⁴M₅ e/ou G³M₅); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M₇ e/ou G^{3,4}M₅); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos (G^{1,3,4}M₅; G^{4,5}M₆; G^{3,4}M₆; G^{3,4,5}M₆; G^{1,4,5}M₆; G^{1,3,4}M₆ e/ou G^{4,5}M₇). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios..... 210

Índice de Tabelas

Tabela 1: Tabela de purificação da α -galactosidase de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers. desenvolvida após a realização das três etapas de purificação: precipitação com Sulfato de Amônio 80%, Cromatografia de troca-iônica aniônica (Mono-Q) e Cromatografia de gel filtração (Superose).	90
Tabela 2: Comparação da razão F1/F2 do <i>Experimento I</i> (hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase) com a razão do <i>Experimento II</i> (hidrólise dos oligossacarídeos do <i>Experimento I</i> somente com α -galactosidase semipurificada de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers.).	147
Tabela 3: Comparação das razões Manobiose (M_2)/Trissacarídeo (M_3 e/ou G^1M_2) (M_2/M_3) e Trissacarídeo (M_3 e/ou G^1M_2)/Tetrassacarídeo (M_4 e/ou G^1M_3) (M_3/C) dos <i>Experimentos I e II</i>	150
Tabela 4: Razão manose:galactose das 6 espécies estudadas determinada pela análise de monossacarídeos em HPAEC-PAD (Dionex). Apresentado por ordem crescente na quantidade de substituições de galactose: Manano (<i>Euterpe edulis</i> ; <i>Coffea arábica</i>); Galactomanano de proporção 2:1, ou seja, a cada 2 manose existe a ramificação por 1 galactose (<i>Dimorphandra mollis</i> ; <i>Senna alata</i>); Galactomanano de proporção 1:1, ou seja, teoricamente todo o polissacarídeo é substituído por galactose (<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> ; <i>Sesbania virgata</i>)	160
Tabela 5: Oligossacarídeos produzidos na hidrólise do galactomanano de goma caroba, razão manose:galactose 4:1 pelas endo- β -mananase de <i>Aspergillus niger</i> e de sementes de <i>Medicago sativa</i> (alfafa). O final redutor da molécula está sempre a esquerda, manose denominada de 1. (#) O subscrito indica a quantidade de resíduos de manose o oligossacarídeo possui em sua cadeia principal, enquanto o sobrescrito indica a posição da substituição da galactose na cadeia relativa ao final redutor da molécula; (*) As estruturas dos oligossacarídeos >7 resíduos produzidos pela hidrólise da endo- β -mananase de <i>M. sativa</i> não foram caracterizadas. Estes oligossacarídeos representam 26,9% do total de oligossacarídeos produzidos. (-) Oligossacarídeos não produzidos pela hidrólise da endo- β -mananase de <i>Aspergillus niger</i> por esta ser mais inespecífica em sua ação, conseguindo “triblar” a presença de ramificação com galactose diminuindo o tamanho do oligossacarídeo. Tabela retirada e adaptada de McCleary <i>et al.</i> (1983)	168
Tabela 6: Identificação das possíveis estruturas dos oligossacarídeos de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers. componentes dos picos A-F de acordo com a comparação do tempo de retenção real e o tempo de retenção teórico e os oligossacarídeos caracterizados e identificados por McCleary <i>et al.</i> (1983) (Tabela 5).	176

RESUMO

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. Os galactomananos são polissacarídeos constituídos de uma cadeia principal de resíduos de D-manose ligadas β -1,4, ramificada por resíduos de D-galactose α -1,6 ligados. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas (α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase). A α -galactosidase é a primeira enzima atuar sobre o galactomanano hidrolisando as ligações α -1,6 das galactoses ramificadas a cadeia principal de manano (ligados β -1,4), permitindo a ação da endo- β -mananase, que hidrolisará o polissacarídeo a oligossacarídeos, onde a β -manosidase atuará (ligações β -1,4), transformando oligossacarídeos a monossacarídeos a serem utilizados no desenvolvimento do embrião. Buscando a compreensão das características da α -galactosidase e modo de ação sobre o galactomanano, procedeu-se com a purificação, em três etapas, e caracterização bioquímica (pH ótimo, temperatura ótima e aspectos cinéticos) da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Além disso, visando evidenciar a modulação da enzima endo- β -mananase pela distribuição de ramificações de galactose no galactomanano (estrutura fina do galactomanano), procedeu-se com hidrólises enzimáticas do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. utilizando a enzima endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) somente ou em conjunto com a α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Capítulo 1) ou com a α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]), seguido de análise dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*). Também procedeu-se com hidrólises enzimáticas de galactomananos de 6 espécies com razão manose:galactose variando de 1:1 a 150:1 com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) e análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD. A α -galactosidase semipurificada possui, aproximadamente, 42 kDa de peso molecular em condições desnaturantes e, aproximadamente 72 kDa de peso molecular na forma nativa, sugerindo que a enzima assum

estrutura quaternária. A temperatura ótima apresentada se encontra na faixa de 50°C a 55°C, pH ótimo na faixa de 4,4 a 5,4, $K_m = 1,8276 \text{ mM}$ e a velocidade máxima de $0,5024 \mu\text{molGal.min}^{-1}.\text{mgprot}^{-1}$. A espectrometria de massas gerou os fragmentos: ALADYV-HSK-RMPGSLGHEE-QDAK-TT-GDIEDNWNSM-TSIADS NDKW-ASYAGPGGWN-DPDMLEVGNG-GMTTEEYR-AP-LLVGCDIR-VAVIL-WNR, estando a proteína referente a esta sequência relacionada à mobilização de reserva. Durante a purificação e sequenciamento interno da α -galactosidase e demais proteínas foram detectadas isoformas da α -galactosidase de pesos moleculares variados (42 kDa a 20 kDa). Sugere-se que estas isoformas encontradas inicialmente na purificação estejam relacionadas com outras funções da α -galactosidase, enquanto as isoformas encontradas após todas as etapas de purificação e identificação por espectrometria de massas estejam relacionadas com ativação e adaptação da α -galactosidase durante todo o processo de mobilização de reservas. Os dados gerados das comparações dos oligossacarídeos produzidos em cada hidrólise sugerem que as ramificações do galactomanano podem modular o reconhecimento de sítios de clivagem pela endo- β -mananase: (1) existe a produção de oligossacarídeos limites de digestão F1, F2 e F3 após hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase, como demonstrado para xiloglucanos; (2) os oligossacarídeos F1 possuem proporções distintas quando da hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase em diferentes concentrações (Exp I e EXP IV), evidenciando preferência por sítios com menor grau de galactosilação; (3) a presença da α -galactosidase diminui a produção dos oligossacarídeos F2 e F3, mostrando que estes não possuem resistência intrínseca a hidrólise e que a reação atinge o equilíbrio mesmo quando ainda existem sítios de clivagem ainda disponíveis (EXP III); (4) polissacarídeos com estruturas diferentes, razão manose:galactose variando entre 150:1 a 1:1, são digeridos em diferentes taxas de hidrólise pela mesma enzima, evidenciando que a ramificação com galactose dificulta a ação da endo- β -mananase. Dessa forma, sugere-se que a estrutura do polissacarídeo galactomanano também contenha, pelo menos, parte da informação requerida para seu próprio metabolismo, código para a sua degradação, estando esta informação contida na distribuição das ramificações com resíduos de D-galactose. Sendo assim, sugere-se que as diferentes isoformas da α -galactosidase relacionadas à

degradação da reserva de galactomanano de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seriam produto da ação proteolítica da própria enzima a fim de melhorar a afinidade da α -galactosidase ao substrato durante o processo de mobilização de reserva. O aumento da afinidade da α -galactosidase ao substrato durante todo o processo de mobilização garantiria a liberação das ramificações com galactose de forma contínua, permitindo e aumentando a eficiência da ação da enzima endo- β -mananase aos sítios de clivagem, garantindo a degradação do polissacarídeo a oligossacarídeos de forma regulada, passível de bloqueio, pelo acúmulo de oligossacarídeos e galactose livre que inibem a ação das enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase, respectivamente, e dificultando a ação de microorganismos, propiciando ao embrião a maior quantidade de açúcares para o seu desenvolvimento, aumentando as chances de sucesso no estabelecimento da plântula.

ABSTRACT

The seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. have an endosperm which accumulates galactomannan as a storage polysaccharide in the cell walls. Galactomannans are composed of a linear backbone of β -(1,4)-linked D-mannose residues with D-galactose α -(1,6)-linkages substitutions. The galactomannans are hydrolysed after protrusion of the radicle. This process is performed by three enzymes (α -galactosidase, endo- β -mannanase and exo- β -mannosidase). The α -galactosidase is the first enzyme to cleave the polysaccharides, removing the D-galactose residues, allowing the performance of the endo- β -mannanase, which hydrolyses the mannan backbone to mannan oligosaccharides. The last part of the process includes exo- β -mannosidase, that cleaves the mannan oligosaccharides to mannose residues, which could be used by the embryo during growth. Aiming at understanding the function of α -galactosidase in the process of galactomannan degradation, we studied its mode of action on mannans and galactomannans. The α -galactosidase of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. was purified and characterized (pH and temperature optimum and the enzyme kinetics). We found that the semipurified α -galactosidase molecular weight was 42kDa at denaturing conditions, but in native conditions was 72kDa, suggesting that the enzyme has a quaternary structure. The enzyme optimum pH was between 4,4-5,4, optimum temperature between 50°C-55°C, $K_m = 1,8276 \text{ mM}$ and $V_{max} = 0,5024 \text{ } \mu\text{molGal.min}^{-1}.\text{mgprot}^{-1}$. Mass spectrometry measures resulted the following fragments: ALADYV-HSK-RMPGSLGHEE-QDAK-TT-GDIEDNWNSMTSIADS-NDKW-ASYAGPGGWN-DPDMLEVGNG-GMTTEEYR-AP-LLVGCDIR-VAVIL-WNR, being the protein from this sequence related with storage mobilization. Possible α -galactosidase isoforms were detected during the purification, suggesting other functions for the enzyme. The α -galactosidase isoforms detected after all purification steps and with measured mass spectrometry (from 42kDa to 20kDa) should be related to the storage mobilization. We suggest that the α -galactosidase isoforms in *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seeds represents products of the enzyme self-digestion, this process being correlated with the enzyme/polysaccharide affinity and at last, correlated to the galactomannan mobilization. An extract semipurified from *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. and

enriched with α -galactosidase activity, was used along with endo- β -mannanase from *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) or both endo- β -mannanase and α -galactosidase (semipurified from *Sesbania virgata* seeds – Chapter 1- or commercial enzyme from *Cyamopsis tetragonoloba* – Megazyme[®]) were used to study the fine structure of galactomannans. Hydrolysis of galactomannans from six species with different mannose:galactose (1:1 to 150:1) ratio were performed with endo- β -mannanase from *Aspergillus niger*. The oligosaccharides from all hydrolysis were analyzed by HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection). The hydrolysis fragments data (HPAEC-PAD) suggest that the side-chains of the polysaccharides can modulate the hydrolytic sites recognition on the galactomannan by the endo- β -mannanase. This conclusion is supported by: (1) the presence of limited digest oligosaccharides F1 and dimmers (F2) and trimers (F3) of the F1 oligosaccharides; (2) the presence of different F1 oligosaccharides proportions after hydrolysis with endo- β -mannanase at different concentrations, showing preference on less-branched hydrolytic sites; (3) the α -galactosidase digestion avoided the accumulation of oligosaccharides F2 and F3, showing that these oligosaccharides do not present intrinsic resistance to hydrolysis and that the reaction reaches an equilibrium even when sites of hydrolysis are still available; (4) polymers with different fine structure (ratio mannose:galactose 1:1 to 150:1) were hydrolysed at different rates by the endo- β -mannanase, showing that galactose branching interferes on the enzyme action. Considering that, the branching pattern of the polysaccharide seems to have direct influence on the interaction of the enzyme with substrate; we suggest that the structure of the galactomannan holds part of information required for its own degradation. The higher enzyme x substrate affinity, ensure the galactose branches digestion, improving the endo- β -mannanase action, ensuring the degradation of the polysaccharides to oligosaccharides. This highly regulated degradation process prevents microorganisms predation and increases the plantlet establishment.

INTRODUÇÃO

Uma das mais espetaculares inovações que surgiram durante a evolução das plantas vasculares (Angiospermas e “Gimnospermas”) foi a semente. Estima-se que o surgimento tenha ocorrido no Devoniano Superior há pelo menos 365 milhões de anos. A semente é um dos principais fatores responsáveis pela dominância das plantas na flora atual, e essa dominância cresceu ao longo de um período de milhões de anos (Raven, 2001). Este sucesso deve-se ao fato das sementes possuírem uma grande capacidade de sobrevivência quando comparada com esporos livres, devido à proteção que esta confere ao embrião, além dos recursos nela armazenados para os estágios de germinação e estabelecimento (Raven, 2001).

1.1. Sementes

Nas Angiospermas, o surgimento da semente ocorre com a dupla fecundação, onde uma das duas células espermáticas fecunda o óvulo (oosfera), dando origem ao zigoto diploide e, conseqüentemente, o embrião; enquanto a outra célula espermática se funde com dois núcleos polares do saco embrionário, originando o endosperma triploide (Raven, 2001; Beltrati & Paoli, 2003).

A semente durante o seu desenvolvimento contém: embrião (resultado da fusão da oosfera com uma célula espermática), endosperma (provém da fusão de dois núcleos polares e uma célula espermática), perisperma (resultado do desenvolvimento do nucelo) e tegumento (formado por um ou ambos integumentos ao redor do óvulo) (Bewley & Black, 1994). Enquanto todas as sementes maduras contêm o embrião e muitas continuam envolvidas pelo tegumento, a persistência do endosperma ou perisperma varia de espécie para espécie. Portanto, a persistência das partes contidas durante o desenvolvimento da semente não é certa na semente madura (Bewley & Black, 1994; Beltrati & Paoli, 2003).

1.2. *Germinação e Pós-Germinação*

A germinação das sementes se inicia com a entrada de água na semente, processo denominado embebição, e culmina com o início do alongamento do eixo embrionário, normalmente a emissão da radícula (Bewley & Black, 1994).

Durante o período compreendido entre a embebição e a emissão da radícula, numerosos eventos ocorrem dentro da semente, como a hidratação de proteínas, mudanças na estrutura subcelular, produção de macromoléculas entre outros, que conjuntamente promovem a germinação (Bewley & Black, 1994).

Dessa forma, a germinação pode ser dividida em três fases: embebição, aumento do metabolismo e iniciação do alongamento do eixo embrionário (Bewley, 1997).

Entretanto, para que a germinação ocorra se faz necessária não só a presença de água, mas também de outras condições ambientais favoráveis como: temperatura adequada, presença de oxigênio, ausência de substâncias inibidoras e algumas vezes até da luminosidade (Bewley & Black, 1994; Raven, 2001, Taiz & Zeiger, 2004).

Embora sejam necessárias condições ambientais favoráveis, propriedades intrínsecas da semente podem impedir a sua germinação, por não permitirem a entrada de água na semente. Nesses casos é necessário o rompimento do tegumento da semente, pela escarificação, por exemplo, para permitir a entrada de água e, portanto, a germinação (Labouriau, 1983).

Dessa forma, os eventos ocorridos durante esse período de germinação são responsáveis pela reativação do metabolismo, outrora reduzido, culminando no crescimento do embrião (Bewley & Black, 1994).

A reativação do metabolismo é suprida de energia, normalmente, por açúcares solúveis de reserva, como a sacarose ou oligossacarídeos da série rafínosica, pois esses podem ser rapidamente metabolizados provendo energia para divisões e alongamentos celulares necessários para a protrusão da radícula. No entanto, no período pós-germinativo, compreendido pelo desenvolvimento inicial da plântula até o seu estabelecimento como organismo autotrófico (estabelecimento da fotossíntese), a energia, bem como as

necessidades de carbono e nitrogênio, são supridas pela reserva de polissacarídeos. Como as necessidades nesta fase são muito grandes a reserva de polissacarídeos geralmente aparece em maior proporção (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Assim, as sementes possuem dois tipos de reserva: açúcares solúveis e polissacarídeos, sendo esse último melhor discutido a seguir, pois é parte do tema principal deste trabalho.

1.3. Reservas de sementes

As Angiospermas apresentam diferentes estratégias de adaptação aos seus respectivos ambientes, entre as quais se encontram o acúmulo de certos compostos em suas sementes (Buckeridge *et al.*, 2000c). As reservas das sementes possuem basicamente duas funções que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula autotrófica: fonte de energia (manter processos metabólicos em funcionamento) e fonte de matéria (carbono e nitrogênio para a construção de tecidos vegetais que irão formar a plântula) (Buckeridge *et al.*, 2004a; Buckeridge *et al.*, 2000c).

Muitos dos tecidos da semente podem funcionar como armazenadores de reservas, por exemplo: perisperma e eixo embrionário. Entretanto, os cotilédones e o endosperma são as principais estruturas de armazenamento em sementes de Angiospermas (Bewley & Black, 1994). Embora alguns endospermas contenham, principalmente, reserva de lipídeos e proteínas, a maioria parece armazenar carboidratos, sendo eles o amido, normalmente presente em cereais, e polissacarídeos de parede celular (por exemplo, galactomananos) em Leguminosae (Bewley & Black, 1994).

Por outro lado, os cotilédones são relativamente mais generalistas, podendo armazenar: proteínas, carboidratos e lipídeos (Bewley & Black, 1994).

Os produtos de degradação de lipídeos e carboidratos são utilizados na geração de energia e produção de matéria-prima para a construção de novos tecidos e células. Buckeridge (1993) e Buckeridge *et al.* (2004a) discutem que a maioria das sementes que armazena carboidratos em grandes quantidades,

não armazena lipídeos, de tal forma que essas substâncias são mutuamente exclusivas.

Neste contexto, as proteínas possuem como função o armazenamento de nitrogênio e enxofre, elementos essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários da plântula em crescimento (Buckeridge *et al.*, 2004a).

1.4. Parede celular de reserva de sementes

Os modelos mais recentes de parede celular propõem que esta seja uma matriz complexa e espessa com diferentes papéis fisiológicos, formada, normalmente, por três domínios independentes, mas que interagem entre si (McCann & Roberts, 1991; Carpita & Gilbeaut, 1993; Carpita & McCann, 2000).

O domínio fundamental da parede celular é formado por microfibrilas de celulose, envolvidas por hemiceluloses, essas últimas podendo estar fortemente ou fracamente ligadas às fibras de celulose por pontes de hidrogênio (Buckeridge *et al.*, 2000c).

A interação celulose-hemicelulose está imersa no segundo domínio da parede celular, a matriz péctica, composta de polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos. Esse domínio consiste na região mais hidratada da parede celular se comparada com o domínio celulose-hemicelulose (Buckeridge *et al.*, 2000c; Carpita & McCann, 2000).

O último domínio é denominado domínio protéico, este sendo composto entre outras proteínas, por proteínas estruturais e enzimas, que operam sobre os polímeros estruturais (Buckeridge *et al.*, 2008). Entre as ações conhecidas, o domínio protéico age na mobilização dos polissacarídeos de reserva da parede celular (Carpita & McCann, 2000).

A rede formada por celulose e hemicelulose fornece força tensora, enquanto que a rede péctica relaciona-se com a resistência a compressão (Jarvis & McCann, 2000).

O modelo descrito acima, também pode ser aplicado à parede celular de reserva. Entretanto, o modelo sofre uma variação, onde um domínio, ou mesmo um de seus polissacarídeos, tenha sido depositado em maior quantidade em relação aos demais. Aparentemente, a parede celular de

reserva constitui uma adaptação evolutiva da parede primária, que desenvolveu a capacidade de armazenar quantidades apreciáveis de carboidratos (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Os polímeros de reserva armazenados na parede celular podem ser de origem pética ou hemicelulósica. Dentre as hemicelulósicas, reconhecem-se: mananos (mananos puros, galactomananos e glucomananos) e xiloglucanos, enquanto os de origem pética os arabinogalactanos (Buckeridge *et al.*, 2000c).

A alta deposição de uma dessas substâncias nas paredes celulares de reserva é acompanhada de pouca ou nenhuma quantidade de celulose juntamente com os demais polissacarídeos. Essa baixa proporção de celulose facilita o processo de mobilização das reservas, o qual seria consideravelmente mais complexo se proporções normais de celulose estivessem presentes (Buckeridge *et al.*, 2000c; Buckeridge *et al.*, 2004b).

1.5. Polissacarídeos de reserva de parede celular

Os polissacarídeos de reserva presentes na parede celular das sementes são denominados PRPC (Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.*, 2000b). Esses polissacarídeos são mobilizados após a germinação e os produtos de sua degradação garantem o desenvolvimento do embrião à plântula, suprindo-a com energia e matéria-prima para a construção de órgãos e tecidos até que a plântula se torne autotrófica (Reid, 1985a; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975; Buckeridge *et al.*, 2004b).

Os PRPC possuem características que os fazem mais convenientes para o metabolismo celular: serem relativamente inertes ao que concerne a sua reatividade e possuírem diferentes graus de solubilidade em água. Essas características conferem alta compactação e baixa reatividade do polímero, tornando possível a existência de um “compartimento celular”, a parede celular, que permite um fluxo de água com um grau de liberdade considerável (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Porém, o custo de produção desses polímeros é alto, pois, tais compostos necessitam de um complexo sistema de biossíntese, secreção e montagem no meio extracelular (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Em 1996, Buckeridge e Reid propuseram que os PRPC poderiam ter passado por etapas de transferência de funções ao longo da evolução, os quais seriam parte das transformações que levaram à formação de uma parede de reserva a partir da parede primária. Muitas das funções primordiais da parede primária ainda se mantêm: dureza (mananos em endospermas de sementes de palmeiras, tomate e alface), relações hídricas (xiloglucanos em cotilédones e galactomananos em endospermas de sementes de leguminosas) e no controle da expansão celular (galactanos nos cotilédones de lupino e, em menor proporção, em sementes de soja e feijão) (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Os polissacarídeos de parede são classificados em três grupos: mananos, xiloglucanos e os (arabino)galactanos. O grupo dos mananos engloba os mananos puros, glucomananos e galactomananos (Buckeridge *et al.*, 2000c), sendo esse último melhor discutido a seguir.

1.5.1. (Arabino)Galactanos

A primeira identificação do galactano como polissacarídeo de reserva de semente foi realizado por Hirst *et al.* (1947) em sementes de *Lupinus albus* (lupino), onde com base na determinação estrutural, conclui-se que o polissacarídeo possuía cadeia principal de galactose unidas por ligações β -(1,4).

Em um estudo mais recente realizado por Al-Kaisey & Wilkie (1992) com o galactano de quatro espécies de lupino determinou-se a existência de dois de galactanos: formado por ligações β -(1,3),(1,6) com algumas ligações β -(1,4), e outro, mais frequente, composto por ligações β -(1,4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16 a 21 resíduos da cadeia principal (Figura 1).

A mobilização dos galactanos de reserva de *Lupinus angustifolius* foi descrita por Crawshaw & Reid (1984) e as alterações estruturais do galactano que acompanham o processo foram descritas por Parker (1984), onde após a mobilização a maior parte das ramificações com galatose e arabinose é removida da parede celular, permanecendo um material residual enriquecido em ramnose, ácido urônico e glucose (Figura 1).

Matheson & Saini (1977) reportaram a presença de duas α -arabinosidases e três β -galactosidases em cotilédones de *Lupinus luteus*, cujas

atividades de ambas as enzimas se mostraram relacionadas à expansão cotiledonar.

Figura 1: Estrutura e mobilização do galactano. (A) Estrutura do galactano mais frequente composto por ligações β -(1,4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16-21 resíduos da

cadeia principal (não mostrada). Ainda existe um segundo tipo de galactano formado por ligações β -(1,3)(1,6). (B) Reações envolvendo a mobilização do polissacarídeo de reserva em *Lupinus sp.* β -(1,4)-D-galactano é o polímero dominante, sendo descrito como uma ramificação do rhamnogalacturanano, por vezes ramificado por ligações α -(1,5)-arabinano. Uma molécula de α -(1,3), (1,6)-D-galactano também está representado embora ocorre em quantidades menores. Neste sistema de degradação, apenas exoenzimas foram detectadas, uma das quais (exo- α -(1,4)-galactanase a partir de *Lupinus angustifolius*) é capaz de libertar a maior parte (cerca 60%) das paredes celulares intactadas da mesma espécie. In vivo, outras galactosidases e arabinosidases parecem agir no ramos deixando apenas rhamnogalacturonano. O destino dos produtos é meramente hipotético neste esquema. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000b) e Buckeridge *et al.* (2000c).

Buckeridge & Reid (1994) isolaram uma exo- β -(1,4)-galactanase dos cotilédones de *Lupinus angustifolius* e, em 1996, propuseram um modelo hipotético de degradação dos galactanos.

Neste modelo de degradação (Buckeridge *et al.*, 2000b), a exo- β -(1,4)-galactanase é apontada com a enzima chave da mobilização do galactano, sendo capaz de hidrolisar 82% das unidades de galactose da cadeia principal do polímero, bem como cerca de 63% das galactoses presentes no polímero em paredes celulares intactas. Os produtos da degradação, arabinose e galactose livres podem ser utilizados na produção de sacarose para utilização pelo embrião em desenvolvimento (Buckeridge *et al.*, 2000b).

O galactano é uma molécula de múltiplas funções, exercendo tanto a função de reserva de parede celular, como também, sendo um importante elemento na modulação da expansão cotiledonar durante o desenvolvimento da plântula.

1.5.2. Xiloglucanos

O xiloglucano é uma das principais hemiceluloses presentes em paredes celulares de dicotiledôneas, também podendo ser acumulado como reserva de parede celular de sementes de algumas Leguminosae-Caesalpinoidae.

Estruturalmente os xiloglucanos são compostos de uma cadeia principal de glucose unida por ligações β -(1,4), onde ocorrem ramificações regulares com xilose ligada α -(1,6). Algumas destas xiloses ainda podem apresentar ramificações por galactose ligadas α -(1,2). Em parede celular primária, mas

não em parede celular de reserva, as ramificações por galactose ainda podem ser ramificadas por fucose ligada α -(1,2) (Figura 2A).

O sistema de degradação do xiloglucano de reserva mais estudado foi o componente da semente de *Tropaeolum majus*. Edwards *et al.* (1985) acompanharam a mobilização do xiloglucano nesta espécie e notaram um aumento da atividade enzimática da β -glucosidase, β -galactosidase, α -xilosidase e endo- β -(1,4)-glucosidase durante a mobilização do xiloglucano.

Apesar da mobilização da reserva de xiloglucano presente em sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá) ter sido sugerida por Kooiman (1960), o acompanhamento detalhado só foi realizado por Tiné *et al.* (2000) (Figura 2B).

O mecanismo de degradação proposto por Tiné & colaboradores (2000) é dividido em três partes: transglicosilação, onde o polissacarídeo seria parcialmente hidrolisado pela XTH (xiloglucano transglicosidase hidrolase); desgalactosilação, etapa onde certas unidades de galactose dos produtos da ação anterior da XTH seriam hidrolisados pela β -galactosidase; e desmontagem, onde os oligossacarídeos remanescentes da ação da β -galactosidase entrariam no ciclo final de degradação, onde a glucose e a xilose seriam atacadas pela β -glucosidase e α -xilosidase, produzindo monossacarídeos livres para a utilização do embrião no desenvolvimento (Figura 2B).

Figura 2: Estrutura e mobilização de xiloglucano de reserva de sementes. (A) Estrutura molecular do xiloglucano de reserva contendo cadeia principal de glucose unida por ligações β -(1,4), onde ocorrem ramificações regulares com xilose ligada α -(1,6). Algumas destas xiloses ainda podem apresentar ramificações por galactose ligadas α -(1,2). (B) Representação esquemática da

degradação de reserva de xiloglucano em sementes. Uma sequência de XLGXLLGXXXGXXLG é usada como um exemplo de um segmento de um polímero de xiloglucano com a extremidade não-redutora voltada para a esquerda. O primeiro ataque é feita por xiloglucano-endo- β -transglicosilase (XET) e β -galactosidase (β -gal proveniente de *Nasturtium* apenas). Os oligossacáridos produzidos pela ação endo da XET são atacados por β -galactosidases (N β -gal=*Nasturtium* β -galactosidase; C β -gal= *Copaifera* β -galactosidase, o último sendo capaz de atacar oligossacarídeos apenas em certas posições (galactoses colocadas na ponta não-redutora). A α -xilosidase e a β -glucosidase agem em hidrólises alternadas do final não-redutor. (*) Em leguminosas (*Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*), após uma rodada de ação destas duas enzimas, a galactose estará novamente próximo do terminal não-redutor. Desata forma, a β -galactosidase pode agora agir sobre o oligossacarídeo XLG, libertando assim a galactose e permitindo a continuidade da ação das outras duas exo-glicosidases. Nestas duas espécies, a galactose retirada dos oligossacarídeos é possivelmente limitadora da degradação, pois a enzima possui um pH ótimo de 3,2, enquanto as demais enzimas possuem um pH ótimo de 4,5. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000c) e Buckeridge *et al.* (2000b).

1.5.3. Mananos

Baseado em sua estrutura e composição, o grupo dos mananos pode ser subdividido em três grupos: mananos puros, glucomananos e galactmananos (Buckeridge *et al.*, 2000a)

Glucomananos

Dentre os três subgrupos de mananos, os glucomananos são os menos conhecidos.

A estrutura determinada por metilação apresenta uma cadeia principal formada por um número proporcionalmente equivalente de resíduos de β -glucopiranosídeo e β -manopiranosídeo unidos por ligações β -(1,4). Com certa frequência pode-se detectar a presença de unidades de galactopiranosídeo unidos α -(1,6) a cadeia principal (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Mananos Puros

Os mananos puros são definidos pelo seu conteúdo maior de 90% de resíduos de β -manopiranosídeo unidos por ligações β -(1,4) formando uma cadeia linear sem ramificações, podendo ou não o restante da cadeia estar ramificada com α -galactopiranosídeo (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Dea *et al.* (1986) demonstraram que mananos com taxa de ramificação com galactose abaixo de 10% eram insolúveis e precipitavam rapidamente em solução aquosa. Assim, os mananos são estruturalmente relacionados aos galactomananos, apenas apresentando um grau menor de ramificações por galactose, aumentando a interação entre as moléculas de manano, formando cristais na parede celular, o que confere dureza à parede celular (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Sachs (1862) e Keusch (1968) estudaram a germinação de sementes de *Phoenix dactylifera* com reserva de manano. Determinaram a presença das enzimas endo- β -mananase e β -manosíase responsáveis pela degradação do manano contido nestas sementes.

Além da função de reserva de parede celular, os mananos parecem estar relacionados à dureza da semente. Groot & Karssen (1987) e Groot *et al.* (1988) evidenciaram que o manano presente da região endospermica próxima à extremidade da raiz de tomate, exerce papel crucial na protrusão da radícula, pois o amolecimento do endosperma, induzido pela ação da giberelina, facilitou a germinação.

Assim, o manano na forma de um polissacarídeo de reserva de parede celular exerceria as funções de constritor e protetor mecânico do embrião, como também, polissacarídeo de reserva.

1.6. Galactomananos

O primeiro estudo sobre a estrutura dos galactomananos provavelmente foi feito por Naldeman, em 1890. Esse autor reportou a presença de galactose e manose em várias espécies de leguminosas e também verificou que os galactomananos se comportam como substâncias viscosas (Nadelman, 1890; Buckeridge *et al.*, 2000a).

Os galactomananos ocorrem tipicamente em endospermas de sementes de Leguminosas, mas eles também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias como Compositae, Convolvulaceae, Annonaceae, Malvaceae, Palmae, Rubiaceae e Umbelliferae (Tookey *et al.*, 1962; Dea & Morrison, 1975; Guzmán & Hernandez, 1982; Buckeridge *et al.*, 2000b).

1.6.1. Estrutura química dos galactomananos

Os galactomananos são polissacarídeos compostos de uma cadeia linear de resíduos de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), à qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6), formando ramificações simples (Buckeridge *et al.*, 2000a) (Figura 3A).

Figura 3: Estrutura molecular do polissacarídeo galactomanano e explicação para a leitura das “abreviações” dos oligossacarídeos Gal^XMan_Y . (A) Cadeia principal linear de resíduos de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), na qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações α -(1,6), formando ramificações simples. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000a). (B) A cadeia principal de manose é numerada a partir da extremidade redutora (à direita). O número subscrito ligado à manose indica a quantidade de resíduos de manose que a cadeia principal do oligossacarídeo possui, enquanto o número sobrescrito ligado a galactose indica a posição do resíduo de galactose relativo ao resíduo de manose a partir da extremidade redutora (McCleary *et al.*, 1983).

A razão manose:galactose (M/G) e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia variam de espécie para espécie, com a razão ocorrendo entre 1:1 e 4:1. Esta propriedade é importante para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos (Buckeridge & Diertrich, 1990; Buckeridge *et al.*, 2000a).

Como dito anteriormente, os galactomananos são abundantes em endospermas de sementes de Leguminosae (ou Fabaceae), a família com o terceiro maior número de espécies do Reino Vegetal (Buckeridge *et al.*, 2000a; Buckeridge *et al.*, 2000c). Essa família é subdividida em três subfamílias (Caesalpinoideae, Mimosoideae e Faboideae) sendo possível classificá-las de acordo com suas razões (M/G). A subfamília Caesalpinoideae possui a maior razão M/G, ou seja, menor o grau de ramificação com galactose, seguida pela Mimosoideae e finalmente Faboideae (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Além desse parâmetro taxonômico, visto acima, a razão M/G também dita a solubilidade do polissacarídeo em água, e conseqüentemente, sua interação com outros polissacarídeos, incluindo a celulose (Buckeridge *et al.*, 2000a).

1.6.2. Propriedades dos galactomananos

Embora os galactomananos sejam considerados polissacarídeos de reserva (Buckeridge *et al.*, 2000a), tem sido demonstrado que tal polímero pode exercer outras funções além de reserva nas sementes.

Entre as funções, os galactomananos exercem o controle da embebição (Reid & Bewley, 1979; Buckeridge *et al.*, 2000c), dada sua alta solubilidade nos primeiros estágios de germinação, esse polímero absorve grandes quantidades de água, distribuindo-a ao redor do embrião (Buckeridge *et al.*, 2000c).

O endosperma embebido protege o embrião contra perda d'água através de um efeito conhecido como "tampão de água" durante os períodos de seca após o início da germinação, protegendo-o contra estresse hídrico (Reid & Bewley, 1979; Halmer & Bewley, 1979). Um comportamento similar também pode ser visto em leguminosas tropicais, como em *Sesbania virgata* (Cav.)

Pers. (anteriormente publicado com o sinônimo *Sesbania marginata* por Buckeridge *et al.*, 1995a; Buckeridge & Dietrich, 1996).

Ligado à embebição, Groot & Karssen (1987) demonstraram que distensão mecânica do endosperma, pela entrada de água, facilita a protrusão da radícula. Sendo assim, facilitação da protrusão da radícula nas primeiras fases da germinação também é uma função dos galactomananos.

Aparentemente as funções de reserva e embebição estão limitadas às Leguminosas, ao passo que nas não leguminosas é aparente a existência da função de dureza dos galactomananos. Embora, a função de dureza e proteção parece também ser mantida em Leguminosas, como demonstrado por Buckeridge *et al.* (2000c) e Lisboa *et al.* (2006), nas sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Dessa forma, fica evidente que diferenças na estrutura do galactomanano propiciam a este polímero atuação em diversas funções biológicas. Essas diferenças encontram-se no grau de ramificação: quanto mais ramificado for o galactomanano, maior a possibilidade de sua função biológica estar ligada com as relações hídricas. Em contrapartida, quanto menos ramificado for o galactomanano, maior a sua chance de atuação com dureza e proteção (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Desconhece-se qual das funções é primária entre as de reserva, de embebição ou de dureza. Entretanto, é evidente que os galactomananos são moléculas multifuncionais, desempenhando suas funções durante fases distintas do crescimento e desenvolvimento das plantas (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Por suas propriedades físico-químicas, os galactomananos apresentam grande importância comercial, principalmente no que se refere a solubilidade e a sua capacidade de formar soluções viscosas, sendo utilizados em diversos setores industriais (Buckeridge *et al.*, 2000a).

1.6.3. Mobilização dos galactomananos

De acordo com McCleary (1983), Buckeridge & Dietrich (1996) e Buckeridge *et al.* (2000a) a mobilização do galactomanano presente no endosperma de sementes se inicia somente após a emissão da radícula.

Os galactomananos são hidrolisados por três enzimas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase ou β -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase ou β -manosidase (EC 3.2.1.25) produzindo galactose e manose livres ao mesmo tempo em que a glucose é produzida no endosperma. Aparentemente essa última é disponibilizada ao embrião e servirá como fonte de carbono e energia para o estabelecimento das plântulas (Buckeridge *et al.*, 2000a; Lisboa *et al.*, 2006) (Figura 4).

A α -galactosidase é a enzima responsável pela quebra das ligações α -(1,6) existentes entre as unidades de galactose e manose, enquanto que a endo- β -mananase atua na cadeia principal de manano, rompendo as ligações do tipo β -(1,4) existentes entre as unidades de manose, reduzindo o manano a oligossacarídeos. A β -manosidase atua nas ligações β -(1,4) entre as unidades de manose dos oligossacarídeos provenientes da ação da endo- β -mananase, liberando manoses livres (Reid & Meier, 1972; McCleary, 1983; Buckeridge *et al.*, 1995a; Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.*, 2000a).

De acordo com Reid & Edwards (1995) e Lisboa *et al.* (2006), a degradação do galactomanano pelas enzimas requer uma ordem de atuação das mesmas. Em sementes de leguminosas a ação da α -galactosidase é uma condição necessária para permitir acesso à enzima endo- β -mananase a cadeia principal do galactomanano. Apesar disso, em sementes de *Lactuca sativa* (alface) a α -galactosidase só pode retirar galactose do produto de ação da endo- β -mananase (Leung & Bewley, 1983).

Figura 4: Rotas bioquímicas envolvidas no catabolismo do galactomanano somado ao metabolismo pelo embrião dos monossacarídeos liberados na degradação da reserva. Quando a camada de aleurona não está presente, aparentemente as hidrolases são produzidas dentro das células endospermáticas e secretadas para fora da parede celular onde as mesmas vias metabólicas ocorrem. Man = manose; Gal = galactose; SPS = sacarose fostato sintase; Man-6-P = manose-6-fosfato; Fru-6-P = frutose-6-fosfato; UDP-gal = uridina difosfatada de galactose; Suc-6-P = sacarose-6-fosfato. Figura retirada e adaptada de Buckeridge *et al.* (2000b).

Por outro lado, a ação da β-mannosidase só é possível sobre o produto da degradação da α-galactosidase e endo-β-mannanase. McCleary (1983) demonstrou que a β-mannosidase não apresenta atividade sobre o polímero inteiro, só apresentando ação sobre oligossacarídeos de manano desgalactosilados.

Apesar do conhecimento das enzimas envolvidas no processo de mobilização do galactomanano, pouco se sabe sobre as características bioquímicas intrínsecas das mesmas e, conseqüentemente, no modo de ação dessas sobre o polissacarídeo.

Lisboa *et al.* (2006) purificaram e caracterizaram a enzima endo- β -mananase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Neste trabalho estimou-se seu peso molecular em 30kDa, temperatura ótima em 45°C, bem como o pH ótimo em um intervalo entre 3,5-4,5. O ponto isoelétrico da enzima encontra-se em pH 4,5.

Além disso, os autores demonstram que a endo- β -mananase apresenta dois picos de atividade: um em 24 horas após a embebição, e outro em 120 horas após a embebição. O primeiro pico, aparentemente, está relacionado com a protrusão da radícula, enquanto que o segundo com a degradação do galactomanano de reserva da semente (Lisboa *et al.*, 2006). Esta observação sugere que a função de amolecimento do endosperma para permitir a protrusão da radícula esteja presente também em Leguminosae.

Em relação à mobilização do galactomanano, esses autores observaram que a enzima endo- β -mananase, presente em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., só possui atividade caso o galactomanano já tenha sofrido a ação da α -galactosidase previamente (Lisboa *et al.*, 2006).

As demais enzimas, α -galactosidase e β -manosidase, ainda não foram caracterizadas para *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., porém, os conhecimentos das características de ambas são de suma importância para o aprofundamento do conhecimento da mobilização de galactomananos para essa espécie, bem como para as demais espécies com sementes que armazenam galactomanano como reserva.

Quanto à produção dessas três hidrolases, nas sementes de *Trigonella foenum-graecum* e *Cyamopsis tetragonoloba* as células endospérmicas não são vivas devido à alta deposição de galactomananos nas paredes celulares durante a maturação, assim, essas sementes possuem uma camada de aleurona, a qual se acredita ser responsável pela produção das enzimas hidrolíticas de mobilização (Reid, 1985a).

Por outro lado, as sementes de *Ceratonia siliqua* possuem as células do endosperma vivas. Neste caso, não existe distinção clara entre o endosperma

e a camada de aleurona. Dessa forma, provavelmente a produção e a liberação das enzimas hidrolíticas são feitas pelas próprias células endospermicas (Buckeridge *et al.*, 2000a).

Diferentemente da última espécie, em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a camada de aleurona é claramente distinguida, estando presente entre o tegumento da semente e o endosperma, ao mesmo tempo em que este último possui corpos protéicos (Buckeridge *et al.*, 2000a). Baseado nessas observações, Buckeridge & Dietrich (1996) propuseram que as enzimas de hidrólise do galactomanano poderiam ser produzidas em ambos os locais, camada de aleurona e células endospermicas. Tonini *et al.* (2007) sugerem, ainda, que a produção dessas enzimas possa ser feita não só no endosperma, como no endotegumento. Porém, Tonini (2008) sugere que a produção dessas enzimas hidrolíticas só ocorra durante a maturação da semente, não existindo produção *de novo* das enzimas quando a semente já se encontra madura.

1.6.4. Regulação da Mobilização de Reserva de Galactomanano

Groot & Karsen (1987) demonstraram que a giberelina regula a germinação da semente através da indução do amolecimento do endosperma em sementes de tomate e Spyropoulos & Reid (1985) sugeriram que o endosperma de Leguminosae deve estar sob controle de auxina e giberelina para a degradação das reservas contidas no endosperma.

Tonini *et al.* (2006) demonstraram que a inibição da mobilização dos galactomananos em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. provavelmente é controlada pelo tegumento da semente, pois essa contém ABA que age negativamente na produção da enzima α -galactosidase. No entanto, Tonini *et al.* (2010) sugerem que, antagonicamente ao ABA, o etileno induza a degradação das reservas.

Além, disso o ABA tem sido descrito com um potente inibidor da degradação do galactomanano em sementes de outras espécies: feno-grego (Reid & Meier, 1973); caroba (Seiler, 1977); alface (Halmer & Bewley, 1979); tomate (Nomaguchi *et al.*, 1995) e *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Potomati & Buckeridge, 2002), pela interferência na atividade das enzimas de hidrólise do galactomanano.

Além da regulação esperada da mobilização de reserva por fitohormônios, foi evidenciado uma modulação do processo de degradação de xiloglucano de reserva de sementes realizada pela estrutura do próprio polímero de xiloglucano (Tiné *et al.*, 2003).

Tiné *et al.* (2003), analisando os oligossacarídeos produzidos pela hidrólise com celulase do xiloglucano de reserva de diferentes espécies (*Tamarindus indica*, *Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea courbaril*), constituídos de diferentes taxas de substituição por galactose, demonstraram que xiloglucanos de estrutura diferente são hidrolisados diferentemente; que os oligossacarídeos menos ramificados são atacados preferencialmente pela enzima e que a presença da β -galactosidase juntamente com a celulase, impede a formação de oligossacarídeos combinados F2 e F3, sugerindo que o padrão das substituições por D-galactose possuem influência direta na ação enzimática.

Dessa forma, eles concluem que a estrutura do polissacarídeo, através de suas ramificações pela galactose, codificaria, pelo menos, uma parte da informação para a sua própria degradação, o que eles denominaram código do xiloglucano.

Sendo o galactomanano um polissacarídeo de reserva de parede celular, como o xiloglucano, espera-se que a estrutura fina do polissacarídeo também apresente, pela distribuição das ramificações de galactose, uma parte da informação para a sua própria degradação, como o demonstrado para o xiloglucano.

1.7. Caracterização de α -galactosidase

Alfa-galactosidases (E.C. 3.2.1.22) catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6) de galacto-oligossacarídeos e de polímeros de galacto-(gluco)-mananos. Essas enzimas estão amplamente distribuídas em animais, plantas e microorganismos (Fujimoto *et al.*, 2003).

Em humanos, a α -galactosidase é uma exoglicosilase lisossomal que quebra resíduos de α -D-galactose de glicolípídeos e glicoproteínas. Mutações no gene da α -galactosidase causam a incompleta degradação de carboidratos da globotriaosilceramida ou GL-3, um glicolípídeo, que acaba por se acumular

nas células e consequentemente nos tecidos e órgãos (principalmente parede de vasos sanguíneos, coração, cérebro e rim), resultando na doença de Fabry (Fujimoto *et al.*, 2003).

Em plantas, o galactomanano é um dos compostos mais encontrados como reserva de parede celular de sementes e a α -galactosidase é uma enzima chave para a mobilização deste composto para o crescimento do embrião (Reid, 1985). Apesar de apresentar a função de mobilização de reserva, algumas α -galactosidases podem estar associadas a outras funções (McCleary & Matheson, 1974).

McCleary & Matheson (1974) detectaram múltiplas formas de α -galactosidase em sementes de *Cyamopsis tetragonoloba*, embora somente uma delas estivesse associada com a degradação do galactomanano presente no endosperma. As sementes de *Lycopersicon esculentum* apresentam três isoformas da enzima α -galactosidase e, através da obtenção e sequenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta similaridade desta α -galactosidase com outras galactosidases, especialmente a de *Coffea arabica* (Fuertado *et al.*, 2001).

Atualmente, já se deduziu, a partir de genes ou cDNA, estruturas primárias de mais de cinquenta α -galactosidases. Análises da estrutura primária e domínios hidrofóbicos demonstraram que as α -galactosidases podem ser classificadas em três famílias de hidrolases glicosídicas: 4, 27 e 36 (Fujimoto *et al.*, 2003). Em geral, as α -galactosidases de eucariotos possuem alta similaridade na sequência de aminoácidos, inclusive quanto ao seu resíduo catalítico (aspartato), e são classificadas na família 27, enquanto α -galactosidases de bactérias são agrupadas nas famílias 4 e 36 (Fujimoto *et al.*, 2003).

De acordo com o banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes database) (Cantarel *et al.*, 2008) as α -galactosidases possuem um domínio conservado com a sequência G - [LIVMFY] - x - [LIVMFY] - x - [LIVM] - D - [DF] - x - W - x - [RV] - [DNSF].

1.8. Caracterização da endo- β -mananase

As endo-enzimas como as endo- β -mananases (E.C. 3.2.1.78) catalisam a hidrólise de ligações β -(1,4) de homoglicanos não ramificados compostos de um único tipo de resíduo em sua cadeia principal, neste caso, manose, a oligossacarídeos contendo no mínimo 2 a 3 resíduos (disssacarídeos e trissacarídeos) (McCleary & Matheson, 1983).

Essas endo-enzimas que hidrolisam mananos puros vêm sendo apontadas como importantes em eventos germinativos, antes da protrusão da radícula, em sementes de *Lycopersicon esculentum* e em sementes de *Lactuca sativa*, bem como, em eventos pós-germinativos de mobilização de reserva em paredes celulares do endosperma de *Lactuca sativa* e *Trigonella foenum-graecum* (Dirk *et al.*, 1995).

Estudos conduzidos por McCleary & Matheson (1983) com endo- β -mananases provenientes de fontes diversas, bactérias (*Bacillus subtilis*), fungos (*Aspergillus niger*), animais (*Helix pomatia*) e plantas (*Cyamopsis tetragonoloba* e *Medicago sativa*) evidenciaram que as endo- β -mananases variam significativamente na habilidade de hidrolisar polissacarídeos de galactomanano.

As endo- β -mananases de fungos prontamente hidrolisam polímeros com alto grau de substituição por galactose e a presença de trissacarídeos 6¹- α -D-galactopiranosídeo-(1,4)- β -D-manobiose no hidrolisado indica que estas enzimas são capazes de hidrolisar alguns sítios de clivagem, onde um único resíduo de manose não está substituído (McCleary & Matheson, 1983).

Em contraste, as endo- β -mananases de bactérias, animais e plantas (proveniente de sementes germinadas de leguminosas) possuem uma ação mais limitada em galactomananos com muitas substituições, onde somente uma quantidade traço de trissacarídeo é liberada, mostrando que a ramificação com galactose bloqueia alguns sítios disponíveis de clivagem pela endo- β -mananase (McCleary & Matheson, 1983).

Quando estes mesmos autores compararam a diversidade e quantidade de oligossacarídeos produzidos pela ação das endo- β -mananases de fontes variadas sobre galactomanano de goma caroba, notaram que a enzima de *Aspergillus niger* formou seis oligossacarídeos simples (F1), enquanto a de

Cyamopsis tetragonoloba (guar) formou dez oligossacarídeos simples (F1), evidenciando que a endo- β -mananase de plantas possui uma ação mais limitada na clivagem do polissacarídeos altamente ramificado.

Apesar da diferença na diversidade dos oligossacarídeos, os oligossacarídeos comuns às enzimas possuíam a mesma estrutura, indicando que a enzima endo- β -mananase cliva os mesmos tipos de ligações, mas possui uma especificidade diferenciada dependendo da fonte (McCleary & Matheson, 1983).

As endo- β -mananases são capazes de hidrolisar oligossacarídeos de tamanho mínimo de três resíduos de manose, no entanto, a taxa de hidrólise aumenta consistentemente com oligossacarídeos com 5 a 6 resíduos, indicando o número de monômeros envolvidos na afinidade máxima da enzima pelo substrato, ou seja, a endo- β -mananase possui 5 subsítios de reconhecimento da cadeia de manose (McCleary & Matheson, 1983).

A figura 5 representa um oligossacarídeo hipotético (cada resíduo de manose identificado de A-E) e os 5 subsítios de reconhecimento da enzima (α - ϵ), estando a extremidade redutora do oligossacarídeo a direita. De acordo, com os dados apresentados por McCleary & Matheson (1983), a quebra do oligossacarídeo com 5 manoses (hipotético) ocorreria sempre entre as manoses C e D.

Figura 5: Representação esquemática dos subsítios de reconhecimento ($\alpha - \epsilon$) e ligação da endo- β -mananase ao oligossacarídeo hipotético com 5 resíduos de manose (A-E) ligados β -(1,4). Figura retirada de McCleary & Matheson, 1983.

A endo- β -mananase de *Aspergillus niger* é capaz de clivar entre as manoses C e D mesmo havendo ramificações por galactose nas manoses A, C ou E, porém a endo- β -mananase de *Cyamopsis tetragonoloba* fica bloqueada caso exista uma substituição por galactose na manose C, novamente

mostrando que as enzimas de plantas possuem mais requisitos para a clivagem e, portanto, apresentam uma maior diversidade de oligossacarídeos (McCleary & Matheson, 1983). Além disso, evidencia a importância da co-atuação da α -galactosidase e da endo- β -mananase para a completa degradação do galactomanano de reserva, indicando que possivelmente as ramificações com galactose possuam uma ação modulatória na endo- β -mananase.

1.9. Espécie *Sesbania virgata*

Sesbania virgata (Cav.) Pers. está entre as espécies que acumulam galactomanano em suas sementes. Essa espécie é pertencente à família Leguminosae (= Fabaceae), subfamília Faboideae (= Papilionoideae), tribo Robinieae (Kissman & Groth, 1999).

A planta é nativa do sul da América do Sul, abrangendo os seguintes países: Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil. Neste último país, *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Kissman & Groth, 1999), normalmente associada a matas de galeria (Lisboa *et al.*, 2006). Esta espécie é infestante, perene, reproduzida por semente, de hábito arbustivo, atingindo de 2 a 4 metros de altura, 25 cm de diâmetro a altura do peito e 5 metros de copa. Possui flores pequenas e amarelas. Seus frutos consistem em legumes indeiscentes de cor marrom opaco quando maduros, corticosos, subarticulados, com pseudosseptos, com brusco afinamento tanto da base, como da extremidade, sendo esta pontiaguda. Os frutos possuem de 4-8 sementes reniformes, que são lateralmente um pouco compridas, com tegumento relativamente espesso e embrião axial curvo (Kissman & Groth, 1999; Araujo *et al.*, 2004).

1.9.1. Justificativa para o uso da espécie

As sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. são um modelo conveniente para o estudo da mobilização de reserva de galactomananos devido: ao grande número de sementes produzidas por indivíduo, propiciando uma grande quantidade de material para execução de experimentos; à alta

viabilidade das sementes, mesmo após armazenamento por anos, podendo ser embebidas a qualquer momento para a realização de experimentos; ao pequeno período de tempo necessário entre a embebição ao estabelecimento da plântula, cerca de 7 dias, permitindo a execução de muitos experimentos em um curto período de tempo; à fácil manipulação das sementes, pois são pequenas para a embebição e germinação em placas de Petri, ao mesmo tempo que são grandes o suficiente para manipulação individual com mãos nuas; à grande regularidade de comportamento observada em diversas teses e experimentos já realizados pelo grupo; e, principalmente, à bagagem de conhecimento desenvolvida pelo grupo na maioria dos aspectos que concernem à mobilização de reservas: desde a localização *in situ* da produção das enzimas, à purificação da endo- β -mananase e regulação do processo, até as características do galactomanano de reserva.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a semipurificação e a caracterização bioquímica da enzima α -galactosidase presente em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., associado ao estudo da estrutura fina do polissacarídeo de reserva (galactomanano) de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., visando determinar a interação enzima-substrato. Para tanto buscou-se:

- Avaliar a taxa de germinação das sementes, bem como, a máxima atividade enzimática da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. durante a germinação e estabelecimento da plântula, através de incubação das sementes por 7 dias consecutivos em câmaras de germinação com acompanhamento da protrusão da radícula e atividade enzimática a cada 24 horas;
- Purificar a α -galactosidase presente em extrato bruto enzimático de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., através de precipitação com sulfato de amônio, seguido de Cromatografia de Troca-Iônica em coluna Aniônica (Mono-Q – Pharmacia Biotech.) em sistema FPLC e Cromatografia de Gel Filtração (Superose 6 – GE Healthcare®) em sistema FPLC;
- Caracterizar bioquimicamente a α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., em extrato bruto e após purificação, quanto a pH e temperatura ótimos de atividade enzimática e aspectos cinéticos, através de ensaios enzimáticos variando o pH, temperatura e concentração do substrato colorimétrico 4-Nitrophenil- α -D-Galactopiranosídeo (Sigma®);
- Analisar sequências gênicas de α -galactosidase de plantas depositadas em bancos de dados, através de comparação e análise filogenética (construção de árvore de relação);
- Avaliar a estrutura fina do polissacarídeo de reserva (galactomanano), através da análise do perfil, em HPAEC-PAD, de oligossacarídeos produzidos após hidrólises enzimáticas do galactomanano de *Sesbania*

virgata (Cav.) Pers. com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) somente e associada à ação da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ou de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®).

- Avaliar a estrutura fina do polissacarídeo de reserva (galactomanano), através da comparação do perfil, em HPAEC-PAD, dos oligossacarídeos produzidos após hidrólises enzimáticas de (galacto)mananos de reserva de sementes de 6 espécies (proporção manose:galactose variando de 1:1 a 150:1) com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®).

CAPÍTULO 1

SEMIPURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ENZIMA α -GALACTOSIDASE PRESENTE EM SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.) PERS.

I. Resumo

Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. acumulam suas reservas de carbono no endosperma na forma de um polissacarídeo de parede celular, o galactomanano. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas (α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase). A α -galactosidase é a primeira enzima a atuar sobre o galactomanano, hidrolisando as ligações α -(1,6) das galactoses ramificadas à cadeia principal de manano (ligados β -1,4), permitindo a ação da endo- β -mananase, que hidrolisará o polissacarídeo a oligossacarídeos, onde a β -manosidase atuará (ligações β -1,4), transformando oligossacarídeos em monossacarídeos a serem utilizados no desenvolvimento do embrião. A α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., uma leguminosa nativa, presente no endosperma e tegumento da semente, foi semipurificada, caracterizada quanto à temperatura ótima, pH ótimo, aspectos cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), sequência interna, e comparada a *Cyamopsis tetragonoloba* (guar), quanto as suas características bioquímicas e a 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidases de plantas já descritas na literatura, quanto à similaridade na sequência de aminoácidos. Uma curva de tempo de germinação e desenvolvimento da plântula mostrou germinação em 24 horas após embebição com atividade enzimática máxima da α -galactosidase em 96 horas após a embebição (4º dia). A purificação da enzima foi conduzida por 3 etapas: precipitação com Sulfato de Amônio 40% e 80%, Cromatografia de Troca-Iônica Aniônica em FPLC utilizando coluna Mono-Q e Cromatografia de Gel Filtração em FPLC utilizando coluna Superose 6. A α -galactosidase semipurificada possui, aproximadamente, 42 kDa de peso molecular em condições desnaturantes e, aproximadamente 72 kDa de peso molecular na forma nativa, sugerindo que a enzima assuma estrutura quaternária. A temperatura ótima apresentada se encontra na faixa de 50°C a 55°C, pH ótimo na faixa de 4,4 a 5,4, $K_m = 1,8276$ mM e a velocidade máxima de $0,5024 \mu\text{molGal} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprot}^{-1}$. Essas características diferem daquelas encontradas para a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba*. A espectrometria de massas gerou os fragmentos:

**ALADYV-HSK-RMPGSLGHEE-QDAK-TT-GDIEDNWNSM-TSIADSNK
W-ASYAGPGGWN-DPDMLEVGNG-GMTTEEYR-AP-LLVGCDIR-VAVIL-
WNR**, que fazem referência a 22% da proteína e possuem alta similaridade com a sequência depositada de *Cyamopsis tetragonoloba*, estando relacionada à mobilização de reserva. Durante a purificação e sequenciamento interno da α -galactosidase foram detectadas isoformas da α -galactosidase de pesos moleculares variados (42 kDa a 20 kDa). Sugere-se que estas isoformas encontradas após purificação em Cromatografia de Troca-Iônica Aniônica em FPLC utilizando coluna Mono-Q estejam relacionadas com outras funções da α -galactosidase, enquanto as isoformas encontradas após Cromatografia de Gel Filtração em FPLC utilizando coluna Superose 6 e identificação por espectrometria de massas estejam relacionadas com ativação e adaptação da α -galactosidase durante todo o processo de mobilização de reservas. A presença de isoformas e a possível estrutura quaternária da enzima sugerem que a α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. forme complexos enzimáticos para ativação de α -galactosidases inativas, através de proteólise, no início da mobilização de reserva e também forme complexos enzimáticos para a adaptação da α -galactosidase no processo de mobilização de reserva, também por proteólise (diminuição do peso molecular), onde as ramificações com a galactose se tornariam raras, o que explicaria a gama de pesos moleculares apresentados pelas diferentes isoformas (sequenciamento interno). Essas evidências sugerem que no início da mobilização de reserva proteases sejam transcritas e atuem sobre α -galactosidases inativas, ativando-as; essas α -galactosidases ativas seriam as responsáveis pela ativação das α -galactosidases inativas restantes e adaptação das α -galactosidases ativas durante o processo de mobilização, também por proteólise, permitindo que a enzima apresente características melhoradas para hidrolisar eficientemente as ramificações por galactose cada vez mais raras no decorrer do processo de mobilização. A α -galactosidase semipurificada foi submetida, juntamente com a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®), a ensaios enzimáticos com o substrato galactomanano, visando determinar o modo de ação da enzima e a estrutura fina do polissacarídeo (dados apresentados no Capítulo 2).

II. Introdução

Uma das mais espetaculares inovações que surgiram durante a evolução das plantas vasculares (Angiospermas e “Gimnospermas”) foi a semente. Este sucesso deve-se ao fato das sementes possuírem uma grande capacidade de sobrevivência quando comparada com esporos livres, devido à proteção que esta confere ao embrião, além dos recursos nela armazenados para os estágios de germinação e estabelecimento (Raven, 2001).

Sementes de diversas espécies de leguminosas acumulam galactomananos na parede celular dos endospermas, sendo denominados polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid, 1985; Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.* 2000b; Buckeridge *et al.*, 2004a).

Os polissacarídeos de reserva, além da função de armazenar e prover energia para o embrião, também desempenham um papel importante no controle da embebição de água no início da germinação, absorvendo grande quantidade de água e a distribuindo ao redor do embrião, protegendo-o contra dessecação (Reid & Bewley, 1979; Buckeridge *et al.*, 2000c).

Outras funções já foram descritas para os polissacarídeos de reserva de parede celular: dureza e resistência física ao endosperma no período de germinação, sendo importante na regulação da constrição mecânica à protrusão da radícula (Buckeridge *et al.*, 2000a; Lisboa *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos de parede são classificados em três grupos: mananos, xiloglucanos e os (arabino)galactanos. O grupo dos mananos engloba os mananos puros, glucomananos e galactomananos (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Os galactomananos são polissacarídeos hemicelulósicos constituídos de uma cadeia principal formada por unidades de D-manose unidas entre si por ligações glicosídicas β -(1,4), na qual unidades de D-galactose formam ramificações simples ligadas α -(1,6) (Moe *et al.*, 1947; Unrau, 1961; Somme, 1968; Manzi & Cerezo, 1984).

A mobilização do galactomanano de reserva de sementes de leguminosas já descritas se inicia após a germinação (Buckeridge *et al.*, 2000c; Tonini *et al.*, 2006), sendo realizada pela ação de três enzimas hidrolíticas: α -

galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase (EC 3.2.1.25), necessariamente nesta ordem (Reid & Meier, 1972; McCleary & Matheson, 1976; Buckeridge & Dietrich, 1996), pois a presença das ramificações de D-galactose na cadeia principal interferem na ação da endo- β -mananase sobre a cadeia de manano (Reid & Edwards, 1995; Buckeridge *et al.*, 2000a; Lisboa *et al.*, 2006).

As alfa-galactosidases (E.C. 3.2.1.22) catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6) de galacto-oligossacarídeos e de polímeros de galacto-(gluco)-mananos. Essas enzimas estão amplamente distribuídas em animais, plantas e microorganismos (Fujimoto *et al.*, 2003).

A presença de isoformas de α -galactosidase foi primeiramente descrita por Petek & Dong (1961) em sementes de *Coffea sp* e *Plantago ovata*. Tonini *et al.* (2006) sugerem que a presença de isoformas de endo- β -mananase em endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seja para garantir a hidrólise do galactomanano, mesmo com as modificações estruturais que este sofre durante a mobilização.

Feurtado *et al.* (2001) sugeriram pelo menos três isoformas da α -galactosidase durante e após a germinação de sementes de tomate e, através da obtenção e sequenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta homologia da forma ativa da α -galactosidase do tomate (40 kDa) com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de *Coffea arabica* (café) (Zhu & Goldstein, 1994). Como apenas um gene para a α -galactosidase foi identificado em sementes de tomate, as isoformas aparentemente se formam a partir de modificações pós-traducionais (Feurtado *et al.*, 2001).

McCleary & Matheson (1974) também detectaram múltiplas isoformas da α -galactosidase, nas sementes de *Cyamopsis tetragonoloba*, embora apenas uma delas (40 kDa) esteja associada com o endosperma (Overbeeke *et al.* 1989). DeMason & colaboradores (1992) detectaram quatro isoformas da enzima durante o desenvolvimento do endosperma de sementes de palmeira. Em sementes de alfafa, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Ceratonia siliqua*, soja, palmeira, café, feijão, *Lupinus angustifolius* (lupino) e *Trifolium repens* pelo menos duas isoformas da α -galactosidase estão presentes, com massas moleculares variando entre 17-57 kDa (Courtois & Petek 1966, McCleary &

Mathenson 1974, Williams *et al.* 1978, Itoh *et al.* 1979, Plant & Moore 1982, Chandra Sekhar & DeMason 1990, Dhar *et al.* 1994).

As α -galactosidases também foram descritas relacionadas ao amadurecimento de frutos. Soh *et al.* (2006) detectaram três isoformas da α -galactosidase no fruto de *Carica papaya* (mamão papaia), com pesos moleculares de 170, 57 e 29 kDa. Durante o desenvolvimento de frutos de *Cucumis melo* (melão), três isoformas da α -galactosidase também foram detectadas, uma delas com peso molecular em torno de 27 kDa (Gao & Schaffer, 1999).

Assim, as diferentes isoformas de α -galactosidase podem estar relacionadas tanto a diferenças estruturais do galactomanano durante a mobilização, como por exemplo, à diminuição de substituições por galactose o que demandaria uma α -galactosidase com maior afinidade ao substrato; como também a diferentes funções além da degradação do galactomanano, por exemplo, a degradação de açúcares da série rafínosica (Bewley, 1997) e até o amadurecimento de frutos (remodelamento da parede celular) (Gao & Schaffer, 1999; Soh *et al.*, 2006).

A ação das enzimas relacionadas com a mobilização de reserva de sementes é regulada por fito-hormônios. O ácido abscísico (ABA) é um potente inibidor da degradação da reserva de galactomanano e está envolvido no mecanismo de regulação dessa mobilização em sementes de *Ceratonia siliqua* (Seller, 1977), *Lactuca sativa* (Halmer & Bewley, 1979), *Lycopersicon sculentum* (Groot & Karssen, 1992), *Trigonella foenum-graecum* (Reid & Meier, 1973; Malek & Bewley, 1991; Kontos & Spyropoulos, 1995) e *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Potomati & Buckeridge, 2002; Tonini *et al.*, 2006).

Tonini (2009) demonstrou que a mobilização de reserva de galactomanano de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. é modulada negativamente pela presença do ABA, enquanto o etileno é promotor da mobilização.

Além da regulação direta realizada pelos fito-hormônios, a degradação da reserva pode ser regulada pela ação de proteases, que normalmente são moduladas pelos fito-hormônios (Tonini, 2009). Sabe-se que proteases são responsáveis por modificações pós-traducionais de proteínas, com ação proteolítica limitada a regiões específicas, necessárias para o processamento e

maturação de enzimas pré-formadas e controle da atividade destas (Schaller, 2004). Em sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) e cevada, a enzima α -galactosidase e β -amilase, respectivamente, podem ser ativadas através de digestão por enzimas proteolíticas (Overbeeke *et al.* 1989, Guerin *et al.* 1992).

Tendo em vista a importância da α -galactosidase na mobilização de reserva de galactomanano e visando a compreensão das suas características e modo de ação sobre o galactomanano, procedeu-se com a purificação e caracterização bioquímica da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

III. Material e Métodos

3.1. Coleta do Material Vegetal

As sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. utilizadas na execução dos experimentos de purificação e caracterização foram coletadas de diversos indivíduos localizados nas imediações da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, evitando, assim, vício amostral. As sementes foram separadas dos frutos maduros e mantidas em frascos herméticos a temperatura ambiente.

As sementes coletadas foram utilizadas na preparação do extrato bruto enzimático visando à semipurificação da enzima α -galactosidase presente nas sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

3.2. Determinação da porcentagem de germinação e pico de atividade enzimática

A fim de determinar a viabilidade das sementes coletadas e o momento (em dias) após a embebição, onde se encontra a maior atividade enzimática da α -galactosidase, procedeu-se com a embebição das sementes e acompanhamento da germinação e desenvolvimento da plântula por 7 dias sob luz e temperatura constantes, seguido de preparação de extrato enzimático e mensuração da atividade enzimática.

3.2.1. Germinação das sementes quiescentes

Após o beneficiamento dos frutos, as sementes quiescentes foram escarificadas mecanicamente com lixa na região abaixo do hilo e, posteriormente, esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,75% por 15 minutos, seguido por enxágue com água destilada.

Em seguida, as sementes quiescentes foram incubadas em placas de Petri (10cm de diâmetro) sobre papel de filtro, 10 sementes por placa e 0,5mL de água destilada/semente (5mL), sendo mantidas sob condições de luz constante e temperatura de 28°C, durante 7 dias (período que abrange as fases de germinação e degradação total da reserva - galactomanano).

A cada 24 horas de incubação a partir da embebição (168 horas - 7 dias) 3 placas de Petri, contendo 10 sementes por placa, foram retiradas da incubação e processadas individualmente.

Essas sementes coletadas, cada grupo de 10 sementes, foram dissecadas, separando o tegumento e o endosperma do embrião (descartado) e os tecidos submetidos à mensuração do peso fresco, extração de proteínas mensuração da atividade enzimática, descritos a seguir.

3.2.2. Determinação do peso fresco do endosperma e tegumento

Cada grupo de 10 sementes foi pesado (peso fresco total), em seguida, determinado a taxa de germinação através da observação da emissão da radícula (total de sementes com emissão de radícula/total de sementes por placa), as sementes foram dissecadas para separação do tegumento e endosperma, os tegumentos e endospermas foram novamente pesados (peso fresco sem embrião) e finalmente foram submetidos à extração de proteínas, visando à determinação da atividade enzimática.

3.2.3. Extração protéica, determinação de proteínas totais, determinação da atividade enzimática da α -galactosidase e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os tecidos isolados, endosperma e tegumento, das sementes coletadas (10 sementes a cada dia, com 3 repetições) foram macerados usando nitrogênio líquido, homogeneizados em tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 e 2g/100mL de Polivinilpirrolidona (PVPP) e deixados em repouso por 1 hora a 5°C. Após repouso, o extrato foi submetido à centrifugação a 10.000g, a 5°C por 10 minutos e o sobrenadante (extrato bruto enzimático) foi submetido à dosagem de proteínas e da atividade enzimática da α -galactosidase.

O conteúdo de proteínas totais em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford de quantificação de proteínas (Bradford,1976), utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA). Trinta microlitros de amostra (podendo estar diluída 1:10) foram homogeneizados a 170 μ L de reagente de Bradford diluído 4:1 (4 partes de reagente de Bradford para 1 parte de água Milli-Q®). As leituras de absorbâncias foram feitas em leitor de placa Elisa no comprimento de onda (λ) de 595nm.

O pico de atividade enzimática, dia após embebição onde se encontra a maior atividade enzimática, foi determinado através de ensaio enzimático utilizando as réplicas de cada coleta e o substrato enzimático 4-Nitrophenil-D-galactopiranosídeo (Sigma Chem. Co. St. Louis, USA) (PNP- α -Gal), seguido de leitura em espectrofotômetro a 405nm, de acordo com Alcântara *et al.*(1999).

As três réplicas de cada horário (24h a 168h) foram ensaiadas separadamente, seguindo o seguinte protocolo: 10 μ L de tampão McIlvaine pH 5.0, 10 μ L de PNP- α -Gal a 50mM e 10 μ L de extrato bruto (proveniente de cada réplica de cada horário). Após homogeneização, os tubos foram incubados a 45°C por 15 minutos e, em seguida, a reação foi interrompida com 2mL de carbonato de sódio a 0,1N e a absorbância determinada a 405nm.

A atividade enzimática específica foi determinada através da seguinte equação:

$$\left[\left[\left[\left[\left(\frac{\text{Absorbância}}{\text{Constante}} \right) \times VTE \right] \times VTEB \right] \div VEE \right] \div t \right] \div PTEB \times 10^3$$

$$= \mu\text{molGalactose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$$

Onde, **Constante** é o coeficiente de extinção molar do PNP- α -galactopiranosídeo; **VTE** é o volume total de ensaio (2,03mL); **VTEB** é o volume total de extrato bruto em mL; **VEE** é o volume de enzima utilizada no ensaio (0,01mL); **t** é o tempo do ensaio enzimático (15 minutos); **PTEB** é proteína total (mg) do extrato bruto.

A análise qualitativa das proteínas foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970).

As eletroforeses foram feitas em mini-géis de 0,75 mm de espessura (9 X 6cm), contendo 12% de acrilamida, montados em cuba vertical de eletroforese modelo mini-protean (Bio-Rad). Durante a corrida foi mantida corrente constante de 100 mA por cerca de 70 minutos, tempo necessário para o marcador alcançar a extremidade inferior do gel.

O marcador de peso molecular utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad) que contém: miosina (195 kDa), β -galactosidase (111,6 kDa), albumina de soro bovino (59,4 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (24,7 kDa), lisozima (12,5 kDa) e aprotinina (6,4 kDa).

Para revelação das proteínas, após a corrida, o gel foi imerso em solução de Coomassie Brilliant Blue R250 0,1% dissolvido em ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação contínua. Em seguida, o gel foi mantido em solução descorante, ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v), sob agitação contínua e trocas frequentes da solução (Hames, 1990).

3.3. Purificação da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

3.3.1. Incubação das sementes de *Sesbania virgata* para purificação da α -galactosidase

Com a finalidade de obter extrato bruto enzimático visando à caracterização em extrato bruto e purificação da α -galactosidase presente em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., aproximadamente 1000 sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foram escarificadas mecanicamente e esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,75%, como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes.*

As 1000 sementes foram incubadas em 4 bandejas sobre papel de filtro por 96 horas após embebição (4 dias após embebição) sob luz constante e temperatura de 28°C.

Ao final das 96 horas, as sementes foram pesadas (Peso Fresco Total), dissecadas para separação do tegumento e endosperma, e estes foram pesados para determinação do Peso fresco sem embrião.

O extrato bruto foi realizado a partir dos tegumentos e endospermas dissecados, seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*, resultando em um volume final de 156mL de extrato bruto disponível para purificação da α -galactosidase e caracterização do extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido à determinação das proteínas totais, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e determinação da atividade enzimática da α -galactosidase, ensaio enzimático com PNP- α -Gal, seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes.*

3.3.2. Caracterização da temperatura ótima e pH ótimo da α -galactosidase em extrato bruto enzimático

A fim de padronizar o ensaio enzimático da α -galactosidase para as etapas de purificação e caracterizar esta enzima quando no extrato bruto, procedeu-se com a determinação da temperatura ótima e pH ótimo de atividade enzimática da α -galactosidase.

3.3.2.1. Temperatura Ótima

Para determinar a temperatura ótima da α -galactosidase em extrato bruto, amostras de 10 μ L de extrato bruto foram incubadas juntamente com 10 μ L de PNP- α -galactopiranosídeo e 10 μ L de tampão McIlvaine pH 5.0 em temperaturas crescentes: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, por 15 minutos, seguido de acréscimo de 2mL de Na₂CO₃ a 0,1N e leitura a 405nm, como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*.

3.3.2.2. pH Ótimo

Para determinar o pH ótimo da α -galactosidase em extrato bruto, amostras de 10 μ L de extrato bruto foram incubadas juntamente com 10 μ L de PNP- α -Gal e 10 μ L de tampão McIlvaine variando de pH 2 a 7 (2.6; 3.0; 3.4; 4.0; 4.4; 5.0; 5.4; 6.0; 6.4 e 7.0) (McIlvaine, 1921) ou 10 μ L de tampão Fosfato para pH 7.5 e 8.0, por 15 minutos, seguido de acréscimo de 2mL de Na₂CO₃ a 0,1N e leitura a 405nm, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*.

3.3.3. Primeira Etapa de Purificação da α -galactosidase: Precipitação com Sulfato de Amônio

Primeiramente, foi realizada uma precipitação com sulfato de amônio com saturações de 20%, 40%, 60% e 80% visando padronizar o protocolo e determinar a saturação, na qual a enzima α -galactosidase, é precipitada.

Partiu-se de 144mL de extrato bruto de tegumento e endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., realizado como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*, acrescentou-se a massa de sulfato de amônio referente a saturação de 20%, após homogeneização, a mistura foi deixada a 5°C por 40 minutos, seguido de centrifugação a 13000g a 5°C por 15 minutos.

O precipitado, proteínas precipitadas com 20% de Sulfato de Amônio, foi ressuspendido com tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 e armazenado a -20°C até ensaio enzimático, quantificação de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando BSA como padrão e eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970) corado com Coomassie R250 a 0,1% (dissolvido em ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v)), utilizando como padrão Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

Ao sobrenadante, após verificação de volume, foi acrescido massa de sulfato de amônio referente à saturação de 40% e a mesma metodologia foi aplicada até o acréscimo da massa referente a saturação de 80%, onde o sobrenadante após centrifugação, denominado de descarte, foi armazenado a -20°C até ensaio enzimático, quantificação de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida, e o precipitado de 80% também foi ressuspendido com tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 e armazenado a -20°C até ensaio enzimático, quantificação de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida.

Uma alíquota do extrato bruto, os precipitados de 20%, 40%, 60% e 80% e o descarte foram submetidos a ensaio enzimático utilizando o substrato sintético PNP- α -Gal, tampão McIlvaine pH4,4 a 45°C, como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*, para determinação do precipitado com maior atividade de α -galactosidase, e foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970) corado com Coomassie R250 a 0,1% (dissolvido em ácido acético:metanol:água (1:4:5 - v/v/v)), utilizando como padrão Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

Após este experimento inicial de precipitação com sulfato de amônio seguido de ensaio enzimático optou-se por utilizar somente as saturações de 40% e 80% seguindo o protocolo descrito.

Dessa forma, os 156mL de extrato bruto, destinados a purificação, foram submetidos a saturação de 40% de sulfato de amônio, resultando em 16,5mL

de precipitado ressuspensionado em tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8, que foram congelados a -20°C até ensaio enzimático. O sobrenadante foi submetido a saturação de 80% de sulfato de amônio resultando em 13.5mL de precipitado ressuspensionado em tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 e 320mL de descarte, ambos congelados a -20°C até ensaio enzimático, quantificação de proteínas e a próxima etapa de purificação.

Alíquotas dos precipitados de 40% e 80% ressuspensionados em tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 e do descarte foram submetidas a ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*, visando confirmar a atividade enzimática da α -galactosidase e determinar qualquer perda nesta atividade enzimática pelo protocolo de precipitação com sulfato de amônio, quando comparado com a atividade enzimática determinada no extrato bruto.

Todo o volume do precipitado de 80% ressuspensionado em tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 foi destinado a segunda etapa de purificação.

3.3.4. Segunda Etapa de Purificação da α -galactosidase: Cromatografia de Troca-Iônica com Coluna Aniônica (Mono-Q)

Inicialmente 5 mL do precipitado de 80% ressuspensionado em Tris-HCl 20mM pH7.8 foi dialisado por 24 horas, com trocas a cada 2 horas, contra o mesmo tampão (tampão Tris-HCl 20mM pH7.8) visando retirar todo o sulfato de amônio diluído na amostra.

Em seguida, a amostra dialisada foi concentrada em concentrador de amostras Amicon® Ultra-4 Centrifugal Units (Millipore) e, posteriormente, submetida à coluna de dessalinização P-10 Desalting Column (GE Healthcare) para garantir completa retirada de sulfato de amônio.

Finalmente, a amostra foi submetida à Cromatografia de Troca-Iônica Aniônica utilizando FPLC ÄKTA (GE Healthcare), com coluna Aniônica, Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech), tendo como eluentes: tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 e tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 com 0.5M de NaCl.

A purificação da α -galactosidase ocorreu através da seguinte metodologia em FPLC ÄKTA: equilíbrio da coluna com 5 volumes de coluna (40mL) com tampão Tris-HCl 20mM pH7.8, seguido de injeção da amostra na

coluna, lavagem da coluna com 2 volumes de coluna (8mL) com tampão Tris-HCl 20mM pH7.8 para retirar o pool de proteínas que não interagiram com a coluna, em seguida, foi iniciado o gradiente de NaCl variando de 0M a 0.5M em 12 volumes de coluna (96mL) para liberação das proteínas gradualmente dependendo de sua interação com a coluna, finalmente a concentração de 0.5M de NaCl foi mantida por mais 5 volumes de coluna (40mL) para limpeza da coluna.

A atividade enzimática da α -galactosidase, nas frações de 1mL coletadas durante o processo de purificação, foi monitorada com PNP- α -D-galactopiranosídeo, tampão McIlvaine pH4,4 a 45°C, conforme descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes.*

As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas, uma alíquota (50 μ L) sempre armazenada a -20°C e o restante submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), visando o acompanhamento da purificação da α -galactosidase, ou submetido a experimentos para desenvolvimento da tabela de purificação, ou submetido à terceira etapa de purificação.

3.3.5. Terceira Etapa de Purificação da α -galactosidase: Cromatografia de Gel Filtração (Superose)

Primeiramente, a amostra proveniente da cromatografia aniônica foi concentrada em concentrador de amostras Amicon® Ultra-4 Centrifugal Units (Millipore) e, posteriormente, submetida à coluna de dessalinização P-10 Desalting Column (GE Healthcare) para troca do tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 para tampão acetato de amônio 50mM pH5.0.

A amostra foi submetida à Cromatografia de Gel filtração utilizando FPLC ÄKTA (GE Healthcare), com coluna Superose 6 (GE Healthcare), tendo como eluente: tampão acetato de amônio 50mM pH5.0.

A purificação da α -galactosidase ocorreu através da seguinte metodologia em FPLC ÄKTA: equilíbrio da coluna com 4 volumes de coluna (100mL) de água deionizada Milli-Q, seguido de equilíbrio com 2 volumes de coluna (50mL) de tampão acetato de amônio 50mM pH5.0, em seguida, a

amostra foi injetada na coluna, sendo mantido um fluxo de acetato de amônio 50mM pH5.0 de 0.3mL/minuto até ausência de detecção de proteína por UV.

A atividade enzimática da α -galactosidase, nas frações de 0,5mL coletadas durante o processo de purificação, foi monitorada com PNP- α -D-Gal, tampão McIlvaine pH 4,4 a 45°C, conforme descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*.

As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas e uma alíquota (20 μ L) sempre foi armazenada a -20°C, sendo o restante dos 2 mL submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) ou submetidos a experimentos de caracterização enzimática e desenvolvimento da tabela de purificação ou submetidos ao sequenciamento interno da proteína ou submetidos aos experimentos com polissacarídeo – galactomanano (Capítulo 2).

Salienta-se que para a realização dos diversos experimentos, a purificação foi realizada mais de uma vez, sempre partindo do mesmo volume inicial do precipitado de 80% ressuspendido e seguindo a mesma metodologia descrita.

3.3.6. Tabela de Purificação

Para o desenvolvimento da tabela de purificação todo o processo de purificação, do extrato bruto à purificação em coluna Superose 6 em FPLC, foi realizado com o armazenamento de alíquotas em cada etapa de purificação (extrato bruto, precipitação com sulfato de amônio 80%, Mono-Q e Superose).

Cada alíquota de cada etapa foi submetida a ensaio enzimático com PNP- α -Gal e quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976), como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*.

Após coleta dos dados foram realizados cálculos para a determinação do fator de purificação e rendimento da purificação.

3.3.7. Caracterização da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers e da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) (Megazyme®) quanto a temperatura ótima, pH ótimo e aspectos cinéticos

A enzima α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. proveniente de uma das purificações (seguindo os três passos de purificação) e a α -galactosidase de guar (Megazyme®) foram caracterizadas quanto aos aspectos de temperatura ótima, pH ótimo e aspectos cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

3.3.7.1. Temperatura ótima

Para determinar a temperatura ótima da α -galactosidase semipurificada e da α -galactosidase de guar (Megazyme®), alíquotas de 5 μ L de amostra foram incubadas juntamente com 5 μ L de PNP- α -Gal e 5 μ L de tampão McIlvaine pH 4,4 em temperaturas crescentes: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, por 15 minutos, seguido de acréscimo de 1mL de Na₂CO₃ a 0.1N e leitura a 405nm, como descrito no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*. Para cada temperatura o ensaio enzimático foi realizado em triplicata.

3.3.7.2. pH ótimo

Para determinar o pH ótimo da α -galactosidase semipurificada e da α -galactosidase de guar (Megazyme®), alíquotas de 5 μ L de amostra foram incubadas juntamente com 5 μ L de PNP- α -Gal e 5 μ L de tampão McIlvaine variando de pH 2 a 7 (2.6; 3.0; 3.4; 4.0; 4.4; 5.0; 5.4; 6.0; 6.4 e 7.0) (McIlvaine, 1921) por 15 minutos a 45°C, seguido de acréscimo de 1mL de Na₂CO₃ a 0.1N e leitura a 405nm, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*. Para cada pH o ensaio enzimático foi realizado em triplicata.

3.3.7.3. Aspectos Cinéticos – K_m e $V_{m\acute{a}x}$

Para determinar os aspectos cinéticos da α -galactosidase semipurificada e da α -galactosidase de guar (Megazyme[®]), alíquotas de 5 μ L de amostra foram incubadas juntamente com 5 μ L de tampão McIlvaine pH 4.4 e 5 μ L de PNP- α -Gal variando de 0,1mM a 30mM (0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10; 13; 15; 17; 20; 25; 30mM) por 15 minutos a 45°C, seguido de acréscimo de 1mL de Na₂CO₃ a 0.1N e leitura a 405nm, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1. *Germinação das sementes quiescentes*. Para cada concentração de substrato o ensaio enzimático foi realizado em triplicata.

3.3.8. Sequenciamento interno da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers

O sequenciamento interno da α -galactosidase semipurificada foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM-ABTLuS.

Para a determinação de fragmentos da sequência interna da α -galactosidase semipurificada, todo o processo de purificação, do extrato bruto à purificação em coluna Superose 6 em FPLC, foi realizado com o armazenamento de alíquotas em cada etapa de purificação (extrato bruto, precipitação com sulfato de amônio 80%, Mono-Q e Superose).

Todo o material proveniente da purificação em Superose 6, bem como as alíquotas de cada etapa, foram destinados à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Oito bandas (proteínas) da amostra da purificação em Superose 6, entre os pesos moleculares de 59,4 kDa e 12,5 kDa, foram recortadas do gel em segmentos de 1mm com auxílio de um bisturi, armazenados em microtubos de 1,5 mL e submetidas a preparação para o sequenciamento interno.

Cada uma das oito bandas foi submetida a: descoloração, desidratação, redução, alquilação, reidratação, digestão com tripsina e extração, anteriormente à aplicação ao espectrômetro de massas. A metodologia de cada uma das etapas de preparo está descrita a seguir.

Descoloração: os segmentos de gel contendo as proteínas foram acrescidos de 0,5 mL da solução *Destain* (metanol 50%, ácido acético 2,5% em

água purificada) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após descarte da solução, repetiu-se a etapa incubando somente por 1 hora.

Desidratação: a solução de *Destain* foi descartada e acrescentou-se aos segmentos de gel 200 μ L de acetonitrila 100%, incubou-se por 5 minutos e descartou-se a solução. Esta etapa foi repetida e ao final o restante da acetonitrila foi evaporado em evaporador por 2 a 3 minutos.

Redução: aos fragmentos de gel foi acrescido 30 μ L de DTT 10 mM (Ditiotreitol), incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e descartada a solução após centrifugação rápida (*spin*).

Alquilação: aos fragmentos de gel foi acrescido 30 μ L de IAA 50mM (Iodoacetamida), incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e descartada a solução após centrifugação rápida (*spin*). Os fragmentos de gel foram lavados com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos e descartada a solução. Os fragmentos de gel foram novamente desidratados com 200 μ L de acetonitrila 100% por 5 minutos a temperatura ambiente.

Reidratação: os fragmentos de gel foram reidratados com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos, descartada a solução após centrifugação rápida (*spin*), novamente desidratados com 200 μ L de acetonitrila 100% por 5 minutos a temperatura ambiente. Esta última etapa foi repetida e ao final o restante da acetonitrila foi evaporada em evaporador por 2 a 3 minutos.

Digestão das proteínas: aos fragmentos de gel for adicionados 30 μ L da solução da tripsina 20ng/ μ L (20 μ g de tripsina em 1000 μ L de bicarbonato de amônio 50mM gelado) e incubou-se por 30 minutos em gelo para a reidratação. Centrifugou-se rapidamente (*spin*), retirou-se o excesso de tripsina, adicionou-se 20 μ L de bicarbonato de amônio 50mM para cobrir o gel e incubou-se a 30°C por 15 horas (*overnight*).

Extração: sem retirar a solução de bicarbonato de amônio 50mM adicionou-se 10 μ L de ácido fórmico 5% em água purificada, incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e após centrifugação rápida (*spin*) armazenou-se o sobrenadante em outro microtubo de 1,5 mL. Ao gel foi adicionado 12 μ L ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e após centrifugação rápida (*spin*) armazenou-se o sobrenadante no

tubo que fora previamente separado. Este último passo é repetido e ao final todo o sobrenadante armazenado é evaporado até restar cerca de 5µL, o qual é submetido ao espectrômetro de massas.

Os peptídeos de cada amostra, resultantes da digestão com tripsina, foram analisados por LC-MSMS. Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 µm x 100 mm) (Waters) em nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-Tof Ultima (MicroMass/Waters). Volume de 4,5µL dos peptídeos foram injetados automaticamente e os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 40 min sob fluxo de 0,6 µL/min.

Os arquivos de dados gerados pelo Q-Tof foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltda.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina e 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MSMS. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados Human International Protein Database (IPI) v. 3.72 (86392 sequências; 35093930 resíduos).

3.4. Análises das sequências de α-galactosidase previamente identificadas em plantas

Visando determinar similaridades entre sequências gênicas codificantes e de aminoácidos para α-galactosidase de plantas já depositadas em bancos de dados públicos e a sequência interna da α-galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., foi realizada a análise das sequências de α-galactosidase, através de alinhamento e construção de árvores de relação.

O levantamento das sequências das α-galactosidas de plantas foi realizado por comparação através de BLAST de sequências gênicas codificantes de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), *Glycine Max* (soja) e

Phaseolus vulgaris (feijão), por serem da mesma subfamília Fabaceae que *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., contra sequências depositadas em banco de dados públicos: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes database) (Cantarel *et al.*, 2008). As sequências foram escolhidas através do valor do *e-value* superior a -70.

A análise das sequências por alinhamento foi feita através do programa Mega versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), bem como a construção da árvore de relação com *bootstrap* de 1000 repetições.

IV. Resultados

4.1. Determinação da porcentagem de germinação e pico de atividade enzimática

A fim de determinar a viabilidade das sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., bem como, determinar o pico de atividade enzimática da enzima α -galactosidase durante o desenvolvimento da plântula, foi avaliada a taxa de germinação, através da protrusão da radícula, e a atividade enzimática da α -galactosidase, através de ensaio enzimático com substrato enzimático 4-Nitrophenyl-D-galactopyranoside (Sigma Chem. Co. St. Louis, USA) (PNP- α -galactopiranosídeo), durante e após germinação, em um período de 7 dias (168 horas).

Analisando a porcentagem de germinação ao longo do período, observou-se que a germinação completa das sementes ocorreu somente no segundo dia após a embebição com viabilidade das sementes de 100% (Figura 6).

Figura 6. Porcentagem de germinação das sementes de *Sesbania virgata* (cav.) Pers. ao longo de 7 dias (168 horas) após a embebição.

Quanto à determinação do pico de atividade enzimática da α -galactosidase, responsável pela retirada das substituições por galactose do galactomanano durante a mobilização de reserva, permitindo a ação das demais enzimas do processo de degradação (endo- β -mananase e β -manosidase), observou-se um aumento progressivo na atividade enzimática específica até 96 horas (4º dia após a embebição), quanto atinge seu valor máximo, diminuindo sua atividade enzimática até 168 horas (7º dia após a embebição), não atingindo o valor basal (Figura 7).

Sob o ponto de vista do desenvolvimento do protocolo de purificação da enzima α -galactosidase, as sementes utilizadas no processo de purificação foram mantidas em BOD até o 4º dia após embebição (96 horas), garantindo máxima concentração de enzima a ser purificada.

Figura 7. Atividade enzimática específica da enzima α -galactosidase presente em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ao longo de 7 dias (168 horas) após a embebição.

4.2. Purificação da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

4.2.1. Caracterização da temperatura ótima e pH ótimo da α -galactosidase em extrato bruto enzimático

Com a finalidade de padronizar o ensaio enzimático da α -galactosidase para as etapas de purificação e caracterizar esta enzima quando em extrato bruto, permitindo futuras comparações em condições de enzima purificada, procedeu-se com a determinação da temperatura ótima e pH ótimo de atividade enzimática da α -galactosidase.

4.2.1.1. Temperatura ótima

Avaliando o perfil de atividade enzimática da α -galactosidase sob diferentes temperaturas (25° a 60°C, variando a cada 5°C), observou-se um acréscimo progressivo na atividade enzimática de 25°C a 50°C, sendo entre 45°C e 50°C a faixa de temperatura com maior atividade enzimática, seguido de uma queda abrupta na atividade enzimática a 60°C, valor este menor do que a atividade enzimática a 30°C (Figura 8).

Figura 8. Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática da α -galactosidase em extrato bruto enzimático de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. após 4 dias de incubação em BOD.

4.2.1.2. pH ótimo

A caracterização da atividade enzimática da α -galactosidase sob condições variadas de pH (2,3 a 8) evidencia um aumento na atividade enzimática entre o pH 2,3 a pH 4,4, sendo entre pH 4,4 e pH 5,4 o intervalo com maior atividade enzimática, seguido de decréscimo mais acentuado desta atividade enzimática entre pH 5,4 e pH 8,0, onde a atividade enzimática é inexistente (Figura 9).

A determinação dos parâmetros de temperatura e pH ótimos (Figuras 8 e 9) em extrato bruto, nos quais a atividade enzimática é máxima, foi considerada no desenvolvimento do protocolo do processo de purificação; sendo assim, os ensaios enzimáticos performados, durante acompanhamento da purificação da α -galactosidase, utilizaram PNP- α Galactopiranosídeo, tampão McIlvaine pH 4,4 a 45°C, por 15 minutos.

Figura 9. Determinação do pH ótimo de atividade enzimática da α -galactosidase em extrato bruto enzimático de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. após 4 dias de incubação em BOD.

4.2.2. Primeira etapa de purificação da α -galactosidase: Precipitação com Sulfato de Amônio

Visando diminuir a quantidade de proteínas contaminantes no processo de purificação em FPLC, procedeu-se com a precipitação com sulfato de amônio do extrato bruto, como primeira etapa de purificação.

No entanto, primeiramente foi necessária a padronização do protocolo de precipitação com sulfato de amônio, a fim de determinar qual das saturações escolhidas (20%, 40%, 60% ou 80%) era a responsável pela precipitação da α -galactosidase. Dessa forma, realizou-se um experimento piloto de precipitação com acompanhamento da atividade enzimática, através de ensaio enzimático, e de perfil proteico de cada saturação de sulfato de amônio, através de gel de poliácridamida.

Como se pode observar na Figura 10, comparando a atividade enzimática específica da α -galactosidase em todas as saturações previamente escolhidas de Sulfato de Amônio, 20%, 40%, 60% e 80%, a saturação de 80% de sulfato de amônio é a responsável pela precipitação da α -galactosidase. Além disso, a atividade enzimática específica na saturação de 60% ($0,026 \mu\text{molGalactose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$), embora consideravelmente menor do que a saturação de 80%, não pôde ser desprezada, tendo em vista a perda proteica durante todo o processo de purificação.

Embora a atividade enzimática específica do descarte seja alta ($0,059\mu\text{molGalactose.min}^{-1}.\text{mgproteína}^{-1}$) comparativamente a saturação de 60%, devido ao cálculo levar em consideração o volume total de amostra, o descarte não foi considerado por conter proteínas contaminantes (Figura 10).

Figura 10. Padronização da etapa de purificação da Precipitação com Sulfato de Amônio. Determinação da saturação de sulfato de amônio responsável pela precipitação da enzima α -galactosidase através quantificação da atividade enzimática específica da α -galactosidase em extrato bruto e em cada precipitado ressuspendido referente à utilização de uma porcentagem de saturação de sulfato de amônio.

Na Figura 11 observa-se o perfil proteico do extrato bruto, das 4 saturações de sulfato de amônio e do descarte. No perfil proteico do extrato bruto nota-se uma ausência em proteínas de peso molecular acima de 111,6kDa, porém com grande diversidade de proteínas entre 111,6kDa e 6,4kDa.

Comparando todas as amostras, percebe-se uma diminuição gradual das proteínas de peso molecular abaixo de 30KDa e acima de 59,4kDa a medida que a saturação de sulfato de amônio aumenta, ao ponto de observar-se no descarte somente 6 bandas de proteínas abaixo de 30KDa e ausência de proteínas acima de 59,4kDa, em comparação ao extrato bruto com 11 bandas e 2 bandas, respectivamente. Além disso, nas saturações de 60% e 80% de sulfato de amônio existe uma concentração das proteínas de peso molecular

intermediário, entre 59,4kDa e 30kDa, intervalo de peso onde se encaixa a α -galactosidase.

Figura 11. Eletroforese em gel de poliácridamida 12% do extrato bruto enzimático; precipitados ressuspensos de 20%, 40%, 60% e 80% de saturação de sulfato de amônio e o descarte resultante da precipitação com sulfato de amônio, com cerca de 50 μ g de proteína nas amostras aplicadas.

Tendo em vista os resultados do experimento piloto de precipitação com sulfato de amônio decidiu-se por utilizar somente as concentrações de 40% e 80% de sulfato de amônio para a primeira etapa de purificação da α -galactosidase, garantindo diminuição de proteínas contaminantes (saturação de 40%) e máxima concentração de α -galactosidase (soma das saturações de 60% e 80%).

Na Figura 12 observa-se o perfil de atividade enzimática específica da primeira etapa de purificação da α -galactosidase com precipitação com sulfato de amônio nas saturações de 40% e 80% da amostra submetida à purificação, onde se vê, novamente, a saturação de 80% como a responsável pela precipitação da α -galactosidase, pois é a maior atividade enzimática específica encontrada.

A fração referente a saturação de 80% foi, portanto, destinada a segunda etapa de purificação em FPLC Äkta (GE Healthcare) utilizando coluna de troca iônica aniônica Mono-Q (Pharmacia Biotech).

Figura 12. Comparação da atividade enzimática da enzima α -galactosidase no: extrato bruto (Ext.Bruto); ressuspensão do precipitado com 40% de saturação de Sulfato de Amônio (40%); ressuspensão do precipitado com 80% de saturação de Sulfato de Amônio (80%); sobrenadante resultante da precipitação com 80% de saturação de Sulfato de Amônio (Descarte), após Primeira etapa de purificação: Precipitação com Sulfato de Amônio em 40% e 80% de saturação.

4.2.3. Segunda etapa de purificação da α -galactosidase: Cromatografia de troca-iônica com coluna aniônica (Mono-Q)

Com a finalidade de purificar a α -galactosidase, a amostra proveniente da precipitação com 80% de sulfato de amônio foi submetida à cromatografia de troca-iônica em coluna aniônica Mono-Q (Pharmacia Biotech) em sistema de purificação FPLC Äkta (GE Healthcare) utilizando tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 e gradiente salino 0 a 0.5M de NaCl. Esta purificação foi acompanhada com ensaio enzimático de cada fração coletada durante a purificação, além da visualização do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida.

O cromatograma, resultado da purificação em Mono-Q, está apresentado na Figura 13, no qual é possível verificar, anteriormente ao início da aplicação do gradiente salino, um pico de proteínas que não interagiram

com a coluna e saíram na lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20mM pH 7.8 (*wash*).

Além disso, pode-se verificar que os picos *A*, *B* e *C*, picos que apresentaram atividade enzimática de α -galactosidase (Figura 13), deixaram de interagir com a coluna em concentrações baixas a medianas de NaCl, entre 100mM a 250mM.

Figura 13. Perfil cromatográfico da purificação em FPLC Äkta do extrato bruto enzimático submetido à coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). Identificação com letras (A-C) das frações coletadas que apresentaram atividade enzimática de α -galactosidase, onde: (A) Frações 47 a 51; (B) Frações 63 a 65; (C) Frações 66 a 69. (—) Perfil proteico quantificado por UV; (—) Gradiente de NaCl variando de 0-0.5M em 12 volumes de coluna (||) Frações coletadas com seus respectivos números.

O acompanhamento da purificação foi realizado através de ensaio enzimático de todas as frações coletadas durante a purificação em FPLC (Figura 14), utilizando como substrato PNP- α -Galactopiranosídeo, e eletroforese em gel de poliacrilamida das frações reunidas que continham atividade enzimática (Figura 15), visando determinar quais frações continham a enzima α -galactosidase e a qualidade da purificação, respectivamente.

A atividade enzimática da α -galactosidase, expressa em absorbância do PNP- α -Galactopiranosídeo a 405nm, de todas as frações coletadas na purificação em coluna Mono-Q se encontra na Figura 14. Observam-se três picos de atividade enzimática: frações 47 a 51 (pico A); frações 63 a 65 (pico B) e frações 66 a 69 (pico C), evidenciando mais de uma isoforma (pelo menos três) da enzima α -galactosidase, sendo uma delas, pico A, predominante.

Figura 14. Atividade enzimática da α -galactosidase expressa em absorbância a 405nm das frações coletadas durante a purificação em FPLC Äkta do extrato bruto enzimático submetido à coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (a) Frações 47 a 51; (b) Frações 63 a 65; (c) Frações 66 a 69.

As frações 47 a 51 (pico A) foram reunidas e uma alíquota foi destinada ao perfil proteico em eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 15), a fim de visualizar a qualidade da purificação, através da quantidade de bandas presentes.

O gel de poliacrilamida (Figura 15) após purificação em Mono-Q ainda apresentou muitas proteínas contaminantes, no entanto, observou-se uma banda (indicada pela seta) entre 59,4kDa e 30kDa. Esta banda se apresenta mais concentrada, do que as demais, evidenciando que este passo de purificação, apesar de não eliminar grande parte das proteínas contaminantes, concentrou a enzima de interesse.

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 das frações reunidas 47 a 51 (pico A) após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (→) Banda proteica concentrada de tamanho esperado para α -galactosidase.

4.2.4. Terceira etapa de purificação da α -galactosidase: Cromatografia de Gel Filtração (Superose)

Com a finalidade melhorar a purificação da α -galactosidase, as frações 47 a 51 reunidas na etapa de purificação em coluna aniônica Mono-Q (Pharmacia Biotech) foram submetidas à Cromatografia de Gel Filtração em coluna Superose 6 (GE Healthcare) em sistema de purificação FPLC Äkta (GE Healthcare) utilizando tampão Acetato de Amônio 50mM pH 5.0. Esta purificação foi acompanhada com ensaio enzimático de cada fração coletada durante a purificação somada à visualização do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida.

O cromatograma, resultado da purificação da α -galactosidase em coluna Superose 6, está apresentado na Figura 16, no qual se observa a presença de um único pico predominante. O pico identificado por *D* foi o único a apresentar atividade enzimática de α -galactosidase (Figura 17).

Figura 16. Perfil cromatográfico da purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare) das frações previamente semipurificadas (frações 47 a 51) em coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). Identificação com letra (D) das frações coletadas que apresentaram atividade enzimática de α -galactosidase, onde: (D) Frações 30-33. (—) Perfil proteico por quantificação por UV; (—) Gradiente de NaCl variando de 0-0.5M em 12 volumes de coluna; (||) Frações coletadas com seus respectivos números.

O acompanhamento da purificação foi realizado através de ensaio enzimático de todas as frações coletadas durante a purificação em FPLC (Figura 17), utilizando como substrato PNP- α -Galactopiranosídeo, e eletroforese em gel de poliacrilamida das frações reunidas que continham atividade enzimática (Figura 18) visando determinar a qualidade da purificação.

A atividade enzimática de α -galactosidase, expressa em absorbância do PNP- α -Galactopiranosídeo a 405nm, de todas as frações coletadas na purificação em coluna Superose 6 se encontra na Figura 17. Observa-se 1 pico de atividade enzimática que foi reunido em uma única fração: frações 30 a 33 (pico D).

Figura 17. Atividade enzimática da α -galactosidase expressa em absorbância a 405nm das frações coletadas durante a purificação em FPLC Äkta, utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare), da amostra semipurificada em coluna aniônica Mono-Q HR 10/10 (Pharmacia Biotech). (D) Frações 30 a 33.

As frações 30 a 33 (pico *D*) foram reunidas e uma alíquota foi destinada ao perfil proteico em eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 18), a fim de visualizar a qualidade da purificação, através da quantidade restante de proteínas contaminantes (bandas presentes).

O perfil proteico em gel de poliacrilamida (Figura 18) após purificação em Superose 6 ainda apresenta muitas proteínas contaminantes, no entanto, observa-se que a banda correspondente a α -galactosidase (*ver item 4.2.6.4*), banda indicada pela seta, apresenta-se mais concentrada quando comparado a mesma banda nas etapas anteriores de purificação (figura 25).

Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 das frações reunidas 30 a 33 (pico *D*) após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (Pharmacia Biotech). (→) Banda proteica concentrada de tamanho esperado para α -galactosidase.

Como visualizado no gel de poliacrilamida (Figura 25), a purificação proposta não foi eficiente em efetivamente purificar a α -galactosidase, no entanto a concentrou (ver tabela de purificação) e a semipurificou.

Tendo em vista a utilização da alíquota semipurificada em experimentos com o polissacarídeo galactomanano, procedeu-se com o sequenciamento interno de 8 bandas (entre os pesos moleculares de 59,4 kDa e 12,6kDa) para identificação da banda referente a α -galactosidase e determinação da sequência interna da enzima, bem como determinar a presença ou ausência das demais enzimas de mobilização de reserva do galactomanano (endo- β -mananase e β -manosidase) na alíquota semipurificada.

A determinação do peso molecular da α -galactosidase foi realizado por duas técnicas: através do gel de poliacrilamida e através da coluna Superose (purifica por peso molecular). A diferença entre as duas técnicas permite visualizar se a proteína assumiu estrutura quaternária com consequente mudança no peso molecular, pois o gel de poliacrilamida desnatura as proteínas, enquanto através da gel filtração a proteína está na forma nativa, podendo interagir com outras.

O peso molecular da α -galactosidase semipurificada determinado através do gel de poliacrilamida pelo cálculo do Rf da proteína de interesse e sua localização na curva de calibração traçada com os valores de Rf das proteínas marcadoras versus o *log* de seus pesos moleculares, conforme Weber & Osborn (1969), foi de, aproximadamente, 42 kDa (Figura 18). Os marcadores de peso molecular utilizados foram a miosina (195 kDa), β -galactosidase (111,6 kDa), albumina de soro bovino (59,4 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (24,7 kDa), lisozima (12,5 kDa) e aprotinina (6,4 kDa), adquiridos da Bio-Rad.

Enquanto o peso molecular da α -galactosidase determinado, através da Gel Filtração utilizando a calibração do fabricante (Tiroglobulina 669kDa, Ferritina 440 kDa, BSA 67 kDa e Ribonuclease 13,7 kDa), foi de aproximadamente 72 kDa.

4.2.5. Tabela de purificação

Visando determinar o fator de purificação e o rendimento da purificação, procedeu-se com a mensuração de proteínas totais e atividade enzimática da α -galactosidase com PNP- α Gal de alíquotas de cada etapa de purificação. Na Tabela 1 encontram-se os valores de atividade específica, fator de purificação e rendimento para cada etapa de purificação.

Analisando os valores da Tabela 1, nota-se um aumento de 2600% na atividade enzimática específica da α -galactosidase após purificação em Superose, quando comparado com a atividade enzimática específica do extrato bruto. Além disso, o fator de purificação encontrado após as 3 etapas de purificação é de 26,2 vezes e o rendimento da purificação de 1,28 %.

Tabela 1. Tabela de purificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. desenvolvida após a realização das três etapas de purificação: precipitação com Sulfato de Amônio 80%, Cromatografia de troca-iônica aniônica (Mono-Q) e Cromatografia de gel filtração (Superose).

Etapas de Purificação	Atividade Enzimática Específica ($\mu\text{molGal}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$)	Fator de purificação	Rendimento da Purificação (%)
Extrato Bruto	0,041	-	100
Precipitação com Sulfato de Amônio 80%	0,078	1,886	22,764
Mono-Q (aniônica)	0,742	17,962	3,219
Superose 6 (Gel Filtração)	1,083	26,196	1,275

4.2.6. Caracterização da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) (Megazyme®) quanto a temperatura ótima, pH ótimo e aspectos cinéticos

A α -galactosidase semipurificada foi caracterizada bioquimicamente quanto temperatura ótima, pH ótimo e aspectos cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Paralelamente a caracterização da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi realizada a caracterização da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) (Megazyme®) quanto os mesmos aspectos.

4.2.6.1. Temperatura ótima

Avaliando o perfil de atividade enzimática da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sob diferentes temperaturas (25° a 60°C, variando a cada 5°C), observou-se um acréscimo progressivo na atividade enzimática de 25°C a 50°C, sendo entre 50°C e 55°C a faixa de temperatura com maior atividade enzimática, seguido de uma queda abrupta na atividade enzimática a 60°C (Figura 19).

Figura 19. Determinação da temperatura ótima da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Avaliando o perfil de atividade enzimática da α -galactosidase (Megazyme[®]) de *Cyamopsis tetragonoloba* sob diferentes temperaturas (25° a 60°C, variando a cada 5°C), observou-se um acréscimo progressivo na atividade enzimática de 25°C a 40°C, sendo 40°C a temperatura com maior atividade enzimática. Observa-se também, uma queda da atividade enzimática a 45°C, um leve aumento na atividade enzimática a 55°C e, novamente, uma queda na atividade enzimática a 60°C (Figura 20).

Figura 20. Determinação da temperatura ótima da α-galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®).

4.2.6.2. pH ótimo

A caracterização da atividade enzimática da α-galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sob condições variadas de pH (2,3 a 7) evidenciou um aumento na atividade enzimática entre o pH 2,3 a pH 5,0, sendo entre pH 4,4 e pH 5,4 o intervalo com maior atividade enzimática, seguido de decréscimo mais acentuado desta atividade enzimática entre pH 5,4 e pH 7,0, onde a atividade enzimática é muito baixa (Figura 21).

Enquanto a caracterização da atividade enzimática da α-galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) sob condições variadas de pH (2,3 a 7,0) evidenciou um aumento na atividade enzimática entre o pH 2,3 a pH 6,0, sendo entre pH 5,4 e pH 6,4 o intervalo com maior atividade enzimática, seguido de decréscimo acentuado desta atividade enzimática entre pH 6,4 e pH 7,0 (Figura 22).

Figura 21. Determinação do pH ótimo da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Figura 22. Determinação do pH ótimo da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme).

4.2.6.3. Aspectos cinéticos - K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A determinação dos aspectos cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi calculado a partir dos dados conseguidos com o ensaio enzimático da α -galactosidase semipurificada e PNP- α -Gal em diferentes concentrações. Esses dados podem ser observados na figura 23.

O K_m da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. é de 1,8276mM, e o velocidade máxima é de 0,5024 $\mu\text{molGal} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$.

Figura 23. Curva de saturação do substrato 4-Nitrofenil-D-Galactopiranosídeo na presença da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos com o PNP- α -Gal nas seguintes concentrações (mM): 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10; 13; 15; 17; 20; 25; 30. A partir dos dados coletados foi calculado o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Os aspectos cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) foram calculados a partir dos dados conseguidos com o ensaio enzimático enzima comercial (0,250U/mL) e PNP- α -Gal em diferentes concentrações. Esses dados podem ser observados na figura 24. O K_m da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) é de 2,398 mM e a velocidade máxima é de 0,0248 $\mu\text{molGal} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$.

Figura 24. Curva de saturação do substrato 4-Nitrofenil-D-Galactopiranosídeo na presença da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos com o PNP- α -Gal nas seguintes concentrações (mM): 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10; 13; 15; 17; 20; 25. A partir dos dados coletados foi calculado o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®).

4.2.6.4. Análise do perfil proteico em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes de todas as etapas de purificação

Para comparar qualitativamente o perfil proteico de cada etapa da purificação: extrato bruto, precipitação com Sulfato de Amônio 80%, cromatografias de troca-iônica (Mono-Q) e gel filtração (Superose), foi realizada a separação das proteínas de cada etapa de purificação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (figura 25).

Analizando e comparando o perfil de proteínas do extrato bruto (figura 25 A) com os três passos de purificação (Figura 25 B, C, D), percebe-se uma evidente diminuição na quantidade de proteínas contaminantes após cromatografias de troca-iônica e gel filtração, no entanto, a precipitação com sulfato de amônio 80% parece não alterar o perfil de proteínas quando comparado com o extrato bruto.

Ao comparar-se o perfil de proteínas após as purificações em cromatografia de troca-iônica e cromatografia de gel filtração nota-se o desaparecimento de algumas bandas, evidenciando certa purificação, porém o

perfil proteico é muito parecido. Além disso, a banda de α -galactosidase correspondente a 42KDa (entre 59,4kDa e 30kDa), evidenciada pela seta (figura 25 D), fica mais concentrada quando compara-se o perfil proteico após cromatografia de troca-iônica (figura 25 C) e cromatografia de gel filtração (figura 25 D).

Dessa forma, com praticamente a manutenção do perfil proteico entre as purificações em FPLC e concentração da α -galactosidase, considera-se que a α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi semipurificada.

Figura 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R250 de todas as etapas de purificação. (A) Extrato bruto enzimático; (B) Precipitado de 80% de Sulfato de Amônio (ressuspendido em tampão Tris-HCl 20mM ph 7,8); (C) Alíquota das frações reunidas após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de troca-iônica aniônica (Mono-Q); (D) Alíquota das frações reunidas após purificação em FPLC Äkta utilizando coluna de gel filtração Superose 6 (GE Healthcare).

4.2.7. Sequenciamento interno da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Inicialmente a proposta do sequenciamento interno da α -galactosidase foi idealizada para obter-se a sequência interna da enzima purificada e compará-la com as α -galactosidasas já descritas e depositadas em bancos de dados.

No entanto, após análise dos resultados da purificação, onde houve uma semipurificação ainda com uma quantidade razoável de proteínas contaminantes, optou-se por realizar o sequenciamento interno de oito bandas do gel de poliacrilamida entre 59,4 kDa e 12,6 kDa (Figura 26), visando confirmar a banda referente da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e, conseqüentemente, a sequência interna da proteína, e identificar as demais bandas, para excluir a presença das demais enzimas da mobilização de reservas, endo- β -mananase e β -manosidase.

Figura 26. Identificação com números, de 1 a 8, das bandas recortadas do gel de poliacrilamida 12% submetidas ao sequenciamento interno para identificação das proteínas, principalmente da α -galactosidase, juntamente com a determinação da sequência interna da α -galactosidase semipurificada de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

Como o esperado, devido ao peso molecular conhecido de α -galactosidasas de plantas, a banda 1 foi identificada como uma α -galactosidase, tendo como primeiro *Hit* no banco de dados a α -galactosidase de sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar).

Os fragmentos identificados pela espectrometria compõem 22% da sequência de aminoácidos da α -galactosidase, sendo a sequência de aminoácidos apresentada abaixo:

**ALADYV-HSK-RMPGSLGHEE-QDAK-TT-GDIEDNWNSM-TSIADSNDK
W-ASYAGPGGWN-DPDMLEVGNG-GMTTEEYR-AP-LLVGCDIR-VAVIL-
WNR**

As bandas de 2 a 8 foram sequenciadas e na Figura 39 a 45 no ANEXO se encontram a lista de possíveis proteínas para cada uma delas, sendo que as bandas 2, 3, 4, 5 e 8 apresentaram α -galactosidase como possível proteína componente dessas bandas, mas não se apresentando como primeiro hit. Ressalta-se que nenhuma dessas proteínas foram identificadas como: endo- β -mananase ou β -manosidase, resultado importante para embasar a utilização da alíquota semipurificada nos experimentos conduzidos com o polissacarídeo galactomanano descrito no Capítulo 2 desta dissertação.

4.3. Análises das sequências de α -galactosidases previamente identificadas em plantas

Visando determinar similaridades entre a sequência de aminoácidos para α -galactosidases de plantas já depositadas em bancos de dados públicos e a sequência interna da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., foi realizada a análise de 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidases de plantas já depositadas em bancos de dados e a sequência interna da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., através de alinhamento e construção de árvores de relação.

Na Figura 27 encontra-se o resultado da construção da árvore de relação com *bootstrap* de mil repetições das 35 sequências de plantas e a sequência interna da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Nota-se a presença de três grandes ramos, aparentemente sem qualquer relação com a filogenia.

Embora a relação das α -galactosidases em 3 três grandes ramos não esteja relacionada à filogenia, alguns dos ramos mais internos, ramos identificados de *a-f* estão de acordo com a filogenia: (a) Fabaceae; (b) Fabaceae; (c) Fabaceae, (d) Rubiaceae; (e) Poaceae; (f) Pinaceae.

Os ramos marcados com • são ramos consistentes, visto que em 95% ou mais das árvores geradas para a construção da árvore de consenso estes ramos ficaram agrupados desta maneira, entre eles estão alguns dos ramos relacionados com a filogenia: ramo *b* (99%), ramo *d* (99%) e ramo *e* (98%).

Os demais ramos não identificados reúnem espécies de diversas famílias não apresentando relação com a filogenia, provavelmente apresenta relação com a função da enzima.

Figura 27: Análise das sequências de aminoácidos 35 de α -galactosidase de plantas conjuntamente com a sequência dos fragmentos de α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. semipurificada determinados por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF). Grupos identificados por letras estão de acordo com a filogenia: (A – vermelho) Fabaceae; (B - rosa) Fabaceae; (C – azul escuro) Fabaceae; (D - verde) Rubiaceae; (E – roxo) Poaceae; (F – azul claro) Pinaceae. A coloração dos ramos é a mesma da árvore de relação das 35 sequências de aminoácidos somente localizada na

figura 46 do anexo, no entanto, a identificação pelas letras é diferente, ou seja, os ramos coloridos por cada cor são os mesmos em ambas as árvores, mas a letra que o identifica não é a mesma. (•) Bootstrap > 95, ou seja, em 95% ou mais das 1000 árvores de relação geradas os ramos marcados com (•) ficaram agrupados como mostrado nesta árvore de relação.

V. Discussão

5.1. Determinação da porcentagem de germinação e pico de atividade enzimática

A germinação de sementes, fase compreendida entre a embebição e protrusão da radícula, é responsável por um conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos de reativação do metabolismo embrionário, culminando com o crescimento embrionário (Bewley & Black, 1994).

De acordo com Buckeridge & Dietrich (1996), Potomati & Buckeridge (2002), Tonini *et al.* (2007) o processo germinativo em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ocorre entre o segundo e terceiro dias após embebição, dado em concordância com 100% de sementes germinadas em 48 horas (2 dias) após embebição (Figura 6).

Após a protrusão da radícula, a mobilização da reserva de parede celular de galactomanano das sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. se inicia, atingindo seu auge entre o quarto e quinto dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich, 1996; Tonini *et al.*, 2006), devido ao aumento da atividade das hidrolases, α -galactosidase, endo- β -mannanase e β -manosidase, no endosperma (Buckeridge & Dietrich, 1996).

A máxima atividade de α -galactosidase encontrada no experimento proposto, durante o período pós-germinativo, ocorreu, consistentemente, no quarto dia após embebição (Figura 7), um dia atrasado ao que foi descrito por Potomati & Buckeridge (2002), Tonini *et al.* (2007). No entanto, possivelmente este atraso está relacionado às diferentes condições de embebição e desenvolvimento da plântula (fotoperíodo e temperatura) entre ambos os trabalhos (fotoperíodo de 12 horas e 27°C) e o experimento conduzido no presente trabalho (claro constante e 28°C).

Dessa forma, as sementes *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. destinadas à purificação da α -galactosidase foram retiradas das câmaras de germinação (BOD) no quarto dia após embebição, garantindo máxima concentração de enzima a ser purificada.

5.2. Purificação da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

As α -galactosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de resíduos de galactose α -1,6-ligados de galacto-oligossacarídeos e polímeros galacto-(gluco)-mananos (Fujimoto *et al.*, 2003).

Durante a mobilização de reserva de parede celular de galactomanano foi detectada a presença de três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase, endo- β -mananase e β -manosidase (Reid & Meier, 1972; McCleary & Matheson, 1976; Buckeridge *et al.*, 1995a; Buckeridge & Dietrich, 1996), que atuam sobre o galactomanano, liberando manose e galactose para o metabolismo, promovendo o crescimento da plântula (Buckeridge *et al.*, 2000a; Lisboa *et al.*, 2006).

McCleary & Matheson (1975), Reid & Edwards (1995) e Lisboa *et al.* (2006) evidenciaram que a degradação do galactomanano pelas três enzimas requer uma ordem de atuação das mesmas. Em sementes de leguminosas a ação da α -galactosidase é uma condição necessária para permitir acesso da enzima endo- β -mananase à cadeia principal do galactomanano, uma vez que, McCleary & Matheson (1976) demonstraram que a β -mannanase de *Gleditsia triacanthos* só hidrolisa as ligações β -(1,4) entre duas manoses contínuas sem ramificação.

Desta forma, a α -galactosidase é a primeira a atuar sobre o polissacarídeo, hidrolisando as ligações α -(1,6) entre as unidades de manano e galactose, em seguida, a endo- β -mananase atua nas ligações β -(1,4) da cadeia principal de manose, hidrolisando-a a oligossacarídeos, que, por sua vez, serão levados a monossacarídeos pela ação, nas ligações β -(1,4), da β -manosidase nas extremidades não-redutoras dos oligossacarídeos (Reid &

Meier, 1972; McCleary, 1983; Buckeridge *et al.*, 1995a; Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.*, 2000a).

Neste contexto fica evidente a importância da enzima α -galactosidase no processo de mobilização de reserva de parede celular de galactomanano e torna-se claro que a α -galactosidase ocorre em associação com outras hidrolases que podem dificultar o processo de purificação (Dey & Pridham, 1972).

Comumente, as técnicas mais utilizadas no processo de isolamento desta enzima são a precipitação com sulfato de amônio, fracionamento com solventes orgânicos, tratamento térmico, acidificação, troca-iônica, gel filtração e focalização isoeletrica (Dey & Pridham, 1972).

O procedimento adotado para a purificação da α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi adaptado do protocolo apresentado por Silva, 2001.

No presente caso, o processo de purificação não foi precedido por uma etapa de digestão do galactomanano endógeno visando evitar a perda de atividade enzimática durante a incubação a 30°C. Dessa forma o processo de purificação se inicia com a precipitação em sulfato de amônio, seguido de Cromatografia de Troca Aniônica (coluna Mono-Q – Pharmacia Biotech) em sistema FPLC (GE Healthcare) e Cromatografia de Gel Filtração (Superose 6) (GE Healthcare) também em sistema FPLC (GE Healthcare).

A primeira etapa de purificação: precipitação com sulfato de amônio, inicialmente foi padronizada para se determinar a saturação necessária para a precipitação da α -galactosidase. Conforme apresentado na Figura 10, a saturação de 80% foi a responsável pela precipitação da enzima de interesse, uma vez que, foi o precipitado a apresentar maior atividade enzimática.

A saturação de 60%, embora não apresentando valores de atividade enzimática comparáveis a de 80%, foi considerada possuidora de uma fração rica em α -galactosidase e, portanto, foi incluída na padronização. Diferentemente da saturação de 60%, o descarte não foi levado em consideração, pois mesmo apresentando atividade enzimática, possuía muitas proteínas contaminantes.

Conjuntamente aos resultados de atividade enzimática, a comparação do perfil proteico do extrato bruto, das saturações de 20%, 40%, 60% e 80% de

sulfato de amônio e do descarte (Figura 11), demonstraram que a precipitação com sulfato de amônio foi eficaz no seu objetivo, devido à gradual eliminação de proteínas contaminantes, visualizado pelo desaparecimento de bandas.

Além disso, a presença marcada de proteínas de peso molecular intermediário, entre 59,4kDa e 30kDa (Figura 11) nas saturações de 60% e 80%, intervalo de peso esperado para a α -galactosidase, corrobora a atividade enzimática encontrada nestas saturações. Feurtado *et al.* (2001) e Lisboa *et al.* (2003) demonstraram que a α -galactosidase de sementes de *Lycopersicum esculentum* (tomate) e de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. possuem peso molecular de 39.8kDa e 45kDa, respectivamente.

Assim, a padronização da precipitação com Sulfato de Amônio resultou em um protocolo onde as saturações a serem utilizadas são de 40%, visando retirar proteínas contaminantes e pigmentos, e de 80%, visando reunir a fração de enzima da saturação de 60% com a da saturação de 80%, aumentando a quantidade de enzima a ser purificada, uma vez que, o rendimento de purificação é baixo devido a perdas a cada etapa.

A aplicação do protocolo de precipitação com sulfato de amônio na amostra a ser submetida a todos os passos de purificação se fez necessária para diminuir a contaminação com pigmentos e proteínas, bem como, concentrar a α -galactosidase visando maiores rendimentos de purificação.

Na comparação dos perfis proteicos após precipitação com Sulfato de Amônio variando de 20% a 80% (padronização) e somente nas concentrações de 40% e 80% (etapa de purificação), nota-se que o protocolo de padronização, as 4 concentrações, é mais eficiente na retirada de proteínas contaminantes (figura 11 e figura 25) as custas de grande perda da enzima α -galactosidase.

Entretanto, a precipitação com Sulfato de Amônio como etapa de purificação (40% e 80%) apresenta praticamente o mesmo perfil proteico, mas com um aumento na concentração da α -galactosidase, visualizado por intensidade da banda referente à enzima (figura 25). Muito provavelmente a saturação de 60% seria a responsável pela retirada de grande parte das proteínas contaminantes, porém a perda enzimática é muito grande, sendo assim, optou-se pelas saturações de 40% e 80%, incorporando algumas proteínas contaminantes no processo de purificação.

A precipitação com Sulfato de Amônio é um protocolo reprodutível, pois, como se observa nas Figuras 10 e 12, o perfil de atividade enzimática se repete, sendo a saturação de 80% a responsável pela precipitação da α -galactosidase.

A segunda etapa de purificação: Cromatografia de Troca-Iônica com coluna aniônica (Mono-Q) em sistema FPLC revelou a presença de três isoformas de α -galactosidase (Figura 13 e 14 A, B, C), sendo a isoforma A identificada como a encontrada predominantemente às demais, devido a maior atividade enzimática encontrada (Figura 14).

A presença de isoformas de α -galactosidase foi primeiramente descrita por Petek & Dong (1961) em sementes de *Coffea sp* e *Plantago ovata*. Tonini *et al.* (2006) sugerem que a presença de isoformas de endo- β -mananase em endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seja para garantir a hidrólise do galactomanano, mesmo com as modificações estruturais que este sofre durante a mobilização.

Por outro lado, McCleary & Matheson (1974) detectaram múltiplas formas de α -galactosidase em sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), no entanto, somente uma delas estava relacionada ao endosperma.

Assim, as diferentes isoformas de α -galactosidase podem estar relacionadas tanto a diferenças estruturais do galactomanano durante a mobilização, como por exemplo, a diminuição de substituições por galactose demandaria uma α -galactosidase com maior afinidade ao substrato; como também a diferentes funções além da degradação do galactomanano, por exemplo, a degradação de açúcares da série rafínosica (Bewley, 1997).

Somado à demonstração da presença de isoformas, a cromatografia de troca aniônica, concentrou a α -galactosidase (Figura 15 e Tabela 1) e, embora o extrato semipurificado ainda apresente considerável quantidade de proteínas contaminantes (Figura 15), a cromatografia aniônica foi eficaz na remoção de parte desta contaminação, visto pelo pico de proteína anterior a aplicação do gradiente salino, denominado *wash*, que não interagiu com a coluna (Figura 13) e aumento de aproximadamente 18 vezes (Tabela 1) na atividade enzimática quando comparado com o extrato bruto.

A escolha da fração 47 a 51, pico A, para dar continuação a purificação em coluna de gel filtração foi realizada por dois motivos: a alta atividade

enzimática encontrada, o que possivelmente indica maior concentração de enzima e, portanto, maior rendimento ao final da purificação; e por entender que a presença predominante desta isoforma somado ao momento do desenvolvimento que estas sementes foram retiradas da incubação, pico da mobilização de reserva, indique alta probabilidade desta enzima estar relacionada a degradação do galactomanano.

A terceira etapa de purificação: Cromatografia de Gel Filtração com Coluna Superose 6 não foi efetiva na purificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., pois, como observado na figura 18, o perfil proteico após purificação em Superose apresentou proteínas contaminantes, no entanto, houve uma considerável concentração da enzima, visualizado pela intensidade da banda identificada pela seta (figura 18) e aumento de 26 vezes na atividade enzimática da α -galactosidase quando comparado com o extrato bruto (Tabela 1).

Sendo a Superose 6 uma coluna de gel filtração, ou seja, purifica por peso molecular, não era esperado que um *pool* de proteínas de diferentes pesos moleculares fosse agrupado em um mesmo pico. Infere-se que a α -galactosidase possa assumir estrutura quaternária com isoformas de peso molecular diferente, pois possui peso molecular diferente sob condições desnaturantes, 42 kDa, e na forma nativa, 72 kDa, como também a coluna Superose 6 apresentar problemas na separação, como por exemplo ruptura de gel.

Embora a purificação não tenha sido efetiva na eliminação completa de proteínas contaminantes, ela foi efetiva na concentração da α -galactosidase (Figura 18 seta; Tabela 1), o que permitiu o sequenciamento interno da enzima e consequente identificação como α -galactosidase.

A tabela de purificação (Tabela 1) corrobora a semipurificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., evidenciado pelo aumento de 26 vezes na atividade enzimática específica, ou seja, pela atividade enzimática específica levar em consideração a quantidade total de proteínas (em mg) na amostra, o aumento da atividade enzimática observada faz referência a diminuição da quantidade total de proteínas e manutenção da atividade da enzima.

Além disso, a tabela de purificação (Tabela 1) mostra um rendimento de purificação menor que 1,5%, como visto no trabalho de (Lisboa *et al.*, 2003), rendimento baixo para a condução dos experimentos do Capítulo 2, dado que nos fez caracterizar também a α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). Dessa forma, se ambas as enzimas possuírem as mesmas características, os experimentos do Capítulo 2 seriam realizados somente com a enzima comercial.

Conjuntamente aos dados da tabela de purificação (Tabela 1), os dados da eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) também mostram que as etapas de purificação da α -galactosidase não foram eficientes na efetiva purificação, no entanto havendo uma concentração da enzima e, conseqüentemente, uma semipurificação (Figura 25).

Ao compararmos, na figura 25, a raia identificada como extrato bruto (A) e a raia após precipitação em Sulfato de Amônio 80% (B) nota-se ausência de grandes mudanças no perfil proteico, pois, como dito anteriormente, a saturação de 60% de Sulfato de Amônio deve ser a responsável pela retirada de grande parte das proteínas contaminantes, porém com um custo alto na perda de enzima disponível para os próximos passos de purificação.

Por outro lado, a comparação do perfil proteico do extrato bruto (Figura 25 A) com os perfis proteicos das cromatografias em FPLC (Figura 25 C e D), nota-se a semipurificação, pela diminuição das bandas apresentadas e concentração da banda identificada como α -galactosidase (seta).

O mesmo pode ser dito da comparação entre as cromatografias em FPLC, Troca-iônica aniônica Mono-Q (Figura 25 C) e Gel Filtração Superose 6 (Figura 25 D), onde o perfil proteico apresenta pequenas diferenças, com desaparecimento e diminuição de intensidade de bandas, no entanto, os perfis se mostram muito semelhantes, evidenciando novamente a semipurificação.

A padronização da purificação da α -galactosidase, inicialmente, levava em consideração um quarto passo de purificação a Cromatografia de Troca-lônica Catiônica em FPLC utilizando a coluna CM (carboximetil). A inclusão desta etapa anteriormente a etapa de gel filtração se mostrou efetiva na purificação da α -galactosidase, no entanto, a coluna CM utilizada já era muito antiga e, além de reduzir muito a atividade enzimática da α -galactosidase, apresentou sinais evidentes de mau funcionamento, como vazamentos e

despressurização (bolhas de ar), o que tornou esta etapa de purificação inviável.

Assim, as etapas de purificação propostas, Precipitação em Sulfato de Amônio, Cromatografia de Troca-Iônica Aniônica e cromatografia de Gel Filtração, só foram eficazes na semipurificação e concentração da enzima (Figura 25; Tabela 1).

Embora a α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. só tenha sido semipurificada, o sequenciamento interno foi possível e eficaz no sequenciamento de 22% da enzima.

Observando a Figura 27, nota-se que a sequência da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. possui alta homologia com a sequência já descrita para *Cyamopsis tetragonoloba*, uma vez que em 99% das árvores de relação realizadas ambas as enzimas formaram um ramo.

O sequenciamento interno das demais bandas permitiu excluir a presença das demais enzimas da mobilização de reserva (Endo- β -mananase e β -manosidase), possibilitando a utilização da alíquota semipurificada nos experimentos apresentados no Capítulo 2, pois a ausência das demais enzimas permite a análise do modo de ação da α -galactosidase individualmente.

Além disso, a espectrometria de massas das demais bandas corroborou a hipótese da α -galactosidase, possivelmente, formar estrutura quaternária, pois as bandas 2, 3, 4, 5 e 8, de peso molecular menor do que a banda 1 (identificada como α -galactosidase) podem também ser identificadas como α -galactosidase, apesar desta possibilidade não ser o primeiro *Hit*, o que poderia evidenciar que as bandas apresentadas no gel de poliacrilamida não representam uma única proteína, sendo assim, essas bandas seriam uma mistura de isoformas de α -galactosidase com outras proteínas (Figuras 39 - 45, Anexo).

De forma a corroborar a hipótese da estrutura quaternária, Tonini *et al.* (2010) demonstraram por Western Blot utilizando anticorpo anti α -galactosidase e extrato bruto enzimático de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a presença de 8 bandas variando de 78 kDa a 12 kDa reativas ao anticorpo, evidenciando a presença de isoformas da α -galactosidase com diferentes tamanhos, que poderiam interagir entre si formando a estrutura quaternária.

A interação das isoformas de α -galactosidase formando a estrutura quaternária pode significar que a enzima necessita da formação do complexo de uma ou mais α -galactosidase para promover a mobilização de reserva, pela retirada das ramificações de galactose do galactomanano, de forma mais eficiente.

No entanto, Overbeeke & colaboradores (1989), Guerin & colaboradores (1992), demonstraram que a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) e a β -amilase de cevada podem ser ativadas através de digestão por enzimas proteolíticas.

Tonini & colaboradores (2010) sugeriram que haja a ação de proteases na ativação da α -galactosidase pré-formadas (peso molecular alto) e armazenadas na semente de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Dessa forma, pode-se inferir que as proteases na realidade são α -galactosidases já ativas que reconhecem uma α -galactosidase inativa e a cliva promovendo a ativação.

Além disso, durante a mobilização de reserva o polissacarídeo apresentaria uma mudança no padrão de ramificação com galactose, o que demandaria uma adaptação da α -galactosidase, esta adaptação poderia ser novamente uma proteólise por outras α -galactosidases ativas diminuindo a ainda mais o tamanho da enzima o que explicaria a variação de pesos moleculares encontrada.

Dessa forma, tanto a α -galactosidase poderia formar uma estrutura quaternária para agir sobre o galactomanano, na retirada das ramificações de galactose, como também, e mais provável, a interação entre as α -galactosidases seria para processamento da enzima, diminuindo o seu tamanho, ativando-a e/ou adequando-a as mudanças ao polissacarídeo.

A enzima α -galactosidase já foi descrita ocorrendo em micro-organismos, plantas e animais (Dey & Pridham, 1972) com o pH ótimo variando entre 3.8 a 6.7 e temperatura ótima também bastante variada (Dey & Pridham, 1972; Ademark, P. *et al.*, 2001).

Guimarães *et al.* (2001), Viana *et al.* (2002b) demonstraram temperaturas ótimas de α -galactosidase de sementes de *Glycine max* (soja) variedade Doko e CAC-1 nas faixas de 45°C-50°C e 40°C-55°C, respectivamente. Lima *et al.* (2004) apresentam a caracterização de temperatura ótima de α -galactosidase de cotilédones de *Platymiscium*

pubensces (Tamboril-da-mata) entre 50°C-55°C, enquanto Silva (2007) apresentou a temperatura ótima da α -galactosidase presente em cotilédones de *Schizolobium parahyba* (Guapuruvu) entre 40°C-45°C. Em todos os trabalhos, os autores relatam queda acentuada da atividade enzimática em 60°C.

Da mesma maneira, estudos de caracterização de pH ótimo de α -galactosidase de fontes diversas demonstram ampla variação nos valores. Guimarães *et al.* (2001), Viana *et al.* (2002b) demonstraram pH ótimo de α -galactosidase de sementes de *Glycine max* (soja) variedade Doko e CAC-1 nas faixas de pH 5.0 a 5.5 e pH 5.0 a 6.0, respectivamente. Lima *et al.* (2004) apresentaram a caracterização de pH ótimo de α -galactosidase de cotilédones de *Platymiscium pubensces* (Tamboril-da-mata) entre pH 4.5 a 6.0, enquanto Silva (2007) apresentou o pH ótimo entre 5.0 e 6.0 da α -galactosidase presente em cotilédones de *Schizolobium parahyba* (Guapuruvu).

Dessa forma, os resultados apresentados de temperatura ótima, variando entre 45°C a 50°C, e pH ótimo, variando na faixa pH 4.4 e pH 5.4, da enzima α -galactosidase de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. em Extrato Bruto corroboram com a bibliografia (Figura 8 e 9).

O pH ótimo da enzima α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. em extrato bruto (Figura 9) e semipurificada (Figura 21) é o mesmo, estando em ambos os casos na faixa de 4,4 a 5,4. A temperatura ótima apresenta uma ligeira diferença (em extrato bruto: 45°C a 50°C; semipurificada 50°C a 55°C), mas pode-se considerar praticamente a mesma faixa de temperatura ótima (Figuras 8 e 19).

No entanto, a comparação da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e da α -galactosidase comercial (Megazyme®) evidencia diferenças consideráveis em todos os quesitos analisados (Figuras 19 a 24), inclusive nos aspectos cinéticos, porém os valores de temperatura ótima, pH ótimo da α -galactosidase comercial (Megazyme®) estão dentro dos valores descritos na bibliografia (Dey & Pridham, 1972; Viana *et al.*, 2002b; Lima *et al.* (2004).

Tendo em vista as diferenças apresentadas entre as duas enzimas, semipurificada e a comercial, os experimentos conduzidos no Capítulo 2 foram

realizados com ambas as enzimas, até para determinar se essas características influenciavam no modo de ação da enzima em seu substrato.

Como apresentado anteriormente, as características de pH, temperatura e aspectos cinéticos são bem distintos entre as α -galactosidases já descritas de plantas (Dey & Pridham, 1972; Ademark, P. *et al.*, 2001), assim, as diferenças apresentadas pelas α -galactosidases estão de acordo com o que o já foi descrito para α -galactosidases na literatura.

5.3. Análises das sequências de α -galactosidase previamente identificadas em plantas

Feurtado *et al.* (2001) analisaram a sequência genômica da α -galactosidase de *Lycopersicum esculentum* (tomate) determinando o gene em 5,7Kb, com a região de codificante da enzima composta por 14 éxons interrompidos por 14 íntrons. Além disso, resultados da análise de hibridização do Southern com a sonda de cDNA de α -galactosidase de tomate (*LeaGal*) evidenciaram 1 única cópia do gene.

O número de genes em outras espécies não foi determinado, porém em alfafa, guar, *Ceratonia siliqua*, soja, *Phoenix dactylifera*, café, feijão, *Lupinus angustifolius* e *Trifolium repens*, que a α -galactosidase foi purificada, foram determinadas, pelo menos, 2 isoformas da enzima (Courtois & Petek, 1966; McCleary & Matheson, 1974; Williams *et al.*, 1978; Itoh *et al.*, 1979; Plant & Moore, 1982; Chandra Sekhar & DeMason, 1990; Dhar *et al.*, 1994).

A α -galactosidase de tomate não foi purificada, porém, Feurtado *et al.* (2001) demonstrou a presença de 3 isoformas, através da focalização isoelétrica, e concluiu que, pela presença de apenas 1 cópia do gene de α -galactosidase, as diferenças apresentadas pelas isoformas são provenientes de modificações pós-transcricionais.

A análise de cDNA da α -galactosidase de tomate, performada pelo mesmo autor, determina que a enzima madura possui 364 aminoácidos de comprimento, 39,8kDa, pl de 4,91 e é precedida por um peptídeo sinal. A presença de peptídeos sinais já foi reportada em café, guar, soja, feijão (Overbeeke *et al.*, 1989; Zhu & Goldstein, 1994; Davis *et al.*, 1996, 1997).

A presença de peptídeo sinal está relacionada ao envio das proteínas a mais de um local dentro da célula, como a parede celular, aos corpos protéicos ou embrião, evidenciando, possivelmente diferentes funções exercidas pelas α -galactosidases, dependendo do local para onde são enviadas (Feurtado *et al.*, 2001).

Feurtado *et al.* (2001) demonstraram, através do alinhamento da sequência de aminoácidos de α -galactosidase de tomate com sequências de aminoácidos de α -galactosidases de outras eudicotiledôneas, que a proteína α -galactosidase é conservada entre as espécies, apresentando cerca de 70% de identidade.

Além disso, a análise dessas sequências somadas as sequências de aminoácidos de fungos e metazoários na forma de árvore de relação produziu 3 clados distintos acompanhando a taxonomia (Feurtado *et al.*, 2001) e totalizou 40 resíduos conservados entre as α -galactosidases de eucariotos, entre eles a assinatura característica de α -galactosidase: **G - [LIVMFY] - x - [LIVMFY] - x - [LIVM] - D - [DF] - x - W - x - [RV] - [DNSF]** (Hofman *et al.*, 1999).

A análise das 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidases de plantas, através da construção da árvore de relação (Figura 46, Anexo), realizada no presente trabalho se mostrou bastante similar a árvore apresentada por Feurtado *et al.* (2001), com alguns ramos acompanhando a filogenia, porém a visualização não é tão clara devido a maior quantidade de sequências analisadas. Diferentemente a Feurtado & colaboradores (2001), neste trabalho preferiu-se a análise somente de sequências de plantas, visando entender as relações neste clado.

Por sua vez, a análise das 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidases já descritas em plantas conjuntamente com a análise da sequência de aminoácidos da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., através da construção da árvore de relação, quando comparada com a árvore de relação somente das 35 sequências de aminoácidos apresenta uma mudança na formação dos ramos e suas relações, o que aparentemente melhorou a explicação sobre as possíveis funções das α -galactosidases analisadas.

Da mesma forma que a árvore de relação das 35 sequências de aminoácidos, análise conjunta com a α -galactosidase sequenciada também agrupou algumas das sequências da enzima segundo a filogenia (Figura 27, A-F), entretanto, a maioria dos ramos não acompanhou a filogenia, o que pode ser devido a um agrupamento da enzima pela função exercida: degradação da série rafínosica, mobilização de reserva, entre outros.

Observa-se na Figura 27, cujos ramos identificados como A, B e C são ramos que acompanham a filogenia, família Fabaceae, que as α -galactosidases de leguminosas não se agruparam em um único ramo, mas em três com uma relação muito distante um do outro, corroborando a hipótese que as α -galactosidases estão sendo agrupadas de acordo com a função, independentemente, se acompanham a filogenia ou não.

O ramo *b*, ramo que agrupa as sequências de α -galactosidases de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Cyamopsis tetragonoloba*, muito provavelmente agrupa as α -galactosidases responsáveis pela retirada das galactoses do galactomanano durante a mobilização de reservas da semente, pois sabidamente essas espécies possuem como reserva de semente o galactomanano, reserva de parede celular (McCleary & Matheson, 1974; Buckeridge & Dietrich, 1990).

No entanto o ramo *c*, que agrupa *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* espécies que acumulam reserva proteica e oleogênica, e amilácea, respectivamente, a α -galactosidase presente seria, provavelmente, responsável pela degradação de açúcares da série rafínosica, nos primeiros estágios da germinação.

O ramo *a*, por sua vez, por estar agrupado juntamente a espécies como *Carica papaya* e *Cucumis sativus*, espécies produtoras de frutos com amadurecimento de fruto e, conseqüentemente, degradação da parede celular, deve conter α -galactosidases responsáveis pelo remodelamento do polissacarídeo durante a desmontagem da parede celular no amadurecimento do fruto (Gao & Schaffer, 1999; Soh *et al.*, 2006), e, no caso das espécies agrupadas (*Glycine Max* e *Pisum sativum*) no processo da mínima deposição de galactomanano existente nestas sementes.

Sugere-se que as sequências de aminoácidos de α -galactosidase que não se agruparam de acordo com a filogenia, sejam α -galactosidases com

funções similares, não necessariamente relacionadas à degradação do galactomanano, mas à degradação de oligossacarídeos da série rafínica ou de substratos galactosilados estocados no citoplasma, como demonstrado por McCleary & Matheson (1974) que das múltiplas isoformas apresentadas pelo guar, apenas uma estava relacionada à degradação de galactomanano.

A α -galactosidase sequenciada quando comparada as demais 35 sequências possui alta similaridade com a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (ramo consistente: 99%) e possivelmente possui a mesma função, de mobilização de reserva, sendo também utilizada nos experimentos conduzidos no Capítulo 2, como comparação no modo de ação da enzima.

VI. Conclusão

Baseado em todos os resultados apresentados, nota-se que as etapas de purificação escolhidas para a purificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (precipitação com Sulfato de Amônio 80%, Cromatografia de Troca-Iônica aniônica – Mono-Q, Cromatografia de Gel Filtração – Superose 6), não foi efetiva na purificação da α -galactosidase, mas sim em uma semipurificação (Figura 25).

A semipurificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. se mostrou livre das demais enzimas de mobilização de reserva (endo- β -mananase e β -manosidase) e a análise da sequência da α -galactosidase semipurificada evidenciou que esta realmente está envolvida na mobilização de reserva.

Embora só tenha ocorrido a semipurificação da α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi possível a detecção de isoformas da α -galactosidase, possivelmente estando estas isoformas relacionadas a diferentes funções (figuras 13 e 14, B e C) e adaptações da enzima a mudanças do polissacarídeo durante a mobilização de reservas (Figuras 26 e 27).

As duas isoformas encontradas após purificação em Mono-Q (Figuras 13 e 14, B e C) estariam relacionadas a outras funções, enquanto, as isoformas de

diferentes pesos moleculares encontradas após purificação em Superose (Figuras 25 D, 38 a 42 e 45, Anexo) estariam relacionadas com a mobilização de reserva (42kDa) e adaptações da enzima a mudanças do galactomanano (pesos moleculares menores).

Foi possível observar uma mudança do peso molecular da enzima α -galactosidase em condições desnaturantes (42kDa) e nativas (72kDa) (Figuras 16 e 18) possibilitando a inferência na formação de complexos enzimáticos (estrutura quaternária) na forma nativa, sugerindo que a própria α -galactosidase catalisaria a sua proteólise ativando α -galactosidases inativas (manteria o peso molecular) e modificando a enzima para se adaptar as mudanças no padrão de ramificação (diminuiria o peso molecular da enzima).

Dessa forma, é possível especular sobre a necessidade de proteases somente no início do processo de mobilização de reserva, para a ativação das primeiras α -galactosidases, que seriam modificadas proteoliticamente durante o restante do processo, como proposto por Tonini *et al.* (2010).

A α -galactosidase de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. semipurificada e caracterizada foi submetida a ensaios com o polissacarídeo nativo, galactomanano, da mesma espécie, visando a compreensão do modo de ação da enzima e, principalmente, da estrutura fina do galactomanano (Capítulo 2).

VII. Referências Bibliográficas

- ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, K.; STALBRAND, H. 2001. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology* 29:441–448.
- ALCÂNTARA, P.H.N., DIETRICH, S.M.C. & BUCKERIDGE, M.S. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. *Plant Physiol. Biochem.*, 37 (9), 653-663.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2^o ed. Plenum Press, New York. 445p.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1990. Galactomannan from Brazilian seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13:109-112.
- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R. & DIETRICH, S.M.C. 1995a. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. *Revista Brasileira de Botânica* 18:171-175.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117:33-43.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura* 48:153-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. & LIMA, D.U. 2000a. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *In*: GUPTA, A.K. & KAUR, N. *Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation*. Elsevier Science, Amsterdam. p. 283-317.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2000b. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:141-156.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. & LIMA, D.U. 2000c. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Edição Especial*, p.137-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. 2008. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*: 1–6.
- CHANDRA, S.K.N. & DEMASON, D.A. 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinating date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53-61.

- COURTOIS, J.E. & PETEK, F. 1966. α -galactosidase from coffee beans. *Methods in Enzymology* 8:565-670.
- DAVIS, M.O.; HATA, D.J.; JOHNSON, S.A.; WALKER, J.C. & SMITH D.S. 1996. Cloning, expression and characterization of a blood group B active recombinant α -D-galactosidase from soybean (*Glycine max*). *Biochemistry and Molecular Biology international* 39: 471-485.
- DAVIS, M.O.; HATA, D.J.; JOHNSON, S.A.; JONES, D.E.; HARMATA, M.A.; EVANS, M.L.; WALKER, J.C. & SMITH D.S. 1997. Cloning, expression and characterization of a blood group B active recombinant α -D-galactosidase from pinto bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochemistry and Molecular Biology international* 42: 453-467.
- DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. 1972. Biochemistry of α -galactosidases. *Advan. Enzymol.* 36: 91:130.
- DHAR, M.; MITRA, M.; HATA, J.; BUTNARIU, O. & SMITH, D. 1994. Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -D-galactosidase isozymes. *Biochemistry and Molecular Biology International* 34:1055-1062.
- DEMASON, D.A.; MADORE, M.A.; SEKHAR, K.N.C. & HARRIS, M.J. 1992. Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. *Protoplasma* 166:177-186.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M. & BEWLEY, J.D. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52:1239-1249.
- FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H. & MIZUNO, H. 2003. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. *J. Biol. Chem.* 278 (22): 20313-20318.
- GAO, Z. & SCHAFFER, A.A. 1999. A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiology* 119:979-987.
- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1992. Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds - studies with the sitiens mutant. *Plant Physiology* 99:952-958.
- GUERIN JR, LANCE RCM, WALLACE W. 1992 Release and activation of barley b-amylase by malt endopeptidases. *J Cereal Sci* 15:5-14.
- GUIMARÃES, V.M; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. & FELIX, C.R. 2001. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolisis of oligossacharides. *Phytochemistry* 58:67-73.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- HAMES B. D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D (eds) *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, New York.
- HOFFMAN, K.; BUCHER, P.; FLAQUET, L.; BAIROCH, A. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research* 27:215-219.

- ITOH, T.; SHIMURA, S.; ADACHI, S. 1979. α -galactosidase from alfafa seeds (*Medicago sativa* L.). Agricultural and Biological Chemistry 43:1499-1504.
- JARVIS, M.C. & MCCANN, M.C. 2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts
- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 223, 680-685.
- LIMA, E.E.; DE REZENDE, S.T.; BORGES, R.C.G. & PEREZ, S.C.J.A. 2004. Caracterização de α -galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli, Var. Pubecens (Tamboril da mata). Revista Brasileira de Sementes, Vol. 26, nº 2, p.82-90.
- LISBOA, C.G.S. 2003. Endo- β -mananase de endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.: purificação, caracterização e importância na germinação e desenvolvimento da plântula. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- LISBOA, C.G.S; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo- β -mananase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. Braz. J. Plant Physiol., 18(2):269-280.
- MANZI, A.E. & CEREZO, A.S. 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. Carbohydrate Research 134:115-131.
- MCCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1974. α -D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose depletion in germinating legume seeds. Phytochemistry 13:1747-1757.
- MCCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1975. Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds. Phytochemistry 14:1187-1194.
- MCCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. & SMALL, D.M. 1976. Galactomannans and a galactoglucomannan in Legume seed endosperms: structural requirements for β -mannanase hydrolysis. Phytochemistry 15:1111-1117.
- MCCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. Phytochemistry 22:649-658.
- McIlvaine, T. C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. Journal of Biological Chemistry 49:183-189.
- MOE, O.A.; MILLER, S.E. & IWEN, M.H. 1947. Investigation of the reserve carbohydrate of leguminous seeds. I. Periodate oxidation. Journal of the American Chemical Society 69:2621-2825.
- OVERBEEKE, N.; FELLINGER, A.J.; TOONEN, M.Y.; VAN WASSENAAR, D. & VERRIPS, C.T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the α -galactosidase cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). Plant Molecular Biology 13:541-550.
- PETEK, F. & TO DONG. 1961. Enzymologia, 23, 133.
- PLANT, A.R. & MOORE, K.G. 1982. α -D-Mannosidase and α -D-galactosidase from proteins bodies of *Lupinus angustifolius* cotyledons. Phytochemistry 21:985-989.

- POTOMATI, A. & BUCKERIDGE, M.S. 2002. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. 6^oed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 906p.
- REID, J.S.G. 1985a. Cell wall storage carbohydrates in seeds. *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses*. *Advances in Botanical Research* 11:125-155.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed. *Planta* 147:145-150.
- REID, J.S.G. & EDWARDS, M. 1995. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. *In*: STEPHEN, A.M. *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York. p. 155-186.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germination seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106:44-60.
- SCHALLER A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SILVA, C.O. 2001. Papel da β -galactosidase no mecanismo de degradação do xiloglucano de parede celular durante a mobilização de reserva em cotilédones de *Copaifera langsdorffii*. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, G.A. 2007. Purificação parcial e caracterização de uma α -galactosidase de sementes de Guapuruvu (*Schizolobium parahyba*). Dissertação de Mestrado pela Universidade de Brasília.
- SOH, C-P; ALI, Z.M. & LAZAN, H. 2006. Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry* 67:242-254.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: structure and function* 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVAI, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania*

- virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees: structure and function* 21:13-21.
- TONINI, P. P. 2009. Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e carboidratos e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes *Sesbania virgata* de (Cav.) Pers. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- TONINI, P. P.; CARRARA, T.B.; BUCKERIDGE, M. S. 2010. Storage proteins and cell wall mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: Structure and Function* v.24 (4): 675-684.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Organic Chemistry* 26:3097-3101.
- VIANA, S.F.; GUIMARÃES, V.M.; MOREIRA, M.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; de REZENDE, S.T. 2002b. Reduction of raffinose oligosaccharides in soymilk by alpha-galactosidase from germinating soymilk seeds. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 31., 2002, Caxambu. *Anais Caxambu: (SBBQ)*, p.95.
- WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- WILLIAMS, J.; VILLARROYA, H. & PETEK, F. 1978. A-galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*: Purification, physiochemical properties and mode of galactomannan hydrolysis *in vitro*. *Biochemical Journal* 175:1069-1077.
- ZHU, A. & GOLDSTEIN, J. 1994. Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -galactosidase. *Gene* 140:227-231.

CAPÍTULO 2

ESTRUTURA FINA DO GALACTOMANANO E A MODULAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE RESERVA EM SEMENTES DE *Sesbania virgata* (CAV.) PERS.

I. Resumo

Todas as células vegetais possuem parede celular. Além das funções típicas da parede celular primária, a parede celular ainda pode apresentar especializações, como o acúmulo de alguns polissacarídeos específicos, em sementes, que constituem uma reserva de carbono para o crescimento da plântula após a germinação. O galactomanano é um dos polissacarídeos hemicelulósicos que podem exercer este papel de reserva de parede celular. Os galactomananos são polissacarídeos constituídos de uma cadeia principal de resíduos de D-manose ligadas β -(1,4), ramificada por resíduos de D-galactose α -(1,6) ligados. A mobilização deste ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase. A compreensão da distribuição dos grupos de D-galactose ao longo da cadeia principal de D-manano é determinar a estrutura fina do polissacarídeo. Embora haja diferenças na estrutura fina de galactomananos de diferentes espécies, demonstrou-se a correlação direta entre o conteúdo de galactose e a viscosidade do polissacarídeo, bem como sugeriram a existência de um requerimento mínimo de substituições por galactose para manter o polissacarídeo solúvel. A quantidade e distribuição das substituições com D-galactose ao longo da cadeia principal (1,4)- β -D-manano estão íntima e diretamente relacionadas à taxa de hidrólise do polissacarídeo pela endohidrolase endo- β -mananase. Além da regulação da mobilização pelos já esperados fitohormônios, existe a evidência em xiloglucanos de reserva que a estrutura do polissacarídeo, através de suas ramificações pela galactose, codificaria, pelo menos, uma parte da informação para a sua própria degradação, o que se denominou código do xiloglucano. Visando evidenciar a presença de um código de degradação presente na estrutura fina do galactomanano, procedeu-se com hidrólises enzimáticas do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. utilizando a enzima endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) somente ou em conjunto com a α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Capítulo 1) ou com a α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®), seguido

de análise dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD. Além disso, também procedeu-se com hidrólises enzimáticas de galactomananos de 6 espécies com razão manose:galactose variando de 1:1 a 150:1 com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) e análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD. Os dados obtidos das comparações dos oligossacarídeos gerados em cada hidrólise sugerem que as ramificações do galactomanano podem modular o reconhecimento de sítios de clivagem pela endo- β -mananase: (1) existe a produção de oligossacarídeos limites de digestão F1, F2 e F3 (Figura 28) após hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase, como demonstrado para xiloglucanos; (2) os oligossacarídeos F1 possuem proporções distintas quando da hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase em diferentes concentrações (Experimento I e Experimento IV), evidenciando preferência por sítios com menor grau de galactosilação; (3) a presença da α -galactosidase diminui a produção dos oligossacarídeos F2 e F3, mostrando que estes não possuem resistência intrínseca à hidrólise e que a reação atinge o equilíbrio mesmo quando ainda existem sítios de clivagem ainda disponíveis (Experimento III); (4) e que polissacarídeos com estruturas diferentes, razão manose:galactose variando entre 150:1 a 1:1, são digeridos em diferentes taxas de hidrólise pela mesma enzima, evidenciando que a ramificação com galactose dificulta a ação da endo- β -mananase. Através dos resultados obtidos neste capítulo, sugere-se que a estrutura do polissacarídeo galactomanano também contenha, pelo menos, parte da informação requerida para seu próprio metabolismo, código para a sua degradação, estando esta informação contida na distribuição das ramificações com resíduos de D-galactose.

II. Introdução

Todas as células vegetais possuem parede celular. Esta estrutura é responsável por diversas funções, entre elas: propriedades mecânicas da parede celular, determinação da forma celular, manutenção do ambiente iônico celular, defesa contra invasão de patógenos, sinalização e controle do

potencial hídrico celular (Street & Öpik, 1984; Waldron & Brett, 1990; Carpita & Gibeaut, 1993).

A diversidade de funções exercidas pela parede celular reflete a diversidade da composição da parede celular. Segundo Carpita & Gibeaut (1993), a parede celular primária é composta por três domínios independentes com funções e composição distintas: domínio celulósico-hemicelulósico, péctico e protéico.

Além das funções típicas da parede celular primária, citadas acima, a parede celular ainda pode apresentar especializações, entre elas: o acúmulo de alguns polissacarídeos específicos, em sementes, que constituem uma reserva de carbono para o crescimento da plântula após a germinação (Bewley & Black, 1978; Buckeridge & Reid, 1996).

Entre os polissacarídeos que podem exercer este papel de reserva estão: o xiloglucano, o galactano e o (galacto)manano. Exceto pelo galactano, que constitui um acúmulo do domínio péctico, os demais polissacarídeos são do domínio hemicelulósico (celulose-hemicelulose) (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Os galactomananos são polissacarídeos constituídos de uma cadeia principal de resíduos de D-manose ligadas β -(1,4), ramificada por resíduos de D-galactose α -(1,6) ligados (Buckeridge *et al.*, 2000a). As substituições por galactose variam de espécie para espécie, se apresentando em razões Manose:Galactose (Man:Gal) de 1:1 a 4:1, ou seja, na proporção máxima (1:1) teoricamente todos os resíduos de manose estão substituídos por galactose, enquanto que na razão 4:1 a cada quatro resíduos de manose, apenas 1 é ramificado com galactose (Buckeridge & Dietrich, 1990; Buckeridge *et al.*, 2000a).

A razão manose:galactose, e por consequência, a distribuição dos resíduos de galactose, de acordo com Buckeridge & Dietrich (1990) e Buckeridge *et al.* (2000a, c), são aspectos importantes do polissacarídeo, estando relacionados à solubilidade da molécula e, consequente interação entre os polissacarídeos.

A compreensão da distribuição dos grupos de D-galactose ao longo da cadeia principal de D-manano é determinar a estrutura fina do polissacarídeo (McCleary *et al.*, 1985).

Diversas técnicas já foram empregadas em estudos de distribuição de resíduos de D-galactose ao longo da cadeia principal de D-manano de galactomananos de reserva de sementes de leguminosas (McCleary *et al.*, 1985).

Palmer & Ballantyne (1950) determinaram a estrutura do galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), como arranjo de resíduos de manose substituídos e não-substituídos por galactose, através de raio-X. Em 1978, Hoffman & Svensson, através de procedimento químico, determinaram que o arranjo das substituições de D-galactose na cadeia principal de D-manano, no galactomanano presente em guar, era aos pares e aos trios, contradizendo o estudo de Palmer & Ballantine (1950), onde as substituições por D-galactose foram determinadas como randômicas.

Estudos mais recentes, conduzidos por McCleary *et al.* (1985), utilizando uma estratégia alternativa para análise da estrutura fina do galactomanano, empregando enzimas particulares de degradação do galactomanano (endo- β -mananase, principalmente) e análise da composição dos oligossacarídeos produzidos, determinaram que a estrutura fina do galactomanano de *Ceratonia siliqua* possui substituições por D-galactose não-regulares, típico de substituições randômicas, enquanto o galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) possui as ramificações agrupadas aos duplos e aos trios, não se apresentando randômica.

Embora haja diferenças na estrutura fina de galactomananos de diferentes espécies, McCleary & colaboradores (1976) demonstraram a correlação direta entre o conteúdo de galactose e a viscosidade do polissacarídeo, bem como sugeriram a existência de um requerimento mínimo de substituições por galactose para manter o polissacarídeo solúvel.

No mesmo contexto, McCleary & Matheson (1983) concluíram que a quantidade e distribuição das substituições com D-galactose ao longo da cadeia principal (1,4)- β -D-Manano estão íntima e diretamente relacionadas à taxa de hidrólise do polissacarídeo pela endohidrolase endo- β -mananase.

Neste mesmo trabalho, endo- β -mananases provenientes de plantas foram ensaiadas com galactomananos altamente ramificados e o perfil de oligossacarídeos analisado por cromatografia de gel filtração. A análise dos perfis evidenciou, através da baixa quantidade de trissacarídeos (manotriose –

Man₃ - e manobiose com uma galactose – Gal¹Man₂), que há limitação na ação da enzima em polissacarídeos altamente ramificados.

Utilizando endo-β-mananase de fungos a taxa de hidrólise reportada ao guar (38% de substituição com galactose) foi entre 2%-12% (Reese & Shibata, 1965; Courtois & Le Dizet, 1968; Tsujisaka *et al.*, 1972; Emi *et al.*, 1972). No entanto, taxas de hidrólise para galactomananos contendo menores taxas de substituição foram maiores: para *Ceratonia siliqua* (23% de substituição com galactose) entre 15%-39% (Reese & Shibata, 1965; Courtois & Le Dizet, 1968); para café (2% de substituição com galactose) entre 36%-58% (Tsujisaka *et al.*, 1972; Emi *et al.*, 1972).

Tiné *et al.* (2003), analisando os oligossacarídeos produzidos pela hidrólise com celulase de xiloglucano de reserva de diferentes espécies (*Tamarindus indica*, *Copaifera langsdorffii* e *Hymenea courbaril*), constituídos de diferentes taxas de substituição por galactose, demonstraram que xiloglucanos de estrutura diferente são hidrolisados diferentemente; que os oligossacarídeos menos ramificados são atacados preferencialmente pela enzima e que a presença da β-galactosidase juntamente com a celulase, impede a formação de oligossacarídeos complexos F2 e F3 (combinações de oligossacarídeos menores), sugerindo que o padrão das substituições por D-galactose possuem influencia direta na ação enzimática.

Dessa forma, eles concluem que a estrutura do polissacarídeo, através de suas ramificações pela galactose, codificaria, pelo menos, uma parte da informação para a sua própria degradação (Tiné *et al.*, 2003), o que Buckeridge (2010) denominou código do xiloglucano.

O trabalho de Tiné e colaboradores (2003) foi possível pela identificação prévia da composição da estrutura dos oligossacarídeos produzidos após hidrólise com celulase realizada por Buckeridge *et al.* (1992), pois permitiu identificar sítios preferenciais da enzima pela presença ou ausência de ramificação (estrutura do polissacarídeo).

Dessa forma, no presente trabalho objetivou-se compreender a importância das ramificações de galactose presentes nos galactomananos na atuação da endoenzima endo-β-mananase, visando determinar se a estrutura fina do galactomanano também possui, pelo menos, parte da informação para

a sua própria degradação, ou seja, determinar a existência de um código em galactomananos.

III. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal

As sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. utilizadas na execução dos experimentos de determinação da estrutura fina foram coletadas de diversos indivíduos localizados nas imediações da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, evitando, assim, vício amostral. As sementes foram separadas dos frutos maduros e mantidas em frascos herméticos a temperatura ambiente.

As sementes de *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis* utilizadas na execução do experimento de determinação e comparação das estruturas finas dos galactomananos de diferentes proporções de galactose, foram adquiridas do banco de sementes presente no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (Lafieco).

3.2. Extração do manano e galactomanano

Os polissacarídeos de reserva (manano ou galactomanano) das 6 espécies (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*) foram extraídos de suas sementes a fim de possibilitar os experimentos de hidrólise enzimática visando o entendimento da estrutura fina do polissacarídeo (manano ou galactomanano) em cada espécie e a importância das ramificações de galactose na modulação do processo de mobilização de reserva.

3.2.1. Extração do manano de reserva das sementes de *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*

A extração do manano presente nas sementes de *Coffea arabica* e de *Euterpe edulis* foi feita, através do fracionamento da parede celular a partir do pulverizado das sementes, método outro do utilizado para a extração do galactomanano presente nas demais sementes, visto as diferenças de solubilidade encontrada entre os dois polissacarídeos.

O fracionamento de parede celular inicia-se com a extração de açúcares solúveis do pulverizado de sementes através de 4 lavagens com etanol 80% a 80°C por 20 minutos sob agitação, seguida de centrifugação a 1000g por 10 minutos e descarte do sobrenadante. Ao final das 4 etapas de extração de açúcar solúvel o precipitado foi seco em estufa a 60°C por 24 horas.

Em seguida, realizou-se a extração de pectinas através de 3 lavagens com oxalato de amônio 0,5% pH 7, seguido de centrifugação a 2700g por 15 minutos com descarte do sobrenadante e secagem do precipitado em estufa a 60°C por 24 horas.

Finalmente, realizou-se a extração do manano através de 3 lavagens com hidróxido de sódio 8M, seguido de centrifugação a 3000g por 15 minutos com descarte do precipitado, neutralização com ácido acético glacial e diálise contra água do sobrenadante. O dialisado foi congelado a -20°C e seco em liofilizador.

3.2.2. Extração do galactomanano de reserva das sementes de *Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*

A extração do galactomanano contido no endosperma das sementes de *Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis* e *Cyamopsis tetragonoloba* foi realizada segundo Buckerigde & Dietrich (1996). Partindo de endosperma e tegumento de sementes após 12 horas de embebição, isolados, secos e pulverizados em moinho de bolas foi extraído o galactomanano com água quente (80°C) por 6 horas, seguido de filtração através de dupla camada de tecido (*cheesecloth*). O extrato filtrado foi centrifugado a 10.000g por 30 min

a 5°C, seguido de precipitação do sobrenadante com 3 volumes de etanol a 5°C por 12 horas (*overnight*). O precipitado gerado após centrifugação a 3000g por 5 minutos a 5°C foi coletado, seco e pesado.

3.3. Análise de monossacarídeos

A análise de monossacarídeos dos polissacarídeos extraídos das seis espécies (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*) foi realizada através da hidrólise ácida com H₂SO₄, a fim de determinar a razão manose:galactose de cada (galacto)manano, ou seja, determinar a proporção de ramificação com galactose.

Cinco miligramas de cada polissacarídeo foi hidrolisado a seus monossacarídeos constituintes utilizando 72% H₂SO₄ – 4% H₂SO₄ (Saeman, Buhl & Harris, 1945). A solução de monossacarídeos foi neutralizada com NaOH 8M até pH entre 6 e 7, submetidas às resinas de troca iônica Dowex® para retirada do sal e analisadas em HPAEC-PAD em coluna Carbo Pac PA-1 (DIONEX, USA) em sistema Dionex DX-500, tendo como eluentes com fluxo 1 mL/min: NaOH 20mM, água e pós-coluna contendo NaOH 500mM.

3.4. Hidrólise enzimática com Endo-β-Mananase e α-Galactosidases

Todo o estudo de determinação da estrutura fina do polissacarídeo galactomanano, da compreensão da função das ramificações por galactose na modulação da mobilização de reserva e determinação no modo de ação da enzima α-galactosidase, foram realizados através de ensaios enzimáticos utilizando galactomanano ou manano comercial (Megazyme®) como substrato, a enzima endo-β-mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) individualmente ou em conjunto com as α-galactosidases (de *Cyamopsis tetragonoloba* – Megazyme® – e a semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Capítulo 1)).

O (galacto)manano utilizado como substrato nas hidrólises enzimáticas foi proveniente de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. individualmente,

ou em conjunto com o (galacto)manano de sementes de 5 espécies (*Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*), enquanto o manano comercial (Megazyme[®]) é proveniente do galactomanano de goma caroba submetido a tratamento enzimático e químico. A concentração do substrato foi diferente dependendo do experimento, estando na concentração de 1% ou 0,1%.

Como o substrato, as enzimas utilizadas também variaram a concentração dependendo do experimento. A endo- β -mananase foi utilizada em 4 concentrações 0,005U/mL, 0,05U/mL, 0,5U/mL e 1U/mL, enquanto a α -galactosidase comercial (Megazyme[®]) foi inicialmente diluída para 0,5U/mL e, como a α -galactosidase semipurificada, foi diluída para 4 concentrações diferentes: 1:5, 1:10, 1:100 e 1:1000.

A digestão enzimática, em si, foi preparada a partir de uma solução de galactomanano à 1% ou 0,1% (peso/volume) em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, na qual foi acrescido a endo- β -mannanase e/ou α -galactosidase na concentração desejada.

A incubação da mistura foi realizada a 30°C por 15 horas (*overnight*) ou 24 horas, com posterior fervura por 5 minutos (adaptado de Cavalari, 2009). Após a fervura, os tubos foram centrifugados à 2700g, por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. Ao sobrenadante foi acrescido 3 volumes de etanol absoluto, para a precipitação do polissacarídeos não digeridos, centrifugado à 4000g por 3 minutos, o sobrenadante coletado, seco em concentrador de amostras (sem aquecimento) e então ressuspenso em 1 mL de água deionizada para análise dos oligossacarídeos formados pela digestão enzimática, por HPAEC-PAD e/ou TLC.

Os experimentos conduzidos para determinação da estrutura fina, importância da ramificação de galactose na regulação da mobilização e o modo de ação da α -galactosidase podem ser divididos em dois grupos. No primeiro grupo estão cinco experimentos (Experimentos I a V) de hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (a 1% ou 0,1%) ou manano comercial (Megazyme) com as enzimas endo- β -mananase (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) e α -galactosidases (0,5U/mL, 1:5, 1:10, 1:100 e 1:1000) em diferentes concentrações.

Enquanto o segundo grupo de experimentos utilizou galactomanano de seis espécies (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*) a 1% e somente a enzima endo- β -mananase a 0,5U/mL.

A descrição de cada experimento se encontra nos itens: 3.6. *Análise da estrutura fina do galactomanano de Sesbania virgata (Cav.) Pers. através de hidrólises enzimáticas com Endo- β -manase de Aspergillus Níger (Megazyme), α -Galactosidase de Cyamopsis tetragonoloba (Megazyme) e α -galactosidase semipurificada de Sesbania virgata (Cav.) Pers.* e 3.7. *Análise da estrutura fina do (Galacto)manano de 6 espécies com diferentes proporções de ramificações com galactose, respectivamente.*

3.5. Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano

Os oligossacarídeos produzidos pelas digestões enzimáticas com endo- β -mananase sozinha ou em conjunto com a α -galactosidase foram analisados por HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) e/ou TLC (*Thin Layer Chromatography*).

3.5.1. Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano por HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*)

A análise por HPAEC-PAD de oligossacarídeos produto das hidrólises enzimáticas de (galacto)mananos foi desenvolvido por Crivellari, A.C.(2009 – dados não publicados) e performado no modelo ICS-3000 (Dionex[®]), utilizando coluna CarboPac PA-100. O eluente de base utilizado foi 88mM de NaOH e o eluente de arraste acetato de sódio 200mM em NaOH 88mM. Um gradiente da solução de acetato de sódio 200mM em NaOH 88mM foi aplicado à amostra visando separar os oligossacarídeos antes de sua detecção pelo detector de pulso amperométrico.

3.5.2. Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano por TLC (*Thin Layer Chromatography*)

A análise por cromatografia em camada delgada de oligossacarídeos produto das hidrólises enzimáticas de (galacto)mananos foi realizada como uma segunda maneira de analisar a diferença entre os oligossacarídeos da digestão das 6 espécies analisadas (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*).

O material hidrolisado ressuspendido em água deionizada foi aplicado a 1 cm da base da placa de sílica (Merck®) de 20x20cm e submetido à 3 corridas utilizando como eluente propanol:água:nitrometano na proporção 5:3:2.

A revelação da placa foi feita com a aspersão de solução etanólica contendo 5% de ácido sulfúrico, seguido de incubação em estufa a 100°C e fotografia do perfil de oligossacarídeos apresentados após revelação.

3.6. Análise da estrutura fina do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. através de hidrólises enzimáticas com Endo- β -manase de *Aspergillus Níger* (Megazyme), α -Galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme) e α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

As hidrólises enzimáticas conduzidas nos cinco experimentos descritos abaixo visavam elucidar: a estrutura fina do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., através da identificação de cada oligossacarídeo; a importância das substituições de galactose na atuação da endoenzima endo- β -mananase, observada através da comparação dos oligossacarídeos formados na presença da α -galactosidase e na ausência de mesma; e a compreensão do modo de ação da enzima α -galactosidase, através da determinação de sítios preferenciais de ataque, visualizado pelos oligossacarídeos formados em diferentes concentrações da endo- β -mananase.

3.6.1. Experimento I

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento I* visaram produzir o substrato para o *Experimento II* (oligossacarídeos provenientes da hidrólise do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. com endo- β -mananase) e analisá-lo quanto à proporção dos oligossacarídeos produzidos nas diferentes concentrações da enzima. Além disso, o *Experimento I* visou produzir oligossacarídeos de manano puro (sem ramificações com galactose) variando de monossacarídeo (manose) a heptassacarídeos (oligossacarídeo de 7 manoses) de manose para identificar nas análises de HPAEC-PAD os oligossacarídeos ramificados e não ramificados, possibilitando a determinação da composição de cada oligossacarídeo (hidrólise do manano comercial).

Dessa forma, as digestões enzimáticas foram preparadas a partir de uma solução de (galacto)manano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. à 1% e manano comercial à 1% (peso/volume) em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, na qual foi acrescido o volume equivalente a concentração final de 0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL de endo- β -mannanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]), obtendo-se um volume final de ensaio de 1 mL para cada concentração de enzima.

As hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo- β -mananase e α -galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos produzidos e submissão dos oligossacarídeos ao *Experimento II*.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise por HPAEC-PAD, é a mesma descrita no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano*.

Para cada substrato (galactomanano ou manano) em cada concentração de endo- β -mananase (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) a hidrólise enzimática foi realizada em duplicata. Além disso, dois controles foram feitos: galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e manano comercial (Megazyme[®]) em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0 sem a adição de enzima.

3.6.2. Experimento II

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento II* visaram produzir a desramificação da galactose dos oligossacarídeos provenientes da digestão do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. produzidos no *Experimento I* e, consequente, identificação da composição desses oligossacarídeos quanto a quantidade de manose e galactose presente, através da comparação dos cromatogramas da análise em HPAEC-PAD do *Experimento I* com do *Experimento II*.

Dessa forma, as digestões enzimáticas foram preparadas a partir de 200µL dos oligossacarídeos do *Experimento I* (provenientes da hidrólise do galactomanano e manano) ressuspensos em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, no qual foi acrescido 10 µL de α-galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ou 10 µL de α-galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL.

As hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo-β-mananase e α-galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise por HPAEC-PAD, é a mesma descrita no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano*.

Para combinação de cada substrato (oligossacarídeos de galactomanano ou de manano) com cada α-galactosidase (semipurificada ou comercial) a hidrólise enzimática foi realizada em duplicata. Além disso, três controles foram feitos: galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% e α-galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (duplicata), galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% e α-galactosidase Comercial (Megazyme®) (duplicata) e galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% e celulase de *Trichoderma longibachiatum* (Megazyme®).

3.6.3. Experimento III

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento III* visaram compreender a importância das ramificações de galactose no processo de degradação do galactomanano, através da comparação das hidrólises do polissacarídeo galactomanano a 1% com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 1U somente (*Experimento I*) e do polissacarídeo galactomanano a 1% com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 1U conjuntamente a α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ou a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]).

Dessa forma, a comparação da diversidade e da concentração dos oligossacarídeos formados nas hidrólises contendo ou não a α -galactosidase pode sugerir que a ramificação com galactose de alguma forma modula a degradação do galactomanano.

Assim, as digestões enzimáticas foram preparadas a partir de uma solução de galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. à 1% em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, na qual foi acrescido 10 μ L de endo- β -mannanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) a 1U/mL somente ou conjuntamente com 10 μ L de α -galactosidase a 0,5U/mL (semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ou de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®])).

A concentração de 0,5U/mL só é válida para a α -galactosidase comercial, a α -galactosidase semipurificada está na concentração após purificação, ou seja, sem qualquer diluição.

As hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo- β -mananase e α -galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise por HPAEC-PAD, é a mesma descrita no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano*.

Todas as hidrólises enzimáticas foram realizadas em duplicata.

3.6.4. Experimento IV

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento IV* visaram compreender o modo de ação da enzima endo- β -mananase (Megazyme) em diferentes concentrações (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) quando na presença da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e a α -galactosidase comercial (Megazyme®), ambas na máxima concentração de 0,5U/mL e galactomanano nas concentrações de 1% e 0,1%.

Dessa forma, a comparação dos oligossacarídeos formados nas diferentes concentrações da endo- β -mananase na mesma concentração da α -galactosidase (0,5U/mL) e em concentrações distintas do galactomanano (1% ou 0,1%) pode evidenciar preferência em alguns sítios de clivagem na cadeia de principal de manano.

Assim, as digestões enzimáticas foram preparadas a partir de uma solução de galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. à 1% ou 0,1% em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, na qual foi acrescentado 10 μ L de endo- β -mannanase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) e 10 μ L de α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (0,5U/mL – concentração pós-purificação) ou 10 μ L de α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL.

A concentração de 0,5U/mL só é válida para a α -galactosidase comercial, a α -galactosidase semipurificada está na concentração após purificação, ou seja, sem qualquer diluição.

As hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo- β -mananase e α -galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise por HPAEC-PAD, é a mesma descrita no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano*.

Para combinação de cada concentração da endo- β -mananase (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) com cada concentração (1% ou 0,1%) do

substrato galactomanano e cada α -galactosidase (semipurificada ou comercial) a 0,5U/mL, a hidrólise enzimática foi realizada em duplicata.

3.6.5. Experimento V

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento V* visaram produzir oligossacarídeos de manano puro (sem ramificações com galactose) variando de manose a heptassacarídeos de manose para identificar nas análises de HPAEC-PAD os oligossacarídeos ramificados e não ramificados, possibilitando a determinação da composição de cada oligossacarídeo (hidrólise do manano comercial).

Dessa forma, as digestões enzimáticas foram realizadas em 2 ciclos de hidrólises, no primeiro ciclo a α -galactosidase comercial a 0,5U/mL acrescida de uma solução de manano a 1% (Megazyme[®]) em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, e no segundo ciclo de digestão o manano foi submetido à hidrólise com a enzima endo- β -mananase (Megazyme[®]) em diferentes concentrações (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL).

As hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas a centrifugação para descarte do sobrenadante e, em seguida, o precipitado (manano desgalactosilado) foi submetido a novo ciclo de digestão, agora com endo- β -mananase.

Novamente as hidrólises foram mantidas a 30°C por 15 horas (*overnight*) e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo- β -mananase e α -galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos produzidos por HPAEC-PAD. A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise por HPAEC-PAD, é a mesma descrita no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano*.

Para combinação de cada concentração da endo- β -mananase (0,005U/mL, 0,05U/mL e 1U/mL) com a α -galactosidase comercial a 0,5U/mL e substrato galactomanano a 1%, a hidrólise enzimática foi realizada em duplicata.

3.7. Análise da estrutura fina do (Galacto)manano de 6 espécies com diferentes proporções de ramificações com galactose

Visando determinar as diferenças na estrutura fina do polissacarídeo (manano ou galactomanano) de cada espécie (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*) e a importância das substituições de galactose na atuação da endoenzima endo- β -mananase, impedindo-a de hidrolisar o polissacarídeo a oligossacarídeos, realizou-se o experimento que comparou os oligossacarídeos (produtos da hidrólise com endo- β -mananase), das 6 espécies vegetais, que sabidamente possuem proporções de substituição por D-galactose diferentes, ou seja, razão manose:galactose variando de 1:1 a 500:1, através de hidrólises enzimáticas e posterior análise por HPAEC-PAD e TLC dos oligossacarídeos formados.

As digestões enzimáticas foram preparadas a partir de uma solução de (galacto)manano (de cada espécie) à 1% (peso/volume) em tampão acetato de amônio 50mM pH 5.0, na qual foi acrescido o volume equivalente a concentração final de 0,5U de endo- β -mannanase, obtendo-se um volume final de ensaio de 1 mL. As hidrólises foram mantidas a 30°C por 24 horas e após 5 minutos de fervura foram submetidas ao protocolo de precipitação com 3 volumes de etanol, já descritas no item 3.4. *hidrólise enzimática com endo- β -mananase e α -galactosidases*, para posterior análise dos oligossacarídeos.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos, produtos desta hidrólise, por HPAEC-PAD e TLC, são as mesmas descritas no item: 3.5. *Análise dos oligossacarídeos de (Galacto)manano.*

IV. Resultados

4.1. Análise da estrutura fina do galactomanano de Sesbania virgata (Cav.) Pers. através de hidrólises enzimáticas com Endo- β -manase de Aspergillus niger (Megazyme), α -Galactosidase de Cyamopsis tetragonoloba (Megazyme) e α -galactosidase semipurificada de Sesbania virgata (Cav.) Pers.

As hidrólises enzimáticas conduzidas nos cinco experimentos descritos visavam elucidar: a estrutura fina do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., através da identificação de cada oligossacarídeo; a importância das substituições de galactose na atuação da endoenzima endo- β -mananase, observada através da comparação dos oligossacarídeos formados na presença da α -galactosidase e na ausência de mesma; e a compreensão do modo de ação da enzima α -galactosidase, através da determinação de sítios preferenciais de ataque desta enzima, visualizado pelos oligossacarídeos formados após hidrólise da α -galactosidase e hidrólise da endo- β -mananase em diferentes concentrações.

4.1.1. Experimento I

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento I* visaram produzir o substrato para o *Experimento II* (oligossacarídeos provenientes da hidrólise do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. com endo- β -mananase) e analisá-lo quanto à proporção dos oligossacarídeos produzidos nas diferentes concentrações da enzima. Além disso, o Experimento I visou produzir oligossacarídeos de manano puro (sem ramificações com galactose) variando de monossacarídeo (manose) a decassacarídeos (oligossacarídeo de 10 manoses) de manose para identificar, nas análises de HPAEC-PAD, os oligossacarídeos ramificados e não ramificados, possibilitando a determinação da composição de cada oligossacarídeo (hidrólise do manano comercial).

A hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. resultou no perfil de oligossacarídeos apresentados na Figura 28. Os oligossacarídeos são identificados como: oligossacarídeos F1, os quais variam de dissacarídeos a decassacarídeos galactosilados ou não, enquanto os oligossacarídeos identificados como F2 e F3 são oligossacarídeos F1 combinados aos pares e trios, respectivamente (Figura 28).

É possível observar nos primeiros 19 minutos de corrida um grupo de 6 picos identificados como oligossacarídeos F1, ou seja, os oligossacarídeos base da estrutura do galactomanano.

Entre os 20 e 22 minutos de corrida, encontra-se um segundo grupo de picos que são identificados como oligossacarídeos F2, ou seja, a combinação aos pares dos oligossacarídeos F1. Já entre os minutos 24 e 27 da corrida, encontra-se um terceiro grupo de picos identificados como oligossacarídeos F3, a combinação aos trios dos oligossacarídeos F1 (Figura 28).

Ao visualizar e comparar o perfil cromatográfico apresentado na figura 28 com os demais experimentos (*Experimento I a V*) nota-se a junção dos picos G e H e a separação dos oligossacarídeos F2 e F3, diferentemente do encontrado nos *Experimentos I a V*, devido ao ajuste no programa do HPAEC-PAD para justamente separar os oligossacarídeos F2 e F3.

Figura 28: Análise em HPAEC-PAD (Dionex) com coluna PA-100 dos oligossacarídeos formados após hidrólise enzimática exaustiva com Endo- β -mannanase do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., visando verificar perfil dos oligossacarídeos produto da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mananase. (F1) dissacarídeos a decassacarídeos galactosilados ou não

base do polissacarídeo; (F2) combinação aos pares dos oligossacarídeos de F1; (F3) combinação aos trios dos oligossacarídeos de F1.

Os produtos das hidrólises enzimáticas do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme) (0,005U, 0,05U e 1U) e a comparação aos pares (0,005Ux0,05U; 0,005Ux1U; 0,05Ux1U) dos oligossacarídeos formados se encontram na figura 29.

Nas três concentrações de endo- β -mananase utilizadas é possível identificar os oligossacarídeos identificados de A-I e os oligossacarídeos agrupados F2 e F3. Apesar da presença de todos os oligossacarídeos nas três concentrações, a proporção entre os oligossacarídeos formados e, portanto, a preferência na produção de cada oligossacarídeo difere em cada concentração (Figura 29 II, III e IV).

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mananase a 0,005U e 0,05U (Figura 29 V) evidencia a preferência da formação do pico C e G na concentração de 0,005U de enzima, enquanto o pico A (manobiose) é preferencialmente formado em 0,05U.

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mananase a 0,005U e 1U (Figura 29 VI) apresenta como oligossacarídeos preferencialmente produzidos na concentração de 0,005U os representados por B (manotriose), enquanto os picos A, C, E e H são preferencialmente produzidos em 1U.

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mananase a 0,05U e 1U (Figura 29 VII) não difere muito do comparativo a 0,005U e 1U (Figura 29 VI), onde o oligossacarídeo preferencialmente produzido a 0,05U é a manotriose (pico B), enquanto os oligossacarídeos formados preferencialmente por 1U são os presentes nos picos A, C, E, G e H.

Figura 29: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo-β-mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U. (I) Controle (galactomanano sem endo-β-mananase); (II) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo-β-mananase na concentração de 0,005U; (III) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo-β-mananase na concentração de 0,05U; (IV) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com

endo- β -mananase na concentração de 1U; (V) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 0,05U; (VI) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,05U e 1U. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3) e/ou trissacarídeo (G^1M_2); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

A razão entre oligossacarídeos F1 e os oligossacarídeos F2+F3 (razão F1/F2) representa o quanto a enzima endo- β -mananase foi capaz de reduzir o polissacarídeo a oligossacarídeos F1 e/ou F2 e F3 e é realizada pela divisão da somatória de todas as áreas dos picos denominados F1, pela somatória de todas as áreas dos picos denominados F2+F3.

A razão F1/F2 encontrada para as concentrações de 0,005U, 0,05U e 1U foram 4,11; 2,85 e 5,26, respectivamente.

Os produtos das hidrólises enzimáticas do manano comercial (Megazyme[®]) a 1% com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) (0,005U, 0,05U e 1U) e a comparação aos pares (0,005Ux0,05U; 0,005Ux1U; 0,05Ux1U) dos oligossacarídeos formados se encontram na figura 30.

Ao analisar os oligossacarídeos formados nas três concentrações de enzima (0,005U, 0,05U e 1U) nota-se uma tendência na diminuição da diversidade de oligossacarídeos formados. Nas concentrações de 0,005U e 0,05U de endo- β -mananase utilizadas é possível identificar os oligossacarídeos identificados de A, B, D, E, H e F, picos F1, sem a detecção de qualquer pico F2 e/ou F3. Na concentração de 1U de endo- β -mananase somente os picos A, B e E são detectados, sem qualquer detecção de oligossacarídeos F2 e/ou F3 (Figura 30 II, III e IV).

Os oligossacarídeos comuns às três concentrações de endo- β -mananase, A, B e E, possuem proporções distintas entre os oligossacarídeos formados evidenciando, novamente, que a preferência na produção de cada oligossacarídeo difere em cada concentração (Figura 30 II, III e IV).

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do manano com endo- β -mananase a 0,005U e 0,05U (Figura 30 V) evidencia a preferência da formação do pico *B* (manotriose) na concentração de 0,005U de endo- β -mananase, enquanto o pico *A* (manobiose) e pico *E* são preferencialmente formados em 0,05U. Além disso, com exceção do pico *D*, os demais picos possuem área total maior, indicando maior quantidade de oligossacarídeos, em 0,05U do que em 0,005U.

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do manano com endo- β -mananase a 0,005U e 1U (Figura 30 VI) apresenta como oligossacarídeos preferencialmente produzidos na concentração de 0,005U os representados por *B* (manotriose), *D* e *F* enquanto os picos *A* e *E* são preferencialmente produzidos em 1U.

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do manano com endo- β -mananase a 0,05U e 1U (Figura 30 VII) não difere muito do comparativo a 0,005U e 1U (Figura 30 VI), onde os oligossacarídeos preferencialmente produzidos a 0,05U são a manotriose (pico *B*), pico *D* e pico *F* enquanto o oligossacarídeo formado preferencialmente por 1U é o presente no pico *A* (manobiose).

A presença de oligossacarídeos diferentes de manobiose (*A*) e manotriose (*B*) nas hidrólises de manano com endo- β -mananase sugere a presença remanescente de ramificações com galactose (Figura 30 V, VI, VII). Dessa forma, realizou-se o *Experimento V* visando a retirada das galactoses remanescentes, consequentemente, a hidrólise completa do manano a manobiose e manotriose na maior concentração de endo- β -mananase (1U) e a formação de oligossacarídeos de tamanho variado (monossacarídeo a nonassacarídeo) sem ramificações de galactose na menor concentração (0,005U), principalmente.

A comparação da área total dos oligossacarídeos formados nas três concentrações de enzima permite a inferência na taxa de hidrólise do polissacarídeo a oligossacarídeo F1 e é realizada pela soma da área de todos os picos denominados F1.

A área total dos oligossacarídeos F1 encontrada para as concentrações de 0,005U, 0,05U e 1U foi 308,747; 434,737 e 425,389, respectivamente.

Figura 30: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do manano comercial (Megazyme®) com endo-β-mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U. (I) Controle (manano sem endo-B-mananase); (II) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo-β-mananase na concentração de 0,005U; (III) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo-β-mananase na

concentração de 0,05U; (IV) perfil de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase na concentração de 1U; (V) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 0,05U; (VI) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U e 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase nas concentrações de 0,05U e 1U. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$). Os oligossacarídeos identificados A-F são denominados oligossacarídeos F1.

4.1.2. Experimento II

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento II* visaram produzir a desramificação da galactose dos oligossacarídeos provenientes da digestão do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. produzidos no *Experimento I* e, consequente, identificação da composição desses oligossacarídeos quanto a quantidade de manose e galactose presentes, através da comparação dos cromatogramas da análise em HPAEC-PAD do *Experimento I* com do *Experimento II*.

Os produtos das hidrólises enzimáticas dos oligossacarídeos do *Experimento I* (galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) a 0,005U, 0,05U e 1U) com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a comparação do perfil de oligossacarídeos produto do *Experimento I* e do *Experimento II* em cada concentração de endo- β -mananase e os controles da hidrólise se encontram na figura 31.

O controle do polissacarídeo a 1% na ausência de qualquer enzima (figura 31 I) mostra que o polissacarídeo apresenta em quantidade apreciável os oligossacarídeos representados pelos picos C e G. Um segundo controle com polissacarídeo a 1% e α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Figura 31 II) mostra atividade esperada da α -galactosidase, pela presença do pico de galactose, e os mesmos picos C e G apresentados pelo controle do polissacarídeo a 1% sem qualquer enzima, evidenciando que não

há contaminação da enzima semipurificada por Endo- β -mananase ou β -manosidase.

O terceiro controle com polissacarídeo a 1% e celulase de *Trichoderma longibachiatum* (Megazyme®) (Figura 31 III) apresentou os mesmos picos C e G apresentados pelo controle do polissacarídeo a 1% sem qualquer enzima, evidenciando que o galactomanano não é digerido a oligossacarídeos pela ação da celulase, bem como, demonstrando que o substrato de galactomanano possui um grau de pureza considerável, sendo livre de xiloglucano, β -glucano e celulose.

A ação da α -galactosidase semipurificada foi muito semelhante nos oligossacarídeos produtos da hidrólise prévia com a endo- β -mananase nas três concentrações, visto pela mesma diversidade de picos apresentados nos perfis cromatográficos, picos estes identificados de A-M (F1) e dos oligossacarídeos F2 e F3. (Figura 31 IV, V, VI).

Apesar da presença de todos os oligossacarídeos nas três concentrações, existem diferenças na proporção entre os oligossacarídeos em cada concentração de endo- β -mananase após ação da α -galactosidase semipurificada (Figura 31 IV, V, VI).

A determinação da razão entre oligossacarídeos F1 e os oligossacarídeos F2+F3 (razão F1/F2) após a ação da α -galactosidase semipurificada sugere que ocorra a realocação dos oligossacarídeos F2 e F3 em picos de oligossacarídeos F1, visto que a perda das ramificações com galactose diminuem os oligossacarídeos tornando-os F1, bem como pode sugerir a realocação dos oligossacarídeos F1 ainda ramificados a oligossacarídeos F1 menores. Assim, era esperado que após hidrólise com a α -galactosidase a razão F1/F2 fosse maior da encontrada no *Experimento I* (Tabela 2).

A razão F1/F2 encontrada após hidrólise com a α -galactosidase semipurificada dos oligossacarídeos produtos da hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase nas concentrações de 0,005U, 0,05U e 1U foram: 4,92; 14,26 e 7,98, respectivamente, valores estes maiores do que os encontrados após a hidrólise com endo- β -mananase no *Experimento I* (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação da razão F1/F2 do *Experimento I* (hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase) com a razão do *Experimento II* (hidrólise dos oligossacarídeos do *Experimento I* somente com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.).

Endo- β -Mananase (U/mL)	Razão F1/F2 Experimento I	Razão F1/F2 Experimento II
0,005 U	4,11	4,92
0,05U	2,85	14,26
1U	5,26	7,98

O perfil cromatográfico comparativo da hidrólise enzimática do galactomanano com endo- β -mananase a 0,005U (*Experimento I*) e da hidrólise com α -galactosidase semipurificada dos oligossacarídeos produto da digestão com endo- β -mananase na mesma concentração (*Experimento II*) (Figura 31 VII) evidencia o surgimento de três novos oligossacarídeos, picos *K*, *L* e *M*, e desaparecimento do oligossacarídeo identificado pelo pico *I*, após ação da α -galactosidase.

Além disso, após a hidrólise com α -galactosidase semipurificada dos oligossacarídeos produtos da digestão com endo- β -mananase a 0,005U notou-se a mudança na proporção dos picos de manobiose (*A*), manotriose (*B*), tetrassacarídeos (*C*), hexassacarídeos (*E*) e octa e nonassacarídeos (*G* e *H*) (Figura 31 VII). Esta mudança na proporção está explorada na Tabela 3.

Os perfis cromatográficos comparativos das hidrólises enzimáticas do galactomanano com endo- β -mananase a 0,05U e 1U (*Experimento I*) e da hidrólise com α -galactosidase semipurificada dos oligossacarídeos produtos das digestões com endo- β -mananase nas mesmas concentrações (*Experimento II*) (Figura 31 VIII e IX) apresentaram os mesmos resultados descritos para a concentração de 0,005U: o surgimento de três novos oligossacarídeos, picos *K*, *L* e *M*, desaparecimento do oligossacarídeo identificado pelo pico *I* e mudança nas proporções dos picos *A*, *B*, *C*, *E*, *G* e *H*, após ação da α -galactosidase semipurificada (Figura 31 VIII e IX).

Figura 31: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. dos oligossacarídeos produto da hidrólise do galactomanano a 1% de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U, 0,05U e 1U (*Experimento I*). (I) Controle (galactomanano a 1% sem enzima); (II) Controle (galactomanano a 1% com α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.; (III) Controle (galactomanano a 1% com celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme[®])); (IV) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,005U; (V) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,05U; (VI) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,005U de endo- β -mannanase; (VIII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,05U de endo- β -mannanase; (IX) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 1U de endo- β -mannanase. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos (possíveis oligossacarídeos presentes: $G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$); (K-L) octassacarídeos e nonassacarídeos sem ramificação; (M) oligossacarídeos >10 resíduos de manose (possivelmente resultado da desramificação do pico I). Os oligossacarídeos identificados A-M são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

McCleary *et al.* (1976) descreveu que a hidrólise completa de manano com endo- β -mananase resultaria em manobiose e manotriose somente, sendo a produção de manobiose maior do que a de manotriose, portanto, a determinação da razão manobiose/manotriose (M_2/M_3) e a sua comparação sob diferentes condições de hidrólise evidencia a taxa de conversão do

polissacarídeo e de oligossacarídeos grandes (F1, F2 e F3) aos produtos máximos manobiose e manotriose.

Já a determinação e comparação da razão: manotriose/tetrassacarídeos (pico C) (M_3/C), sob diferentes condições de hidrólise permite a identificação da mudança da proporção entre os picos, possibilitando a inferência na estrutura do oligossacarídeo original (antes da ação da α -galactosidase) e após a ação da α -galactosidase, bem como a inferência na realocação nos picos de oligossacarídeos F1.

A tabela 3 reúne as razões M_2/M_3 e M_3/C dos perfis cromatográficos das hidrólises do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 0,005U, 0,05U e 1U (*Experimento I*) e dos perfis cromatográficos das hidrólises com α -galactosidase semipurificada dos oligossacarídeos produto das hidrólises do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 0,005U, 0,05U e 1U (*Experimento II*).

Tabela 3: Comparação das razões Manobiose (M_2)/Trissacarídeo (M_3 e/ou G^1M_2) (M_2/M_3) e Trissacarídeo (M_3 e/ou G^1M_2)/Tetrassacarídeo (M_4 e/ou G^1M_3) (M_3/C) dos *Experimentos I e II*.

Razão	Experimento I			Experimento II		
	0,005U	0,05U	1U	0,005U	0,05U	1U
M_2/M_3	1,05	1,22	3,35	1,11	1,34	3,36
M_3/C	0,74	1,53	0,39	1,01	1,91	0,48

De forma geral, todas as razões analisadas sofreram um aumento quando houve a adição da α -galactosidase semipurificada, permitindo a sugestão de realocação dos picos F1 B e C nos picos A e B.

A razão M_2/M_3 após ação da α -galactosidase aumenta independentemente da concentração de endo- β -mananase utilizada previamente, evidenciando que a retirada das galactoses proporciona um aumento na digestibilidade do polissacarídeo, pelo aumento na taxa de conversão de oligossacarídeos F1, F2 e F3 e polissacarídeo aos produtos máximos de hidrólise: manobiose e manotriose.

Pela análise dos resultados da hidrólise dos oligossacarídeos do *Experimento I* com α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®)

o modo de ação das α -galactosidases não difere, sendo o resultado muito semelhante ao descrito para α -galactosidase semipurificada, portanto, a figura 47 expõe os resultados das digestões com α -galactosidase comercial se encontra no Anexo.

4.1.3. Experimento III

As hidrólises enzimáticas conduzidas no Experimento III visaram compreender a importância das ramificações de galactose no processo de degradação do galactomanano, através da comparação das hidrólises do polissacarídeo galactomanano a 1% com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 1U somente (*Experimento I*) e do polissacarídeo galactomanano a 1% com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 1U conjuntamente a α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. ou a α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]).

Dessa forma, a comparação da diversidade e da concentração dos oligossacarídeos formados nas hidrólises contendo ou não a α -galactosidase pode sugerir que a ramificação com galactose de alguma forma modula a degradação do galactomanano.

A comparação das hidrólises do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 1U na presença ou ausência da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. está apresentada na Figura 32. Quando o polissacarídeo galactomanano nativo foi tratado somente com α -galactosidase semipurificada, uma pequena quantidade de galactose foi retirada e praticamente não houve detecção de oligossacarídeo (Figura 32 III), os oligossacarídeos C e G são os mesmos que aparecem no controle sem qualquer enzima (Figura 32 IV).

Quando o polissacarídeo de galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 1% foi hidrolisado somente pela endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) houve a produção de oligossacarídeos F1, F2 e F3, sendo a razão F1/F2=5,26 (Figura 32 I). Além disso, a proporção de oligossacarídeos F1 formados é praticamente a mesma de oligossacarídeos F2 e F3, mostrando que a enzima não está sendo capaz de hidrolisar completamente o polissacarídeo a F1, ainda mantendo intermediários F2 e F3.

Entretanto, a ação prolongada da combinação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) com a α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre o galactomanano a 1% também gerou oligossacarídeos F1, F2 e F3, porém, a proporção de oligossacarídeos F1 é muito maior do que os oligossacarídeos F2 e F3, razão F1/F2= 11,81 (Figura 32 III), evidenciando que a presença da α -galactosidase efetivamente melhorou a hidrólise do polissacarídeo e oligossacarídeos F2 e F3 a oligossacarídeos F1.

O *Experimento III* conduzido seguindo a mesma metodologia, porém com a α -galactosidase comercial (Megazyme®) substituindo a α -galactosidase semipurificada, apresentou os mesmos resultados, estando os cromatogramas apresentados na figura 48 no Anexo.

Figura 32: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 1U com acréscimo ou não da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (I) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase a 1U; (II) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 1U/mL e α -galactosidase de semipurificada *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL; (III) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com α -galactosidase semipurificada *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL; (IV) Controle (galactomanano sem enzima). (Gal) Galactose; (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

4.1.4. Experimento IV

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento IV* visaram compreender o modo de ação da enzima endo- β -mananase (Megazyme®) em diferentes concentrações (0,005U/mL e 1U/mL) quando na presença da α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e a α -galactosidase comercial (Megazyme®), ambas na máxima concentração de 0,5U/mL e galactomanano nas concentrações de 1% e 0,1%.

Dessa forma, a comparação dos oligossacarídeos formados nas diferentes concentrações da endo- β -mananase, na mesma concentração da α -galactosidase (0,5U/mL) e em concentrações distintas do galactomanano (1% ou 0,1%) pode evidenciar preferência em alguns sítios de clivagem na cadeia de principal de manano.

Os perfis cromatográficos dos oligossacarídeos produtos das hidrólises do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,1% e 1%, com endo- β -mananase a 0,005U e 1U e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL se encontram na figura 33.

Independente da concentração do substrato e da enzima endo- β -mananase a diversidade de oligossacarídeos produzida é mesma visto pela presença dos picos A a I em todos os cromatogramas (Figura 33 I a IV).

No entanto, o aumento da concentração da enzima endo- β -mananase, de 0,005U para 1U, ou a diminuição na concentração do substrato, de 1% para 0,1%, melhorou a eficiência da digestão, sendo o aumento da concentração da enzima mais eficiente, devido a maior formação de oligossacarídeos F1, F2 e F3 (Figura 33 III e IV).

A proporção dos oligossacarídeos F1 formados após hidrólise com endo- β -mananase na menor concentração (0,005U) não reflete a proporção de oligossacarídeos no polímero, devido a poucos fragmentos galactosilados (C-I) aparecerem, sugerindo que os oligossacarídeos galactosilados são mais dificilmente formados (Figura 33 I e II).

O mesmo foi visto para as hidrólises com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®), dados apresentados na figura 49 presente no Anexo deste documento.

Figura 33: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers

com endo- β -mananase (Megazyme[®]) a 0,005U e 1U e α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a 0,5U/mL. (I) Galactomanano a 1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (II) Galactomanano a 0,1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (III) Galactomanano a 1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL; (IV) Galactomanano a 0,1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada a 0,5U/mL. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

4.1.5. Experimento V

As hidrólises enzimáticas conduzidas no *Experimento V* visaram produzir oligossacarídeos de manano puro (sem ramificações com galactose) variando de monossacarídeo (manose) a decassacarídeos (oligossacarídeo de 10 manoses) de manose para identificar, nas análises de HPAEC-PAD, os oligossacarídeos ramificados e não ramificados, possibilitando a determinação da composição de cada oligossacarídeo.

Os produtos das hidrólises enzimáticas do manano comercial (Megazyme[®]) a 1% com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) (0,005U, 0,05U e 1U) após ação da α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) e a co-injeção de manose e galactose se encontram na figura 34.

Ao analisar os oligossacarídeos formados nas três concentrações de enzima (0,005U, 0,05U e 1U) nota-se uma tendência na diminuição da diversidade de oligossacarídeos formados, mesmo após a hidrólise com α -galactosidase em um primeiro ciclo de digestão. Nas concentrações de 0,005U e 0,05U de endo- β -mananase utilizadas é possível identificar os oligossacarídeos identificados de A, B, C, D, E e F, picos F1, sem a detecção de qualquer pico F2 e/ou F3. Na concentração de 1U de endo- β -mananase somente os picos A e B são detectados, sem qualquer detecção de oligossacarídeos F2 e/ou F3 (Figura 34 I, II e III).

Os oligossacarídeos comuns às três concentrações de endo- β -mananase, *A* e *B*, possuem proporções distintas entre os oligossacarídeos formados podendo ser devido a diferença na concentração da enzima e não a preferência na produção de cada oligossacarídeo em cada concentração (Figura 34 I, II e III), visto que a concentração de 1U gerou, preponderantemente, manobiose (*A*) e manotriose (*B*).

Nas menores concentrações de endo- β -mananase (0,005U e 0,05U) já existe a preferência pela formação da manobiose (pico *A*) e, principalmente na concentração de 0,05U, a proporção dos picos *B*, *C*, *D* e *E*, em relação ao pico *A*, é maior do que a encontrada no perfil cromatográfico da concentração de 1U de endo- β -mananase (Figura 34 I, II e III).

O perfil cromatográfico da hidrólise enzimática do manano com endo- β -mananase a 1U (Figura 34 III) mostra a clivagem completa do manano a manobiose e manotriose (picos *A* e *B*) com pouquíssima quantidade dos demais oligossacarídeos (*D*, *E* e *F*) evidenciando ação da α -galactosidase na retirada das galactoses restantes.

Na comparação dos perfis cromatográficos dos oligossacarídeos formados após hidrólise com 0,05U e 1U de endo- β -mananase nota-se que os oligossacarídeos identificados como *D*, *E* e *F* estão em concentração razoável em 0,05U (em relação aos demais picos), mas a 1U eles praticamente desaparecem, mostrando que são oligossacarídeos de manose tamanhos diversos não galactosilados.

Os perfis cromatográficos das co-injeções com os padrões de manose e galactose (figura 34 IV, V) mostra o tempo de retenção de 4,450 para a manose e 4,675 para a galactose.

Figura 34: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do manano comercial (Megazyme®) com endo-β-mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U e α-galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* comercial (Megazyme®) a 0,5U/mL. (I) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 0,005U de endo-β-mananase; (II) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 0,05U de endo-β-mananase; (III) perfil de oligossacarídeos formados na concentração de 1U de endo-β-mananase; (IV) injeção com padrão de manose; (V) injeção com padrão de galactose. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3); (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$). Os oligossacarídeos identificados A-F são denominados oligossacarídeos F1.

4.2. Análise da estrutura fina do (Galacto)manano de 6 espécies com diferentes proporções de ramificações com galactose

Visando determinar se as substituições de galactose interferem na atuação da endoenzima endo- β -mannanase, dificultando a ação de hidrolisar o polissacarídeo a oligossacarídeo, realizou-se o experimento que comparou os oligossacarídeos, produto da hidrólise com endo- β -mannanase, de (galacto)mananos de 6 espécies vegetais (*Sesbania virgata*, *Senna alata*, *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*, que sabidamente possuem proporções de substituição por galactose diferentes, ou seja, razão manose:galactose variando de 1:1 a 150:1). O método de análise dos oligossacarídeos formados foi realizado através de HPAEC-PAD e TLC.

A razão manose:galactose das 6 espécies estudadas, apresentada na Tabela 4, foi determinada pela análise em HPAEC-PAD dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida com ácido sulfúrico do polissacarídeo, (galacto)manano, de cada espécie.

Pela Tabela 4 fica evidente a diferença na proporção manose:galactose das espécies estudadas, enquanto *Euterpe edulis* e *Coffea arabica* possuem razão manose:galactose 150:1 e 40:1, respectivamente, sendo denominados mananos; *Dimorphandra mollis* e *Senna Alata* possuem razão 2:1 e *Cyamopsis tetragonoloba* e *Sesbania virgata* possuem razão 1:1, e são denominados de galactomananos.

Após identificação da razão manose:galactose dos (galacto)mananos das 6 espécies estudadas, realizou-se a hidrólise enzimática dos mesmos polissacarídeos com endo- β -mannanase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) e o perfil de oligossacarídeos produzidos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (TLC) (Figura 35) e por HPAEC-PAD utilizando coluna PA-100 (Figura 36).

Tabela 4. Razão manose:galactose das 6 espécies estudadas determinada pela análise de monossacarídeos em HPAEC-PAD (Dionex). Apresentado por ordem crescente na quantidade de substituições de galactose: Manano (*Euterpe edulis*; *Coffea arabica*); Galactomanano de proporção 2:1, ou seja, a cada 2 manose existe a ramificação por 1 galactose (*Dimorphandra mollis*; *Senna alata*); Galactomanano de proporção 1:1, ou seja, teoricamente todo o polissacarídeo é substituído por galactose (*Cyamopsis tetragonoloba*; *Sesbania virgata*) .

Espécies	Razão Manose:Galactose
<i>Euterpe edulis</i>	150,51 (150:1)
<i>Coffea arabica</i>	40,2 (40:1)
<i>Dimorphandra mollis</i>	1,82 (2:1)
<i>Senna alata</i>	1,77 (2:1)
<i>Sesbania virgata</i>	1,53 (1:1)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	1,17 (1:1)

O perfil dos oligossacarídeos revelados em TLC encontra-se na Figura 35, onde o conjunto de oligossacarídeos foi aplicado de acordo com a razão manose:galactose da espécie. Dessa forma, em *A* estão os oligossacarídeos de *Euterpe edulis* (150:1); em *B* os de *Coffea arabica* (40:1); em *C* os de *Dimorphandra mollis* (2:1); em *D* os de *Senna alata* (2:1); em *E* os de *Sesbania virgata* (1:1); e em *F* os de *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1).

Em uma comparação inicial dos oligossacarídeos das 6 espécies nota-se que (galacto)mananos com diferentes proporções exibem perfis de oligossacarídeos diversos.

Quando se compara o perfil de oligossacarídeos dos galactomananos (Figura 35 C-F) observa-se de forma imediata diferenças nas intensidades das bandas, enquanto em C e D as bandas são fortes em sua totalidade, em E e F somente as bandas superiores (oligossacarídeos F1) apresentam intensidade, ainda muito mais fraca do que as das primeiras, e as bandas inferiores (oligossacarídeos F2 e F3) estão presentes mas em baixíssima concentração.

Além disso, nota-se que *Cyamopsis tetragonoloba* (F) possui dois oligossacarídeos F1 exclusivos (Figura 35 F, →1, 2) e conjuntamente com *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. possuem um oligossacarídeo F2/F3 exclusivo de ambas as espécies (Figura 34, →3).

Quando se comparam as espécies com reserva de manano (Figura 35 A e B), observam-se três oligossacarídeos exclusivos da espécie A (Figura 35 A, $\rightarrow 1, 2, 3$), razão manose:galactose 150:1, e um oligossacarídeo exclusivo da espécie B (Figura 35 B, $\rightarrow 4$), razão 40:1.

Na comparação entre as espécies com reserva de manano e as com reserva de galactomanano, observa-se três oligossacarídeos exclusivos das espécies com reserva de manano, oligossacarídeos identificados por $* \rightarrow$, no entanto, nota-se uma ausência dos oligossacarídeos de maior peso (F2/F3) nas espécies com reserva de manano (Figura 35, chave vermelha) e presentes em todas as espécies com reserva de galactomanano, apesar das diferenças nas concentrações.

Figura 35. Análise por *Thin Layer Chromatography* (TLC) dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise enzimática exaustiva com endo- β -mannanase (Megazyme®) das 6 espécies estudadas. (A) *Euterpe edulis* (150:1); (B) *Coffea arabica* (40:1); (C) *Dimorphandra mollis* (2:1); (D) *Senna alata* (2:1); (E) *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (1:1); (F) *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1). (→) Oligossacarídeos exclusivo de 1 ou mais espécies: (→1, 2) exclusivo de *Cyamopsis tetragonoloba*; (→3) exclusivo de *Sesbania virgata* e *Cyamopsis tetragonoloba*; (→) Comparação dos oligossacarídeos formados entre as espécies (A e B) com reserva de manano: (→1, 2, 3) exclusivo de *Euterpe edulis*; (→4) exclusivo de *Coffea arabica*. (*→) Oligossacarídeos exclusivos das espécies com reserva de manano. (Chave vermelha) Oligossacarídeos e suas combinações em pares (F2) e em trios (F3) exclusivos de espécies com reserva de galactomanano.

Os perfis cromatográficos da análise por HPAEC-PAD dos oligossacarídeos provenientes da hidrólise com endo- β -mannanase dos polissacarídeos das 6 espécies encontram-se agrupados na Figura 36.

Da mesma maneira como no TLC (Figura 35), os perfis cromatográficos estão identificados de forma crescente quanto à substituição por galactose, assim: A perfil dos oligossacarídeos de *Euterpe edulis* (150:1); em B perfil dos oligossacarídeos de *Coffea arabica* (40:1); em C perfil dos oligossacarídeos de *Dimorphandra mollis* (2:1); em D perfil dos oligossacarídeos de *Senna alata* (2:1); em E perfil dos oligossacarídeos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (1:1); e em F perfil dos oligossacarídeos de *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1).

As letras de *a-m* identificam cada oligossacarídeo, onde: (*a*) manose; (*b*) galactose; (*c*) manobiose; (*d*) manotriose; (*f-h, j-m*) oligossacarídeos ainda não identificados; (*i*) combinações aos pares e aos trios dos oligossacarídeos identificados *c-h, j-m*. Os oligossacarídeos identificados como *a-h* e *j-m* são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos identificados por *i* são denominados F2 quando combinação aos pares e F3 quando combinação aos trios de F1 (Figura 36).

Os picos identificados pela mesma letra (*a-m*) correspondem ao mesmo oligossacarídeo, por apresentarem o mesmo tempo de retenção na coluna.

Ao analisar os perfis cromatográficos de forma crescente, quanto às substituições por galactose, nota-se gradualmente o aparecimento dos oligossacarídeos F2 e F3, enquanto A (150:1) não apresenta qualquer pico denominado *h* e/ou *i*, a partir de B (40:1) estes picos estão presentes. Ainda quanto aos picos *h* e *i*, observa-se que os perfis C e D apresentam a maior concentração destes.

Além disso, observa-se que os perfis cromatográficos E e F possuem, comparativamente aos demais, baixa detecção (concentração) de todos os oligossacarídeos.

Os oligossacarídeos identificados por: *a, c, d, f, g, h, i*, são comuns a todos os perfis cromatográficos, com exceção do perfil A que não possui o oligossacarídeo identificado por *g*, no entanto apresenta um oligossacarídeo exclusivo a ele, identificado por *l*, e um segundo oligossacarídeo, identificado por *k*, presente nos perfis A, B, D e E.

O oligossacarídeo *b* parece ser exclusivo nos perfis cromatográficos B e F, o oligossacarídeo *j*, apesar de baixa detecção, é exclusivo do perfil cromatográfico de C e, por fim, o oligossacarídeo *e*, se apresenta em uma quantidade razoável no perfil F, sendo exclusivo desta espécie.

Figura 36. Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática exaustiva com endo- β -mannanase (Megazyme[®]), das 6 espécies estudadas. (A) *Euterpe edulis* (150:1); (B) *Coffea arabica* (40:1); (C) *Dimorphandra mollis* (2:1); (D) *Senna alata* (2:1); (E) *Sesbania virgata* (1:1); (F) *Cyamopsis tetragonoloba* (1:1). (a) manose; (b) galactose; (c) manobiose; (d) manotriose; (f-h, j-m) oligossacarídeos ainda não-identificados; (i) combinações aos pares e aos trios dos oligossacarídeos identificados (c-h, j-m). Os oligossacarídeos identificados a-h e j-m são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos identificados por i são denominados F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

Os oligossacarídeos formados não diferem dos oligossacarídeos identificados nos *Experimentos I a V*, porém a análise conduzida em HPAEC-PAD, embora tenha seguido a mesma metodologia, este experimento foi o primeiro a ser conduzido e na época a coluna PA-100 utilizada já estava muito antiga, prejudicando a separação dos oligossacarídeos. Dessa forma, consegue-se identificar a manobiose e a manotriose, mas os demais picos possuem muitos oligossacarídeos co-eluídos e não seguem a mesma identificação dos *Experimentos I a V*.

V. Discussão

5.1. Análise da estrutura fina do galactomanano de Sesbania virgata (Cav.) Pers. através de hidrólises enzimáticas com Endo- β -manase de Aspergillus niger (Megazyme®), α -Galactosidase de Cyamopsis tetragonoloba (Megazyme®) e α -galactosidase semipurificada de Sesbania virgata (Cav.) Pers.

Diversas técnicas já foram empregadas em estudos de distribuição de resíduos de D-galactose ao longo da cadeia principal de D-manano de galactomananos de reserva de sementes de leguminosas (McCleary et al., 1985).

Os estudos sobre a estrutura fina de galactomananos e glucomananos conduzidos por McCleary foram realizados utilizando como técnicas: a hidrólise do polissacarídeo com endo- β -mananase de *Aspergillus niger*, já bem caracterizada no seu modo de ação (McCleary & Matheson, 1983), isolamento e identificação da composição de cada oligossacarídeo por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e/ou Raio-X (McCleary et al., 1976; McCleary et al., 1983; McCleary & Matheson, 1983).

A compreensão no modo de ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger* foi realizada pela identificação dos oligossacarídeos formados após a sua ação sobre galactomanano de goma caroba razão manose:galactose 4:1, em comparação com os oligossacarídeos formados após ação de endo- β -

mananases de bactéria (*Bacillus subtilis*), fungo (*Irpex lacteus*), animais (*Helix pomatia*) e plantas (*Cyamopsis tetragonoloba* e *Medicago sativa*) sobre o mesmo substrato (McCleary & Matheson, 1983).

De forma geral, McCleary & Matheson (1983), determinaram que endo- β -mananases de fontes variadas possuem capacidades hidrolíticas diferentes, requerendo um maior número de resíduos de manose sem ramificação para conseguirem hidrolisar o polissacarídeo. A endo- β -mananase de *Aspergillus niger* é a enzima menos específica no seu modo de ação, necessitando de no mínimo de um oligossacarídeo de 3 resíduos de manose galactosilados ou não para ainda conseguir identificar um sítio de clivagem, e com a maior capacidade de clivar o polissacarídeo altamente galactosilado, pois possui maior tolerância às ramificações com galactose.

Dessa forma, endo- β -mananases de fontes variadas diferem entre si na capacidade de hidrolisar um mesmo polissacarídeo, no entanto, os oligossacarídeos formados após a ação enzimática são os mesmos e estão descritos na Tabela 5.

Analisando esta tabela, percebe-se que alguns oligossacarídeos são inexistentes quando da ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger*, pois esta enzima consegue clivar estes oligossacarídeos a fragmentos ainda menores, exatamente pela sua maior tolerância às ramificações com galactose.

Independentemente da endo- β -mananase utilizada, McCleary & Matheson (1983), demonstraram que quanto menor for a razão manose:galactose de um polissacarídeo, ou seja, quanto mais ramificado for um polissacarídeo, menor será a porcentagem de hidrólise deste dado polissacarídeo pela endo- β -mananase.

Tiné *et al.* (2003) sugeriram, também através de hidrólises enzimáticas do polissacarídeo xiloglucano e identificação dos oligossacarídeos formados, que a estrutura do xiloglucano de reserva de sementes conteria, pelo menos, parte da informação requerida para o seu próprio metabolismo, o que posteriormente chamou-se de código do xiloglucano (Buckeridge, 2010).

A sugestão da presença de um código presente no polissacarídeo contendo informações que afeta a sua hidrólise foi realizada através da visualização de diminuição dos oligossacarídeos F2 e F3 formados na presença da β -galactosidase, que os oligossacarídeos menos ramificados eram

formados preferencialmente pela enzima e que polímeros de estrutura fina diferente possuíam porcentagem de hidrólise diferente na presença da mesma enzima.

Assim, sugere-se, através dos resultados obtidos nesta dissertação, que a estrutura do polissacarídeo galactomanano também contenha, pelo menos, parte da informação requerida para seu próprio metabolismo, código para a sua degradação, estando esta informação contida na distribuição das ramificações com resíduos de D-galactose.

Da mesma forma que o determinado por Tiné et al. (2003), nota-se que a hidrólise do galactomanano pela endo- β -mananase de *Aspergillus niger* (Figura 28) forma oligossacarídeos F1 (base do galactomanano), bem como, oligossacarídeos F2 e F3, evidenciando equilíbrio de reação e impedimento da hidrólise total do polissacarídeo.

Apesar de não ter sido analisada a composição dos oligossacarídeos F2 e F3, os resultados apresentados no Experimento III (Figura 32), permitem a sugestão que estes grupos de oligossacarídeos são mais galactosilados, pois na presença da α -galactosidase conjuntamente com a endo- β -mananase existe a diminuição na formação de F2 e F3 e aumento na formação de F1, sugerindo que a ramificação com galactose parece ser a responsável pelo impedimento da hidrólise.

A análise dos resultados do Experimento I (Figura 29) evidenciou a preferência na formação de oligossacarídeos dependente da concentração utilizada de endo- β -mananase. Em concentrações baixas de enzima (0,005U e 0,05U) a manotriose (M_3) e/ou o trissacarídeo (G^1M_2) (pico B) são preferencialmente produzidos, enquanto na concentração de 1U os oligossacarídeos pares manobiose (M_2) (pico A) e o tetrassacarídeo (G^1M_3) são preferencialmente produzidos, sugerindo que a enzima, quando em baixa concentração, prefere locais com menor quantidade de ramificações, evidenciando que a digestão do polissacarídeo não é ao acaso.

Tabela 5: Oligossacarídeos produzidos na hidrólise do galactomanano de goma caroba, razão manose:galactose 4:1 pelas endo-β-mananase de *Aspergillus niger* e de sementes de *Medicago sativa* (alfafa). O final redutor da molécula está sempre a esquerda, manose denominada de 1. (#) O subscrito indica a quantidade de resíduos de manose o oligossacarídeo possui em sua cadeia principal, enquanto o sobrescrito indica a posição da substituição da galactose na cadeia relativa ao final redutor da molécula; (*) As estruturas dos oligossacarídeos >7 resíduos produzidos pela hidrólise da endo-β-mananase de *M.sativa* não foram caracterizadas. Estes oligossacarídeos representam 26,9% do total de oligossacarídeos produzidos. (-) Oligossacarídeos não produzidos pela hidrólise da endo-β-mananase de *Aspergillus niger* por esta ser mais inespecífica em sua ação, conseguindo “triblar” a presença de ramificação com galactose diminuindo o tamanho do oligossacarídeo. Tabela retirada e adaptada de McCleary *et al.* (1983)

Oligossacarídeos			Quantidade (%)	
Nº resíduos	Composição	Estrutura	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Medicago sativa</i>
1	Man	M	1,8	traço
2	Man ₂	M-M	23,9	13,3
3	Man ₃	M-M-M	20,2	19,3
3	Gal ¹ Man ₂ [#]	$\begin{array}{c} \text{G} \\ \downarrow \\ \text{M-M} \end{array}$	15,9	1,0
4	Gal ¹ Man ₃	$\begin{array}{c} \text{G} \\ \downarrow \\ \text{M-M-M} \end{array}$	7,4	4,2
4	Man ₄	M-M-M-M	-	8,0
5	Gal ³ Man ₄	$\begin{array}{c} \text{G} \\ \downarrow \\ \text{M-M-M-M} \end{array}$	-	9,0
5	Gal ¹ Man ₄	$\begin{array}{c} \text{G} \\ \downarrow \\ \text{M-M-M-M} \end{array}$	-	2,0
6	Gal ^{1,3} Man ₄	$\begin{array}{cc} \text{G} & \text{G} \\ \downarrow & \downarrow \\ \text{M-M-M-M} \end{array}$	-	0,4

6	Gal ⁴ Man ₅		-	3,3
6	Gal ³ Man ₅		-	3,3
7	Gal ^{3,4} Man ₅		11,1	9,2
8	Gal ^{1,3,4} Man ₅		0,6	26,9*
8	Gal ^{4,5} Man ₆		1,2	26,9*
8	Gal ^{3,4} Man ₆		4,2	26,9*
9	Gal ^{3,4,5} Man ₆		2,5	26,9*
9	Gal ^{1,4,5} Man ₆		2,3	26,9*

9	Gal ^{1,3,4} Man ₆		0,5	26,9*
9	Gal ^{4,5} Man ₇		0,7	26,9*
>9	-		7,7	26,9*

A razão F1/F2 do *Experimento I* (Tabela 2) corrobora a hipótese de que existe uma preferência por sítios menos galactosilados, pois na concentração de enzima a 1U, percebe-se uma diminuição na preferência dos sítios de clivagem, reduzindo o polissacarídeo a oligossacarídeos F2 e F3, mas principalmente F1, visto que a razão F1/F2_(1U) é a maior das 3 concentrações. Na menor concentração de enzima, 0,005U, aparentemente há muita dificuldade no processamento do polissacarídeo, sendo assim, a enzima ataca sítios de clivagem de preferência, produzindo preferencialmente F1, uma vez que a produção de oligossacarídeos F2 e F3 requer que as enzimas lidem com as ramificações por galactose.

Contudo, na concentração de 0,05U de enzima, parece pela menor razão F1/F2 apresentada, que a enzima prefere hidrolisar o polissacarídeo a F2 e F3, do que reprocessar F2 e F3 a F1 pela presença das ramificações com galactose presentes nestes oligossacarídeos, permitindo a sugestão que as ramificações parecem dificultar a digestão pela endo-β-mananase, que não age ao acaso, preferindo sítios menos galactosilados. Estes resultados permitem concluir que as ramificações com galactose modulam a ação da endo-β-mananase, possivelmente em moldes parecidos com os observados por Tiné et al. (2003) para xiloglucanos.

Na comparação do *Experimento I* com o *Experimento II* era esperado encontrar no perfil cromatográfico do *Experimento II* uma mudança no padrão de oligossacarídeos presentes no *Experimento I*, pois inicialmente entendia-se que os oligossacarídeos ramificados não eram co-eluídos com os

oligossacarídeos não-ramificados (somente a cadeia principal de manano), sendo assim, após o uso da α -galactosidase, os oligossacarídeos ramificados seriam desramificados e realocados no pico referente ao oligossacarídeo de manose, com o desaparecimento dos picos galactosilados.

Assim, o objetivo do *Experimento II* era observar os picos que sumiriam para identificar os oligossacarídeos ramificados e com o aumento dos demais picos (representantes dos oligossacarídeos de manose) inferir sobre a composição.

Entretanto, a análise comparativa do *Experimento I* e do *Experimento II* não evidenciou o desaparecimento de picos, com exceção do pico *I*, mas a mudança na proporção dos picos (Figura 31 VII,VIII,IX) sugerindo que haja co-eluição de oligossacarídeos com o mesmo número de resíduos, ou seja, oligossacarídeos contendo somente manose, por exemplo manotetraose (M_4) são co-eluídos com oligossacarídeos ramificados com galactose, seguindo o exemplo anterior, tetrassacarídeo (G^1M_3).

Assim, a co-eluição impossibilitou a identificação dos picos referentes a oligossacarídeos ramificados, dificultando a identificação da composição de cada oligossacarídeo formado após ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger*. Sendo assim, foi necessária a utilização da descrição feita por McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5) dos oligossacarídeos formados após ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger* juntamente com os resultados dos *Experimento I* e *Experimento V* (Figuras 29 e 34) para inferir sobre a estrutura dos oligossacarídeos, explicação abrangida posteriormente nesta discussão.

Embora a co-eluição tenha dificultado a identificação dos oligossacarídeos, é inegável que a presença da α -galactosidase mudou a proporção entre os oligossacarídeos. A razão F1/F2 de todas as concentrações de endo- β -mananase (hidrólise anterior a ação da α -galactosidase) do *Experimento II* é maior do que as razões encontradas no *Experimento I*, evidenciando que a retirada da galactose propicia uma maior redução do polissacarídeo a oligossacarídeos F1 (Tabela 2).

Aliado a isso, o aumento da razão F1/F2 encontrado no *Experimento II* foi devido ao aumento na quantidade de oligossacarídeos F1 (comparação da somatória das áreas dos picos F1 e F2-F3 de ambos os experimentos, dados não mostrados), portanto, permite a sugestão que entre os oligossacarídeos F2

e F3 existem oligossacarídeos de cadeia de manose com tamanho de oligossacarídeo F1 altamente ramificados, novamente sugerindo que a ação da endo- β -mananase não é ao acaso, preferindo sítios de clivagem com baixa porcentagem de ramificação.

A comparação das razões (M_2/M_3 e M_3/C) entre os *Experimentos I e II* (Tabela 3) juntamente com os oligossacarídeos identificados no trabalho de McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5) possibilitaram a inferência na composição original dos oligossacarídeos e após a ação da α -galactosidase, pois como a ação da endo- β -mananase foi anterior a da α -galactosidase e não concomitante, a mudança de proporção entre os oligossacarídeos só é devido a realocação dos oligossacarídeos desramificados.

Para a explicação da mudança das proporções dos picos utilizou-se a descrição dos oligossacarídeos formados após ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger* feita por McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5).

Para a razão M_2/M_3 ter sido alterada (aumentou a quantidade de M_2) só pode ter havido a desramificação do trissacarídeo G^1M_2 , portanto, no pico B existe a manotriose e o oligossacarídeo ramificado G^1M_2 .

Para a razão M_3/C ter sido alterada (aumentou a quantidade de M_3) só pode ter havido a desramificação do tetrassacarídeo (G^1M_3), portanto no pico C também há co-eluição de oligossacarídeos: manotetraose (M_4) e terassacarídeo G^1M_3 .

A determinação da composição dos demais picos seguindo as diferenças nas proporções, como realizado para os picos A, B e C, se torna muito difícil, tendo em vista, que a desramificação de oligossacarídeos F1 maiores e dos oligossacarídeos F2 e F3 interferem na proporção dos oligossacarídeos F1 menores impossibilitando a inferência na presença do oligossacarídeo, às vezes ocultando ou diminuindo uma diferença na proporção pela presença da co-eluição. Visando elucidação, toma-se como exemplo o pico F, um heptassacarídeo, que não apresentou diferença na proporção entre o *Experimento I* e *Experimento II* (Figura 31 VII, VIII, IX).

Sendo um heptassacarídeo (ver explicação mais abaixo), pode ser tanto manoheptose (M_7) proveniente da desramificação do nonassacarídeo ($G^{4,5}M_7$) quanto um heptassacarídeo ramificado ($G^{3,4}M_5$). Apesar de haver uma pequena diferença no pico D, pentassacarídeo, o pico F, heptassacarídeo, não

apresentou mudança na proporção, pois possivelmente recebeu por realocação manohexose, portanto, não é possível estabelecer quem foi o pico do *Experimento I* que foi realocado para outro pico no *Experimento II*.

De forma geral, o *Experimento II* colaborou na identificação de alguns picos e, principalmente, demonstrou que a enzima endo- β -mananase não atua ao acaso preferindo sítios menos galactosilados, sugerindo novamente que as ramificações com galactose modulam a sua ação.

Esta modulação pelos resíduos de galactose é também corroborada pelo fato de que a hidrólise do manano (Megazyme[®]) independentemente da concentração de enzima endo- β -mananase utilizada (0,005U, 0,05U e 1U), *Experimento I*, não apresentou a geração de oligossacarídeos F2 e F3, sendo completamente digerido a F1 (Figura 30).

O manano comercial (Megazyme[®]) é proveniente de tratamento enzimático com α -galactosidase e químico com hidróxido de sódio do galactomanano de *Ceratonia siliqua* (goma caroba) com razão manose:galactose 4:1, possuindo após o tratamento 3% de galactose.

Aliado a isso, McCleary *et al.* (1976) afirmam que a digestão de um manano não ramificado produz exclusivamente manobiose e manotriose, o que foi corroborado neste trabalho.

Sendo assim, por haver mudança na proporção dos oligossacarídeos F1 formados dependente da concentração de endo- β -mananase e a presença de oligossacarídeos diferentes de manobiose e manotriose (picos A e B) na concentração de 1U (Figura 30), sugeriu-se que ainda houvesse ramificações com galactose restantes no manano comercial (Megazyme[®]).

Dessa forma, justificou-se a execução do *Experimento V*, com a hidrólise com a α -galactosidase, para garantir completa retirada das galactoses, anteriormente à hidrólise do polissacarídeo com a endo- β -mananase nas três concentrações (0,005U, 0,05U e 1U) (Figura 34).

Embora o objetivo do *Experimento I* não tenha sido atingido quanto à produção de oligossacarídeos de manano de monossacarídeos a heptassacarídeos, determinou-se que a baixa concentração de galactose (3%) não é eficiente no impedimento da hidrólise (formação de F2 e F3), sugerindo que deva existir uma quantidade de galactosilação mínima para haver

regulação no processo, possibilitando a explicação do porquê dos mananos sempre possuírem um mínimo de ramificações com galactose.

As hidrólises conduzidas no *Experimento V* foram eficientes na retirada das galactoses e, portanto, cumpriram com o objetivo da produção de oligossacarídeos de manano de monossacarídeos a heptassacarídeos. Isto ocorreu porque, na concentração de 1U de endo- β -mananase houve, preponderantemente, a produção dos oligossacarídeos manobiose (pico A) e manotriose (pico B) e nas concentrações de 0,005U e 0,05U os oligossacarídeos F1 diferentes de manobiose e manotriose são, provavelmente, oligossacarídeos de manose de tamanhos diversos não galactosilados, tendo em vista que estes picos desaparecem na concentração de 1U, pois se fossem galactosilados, continuariam a ser produzidos (Figura 34).

Dessa forma, a partir dos dados do *Experimento I X Experimento II* (Figura 31 VII, VIII, IX), dos dados de tempo de retenção dos oligossacarídeos desgalactosilados do *Experimento V* (Figura 34) e da identificação dos oligossacarídeos produtos da hidrólise de galactomanano com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* descritos por McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5), determinou-se as possíveis estruturas dos oligossacarídeos F1 das digestões do galactomanano nos *Experimentos I a V*.

A partir da análise dos oligossacarídeos formados no *Experimento V* com endo- β -mananase a 1U (Figura 34) determinou-se os tempos de retenção da manobiose e manotriose, 6,084 minutos e 7,300 minutos, respectivamente.

A metodologia de análise dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD é isocrática somente de 0 a 11 minutos, ou seja, a concentração dos eluentes é constante durante todo este período: 98% de NaOH 88mM e 2% de Acetato de Sódio 200mM em NaOH 88mM. A partir dos 12 minutos até os 20 minutos a concentração varia de 98% para 70% de NaOH 88mM e de 2% para 30% de Acetato de Sódio 200mM em NaOH 88mM. Dos 20 minutos a 25 minutos varia-se de 70% a 0% de NaOH 88mM e de 30% a 100% de Acetato de Sódio 200mM em NaOH 88mM. Dos 25 minutos aos 30 minutos o gradiente inicial é reestabelecido 98% e 2% e se mantém constante até o final da corrida para o reequilíbrio da coluna.

Dessa forma, criou-se a hipótese que até os 12 minutos de corrida a cada minuto sairia um oligossacarídeo com um resíduo de manose ou galactose a mais, assim, teoricamente aos 6 minutos um dissacarídeo (manobiose) seria detectado. Da mesma forma, aos 7 minutos um trissacarídeo (manotriose), aos 8 minutos um tetrassacarídeo, aos 9 minutos um pentassacarídeo, aos 10 minutos um hexassacarídeo, aos 11 minutos um heptassacarídeo. A partir dos 12 minutos a separação deixa de ser uniforme, pelo aumento na concentração de acetato de sódio, e os oligossacarídeos deixam de sair no tempo teórico e foram identificados pelas possibilidades descritas por McCleary *et al* (1983) (Tabela 5).

Utilizando os tempos de retenção da digestão do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. com endo- β -mananase a 1U (*Experimento I* – Figura 29) para identificar os oligossacarídeos de acordo com a hipótese formada acima, nota-se que os tempos de retenção apresentados pelos oligossacarídeos A – F (picos) são muito próximos do tempo teórico (Tabela 6), portanto, aceitou-se a hipótese.

Tendo em mãos o tamanho de cada oligossacarídeo em cada tempo de retenção, utilizou-se da identificação dos oligossacarídeos formados após hidrólise com endo- β -mananase de *Aspergillus niger* realizada por McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5) para identificar as possíveis estruturas dos oligossacarídeos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. para cada tempo de retenção (Tabela 6).

McCleary *et al.* (1983) descreveram 14 oligossacarídeos formados pela ação da endo- β -mananase de *Aspergillus niger*, porém no perfis cromatográficos só observa-se 9 picos de oligossacarídeos F1, portanto, novamente uma evidencia de co-eluição de oligossacarídeos com o mesmo número de resíduos manose e/ou galactose, assim, cada pico identificado pode representar mais de um oligossacarídeo.

Tabela 6: Identificação das possíveis estruturas dos oligossacarídeos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. componentes dos picos A-F de acordo com a comparação do tempo de retenção real e o tempo de retenção teórico e os oligossacarídeos caracterizados e identificados por McCleary *et al.* (1983) (Tabela 5).

Oligossacarídeo (Picos)	Tempo de retenção (Real) (minutos)	Tempo de retenção (Teórico) (minutos)	Estruturas
A	5,975	6,000	M-M
B	7,159	7,000	<div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M</div> <div>M-M</div> </div>
C	8,359	8,000	<div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M</div> <div>M-M-M</div> </div>
D	8,909	9,000	<div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M</div> <div>M-M-M-M</div> </div> <div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M-M</div> </div>
E	9,942	10,000	<div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M</div> </div> <div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M-M</div> </div> <div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M-M-M</div> </div>
F	11,200	11,000	<div> <div>G</div> <div>↓</div> <div>M-M-M-M-M</div> </div> <div> <div>G</div> <div>↑</div> <div>M-M-M-M-M-M-M</div> </div>

Vale lembrar que a manobiose e a manotriose foram identificadas através do *Experimento V* e a partir delas foi idealizada a hipótese sobre os tempos de retenção. Além disso, nas digestões do galactomanano, diferentemente do manano tratado, houve oligossacarídeos galactosilados, inclusive co-eluídos com a manotriose (ver *Experimento II*), ou seja, o pico B de todas as hidrólises de galactomanano pode ser uma mistura de manotriose com o oligossacarídeo de manobiose com ramificação de galactose na manose redutora (Gal^1Man_2).

A leitura das “abreviações” dos oligossacarídeos Gal^xMan_y deve ser feita da seguinte maneira: o **y** apresenta a quantidade de resíduos de manose na cadeia principal do oligossacarídeo, enquanto o **x** apresenta em qual manose, a partir da extremidade redutora (sempre a direita), a ramificação de galactose está ligada. Dessa forma, o valor de **y** sempre será único, enquanto os valores de **x** podem ser mais do que um, indicando uma ou múltiplas ramificações (Figura 37).

Figura 37: Explicação para a leitura das “abreviações” dos oligossacarídeos Gal^xMan_y . A cadeia principal de manose é numerada a partir da extremidade redutora (à direita). O número subscrito ligado à manose indica a quantidade de resíduos de manose que a cadeia principal do oligossacarídeo possui, enquanto o número sobrescrito ligado a galactose indica a posição do resíduo de galactose relativo ao resíduo de manose a partir da extremidade redutora (McCleary et al., 1983).

A análise comparativa da hidrólise do galactomanano exclusivamente com endo- β -mananase (*Experimento I*) e da hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase e α -galactosidase semipurificada concomitantemente (*Experimento III*) evidencia que os oligossacarídeos F2 e F3 são susceptíveis

ao ataque da endo- β -mananase (Figura 32), pois a presença da α -galactosidase no ensaio altera o equilíbrio da reação, produzindo mais oligossacarídeos F1 do que F2 e F3 (ver razões F1/F2 de ambas as digestões).

Dessa forma, evidencia-se que a menor taxa de hidrólise dos oligossacarídeos F2 e F3 nos ensaios somente com endo- β -mananase não advém de uma possível resistência intrínseca destes fragmentos, mas possivelmente das ramificações com galactose.

Portanto, nota-se uma importância das ramificações de galactose na modulação do ataque da endo- β -mananase ao substrato.

Lisboa *et al.* (2006) demonstraram que α -galactosidases são inibidas quando ocorre acúmulo de galactose livre. Aparentemente, o acúmulo de oligossacarídeos galactosilados também impede a hidrólise completa da endo- β -mananase (comparar hidrólise do manano (Experimento V) figura 34 e hidrólise do Experimento III Figura 32). Estes fatos realçam a importância na interação das exo-hidrolases (α -galactosidase e β -manosidase) com as endo-hidrolases (endo- β -mananase) que ocorrem nos processos biológicos como a degradação da reserva de sementes ou degradação da parede celular por fungos.

Alguns autores propõem que durante a degradação do galactomanano existe uma ordem na atuação das enzimas (Reid & Edwards, 1995; Lisboa *et al.*, 2006). Por outro lado, compreende-se que ambas as enzimas estejam presentes concomitantemente durante a maior parte do processo de degradação. Sendo assim, a α -galactosidase é capaz de alterar a afinidade da endo- β -mananase ao substrato (galactomanano) ao retirar algumas ramificações de galactose, dessa forma, modulando o processo de degradação. Deste modo, a ordem de ação das enzimas se torna mais importante quanto maior for o grau de ramificação do galactomanano.

A proporção dos oligossacarídeos F1 obtidos na digestão do galactomanano em baixa concentração de endo- β -mananase (0,005U) é muito diferente da proporção destes mesmos oligossacarídeos no polímero (comparar picos A, C e E na figura 33 I e III) (*Experimento IV*).

A mistura dos oligossacarídeos F1 na digestão com a menor concentração da enzima (0,005U) é rica em tetrassacarídeos (pico C) (Figura 33 I), muito embora não sendo os tetrassacarídeos os oligossacarídeos

presentes em maior quantidade na composição do polissacarídeo, pois na maior concentração de enzima os oligossacarídeos preponderantemente produzidos são a manobiose (A) e hexassacarídeos (E) (Figura 33 III) (ver tabela 6 para visualizar as estruturas de oligossacarídeos para cada pico).

Essa diferença na proporção sugere, novamente, que o ataque da enzima endo- β -mananase de *Aspergillus niger* ao polissacarídeo não é ao acaso e as regiões menos ramificadas são preferencialmente digeridas.

McCleary *et al.* (1985) afirmam que as α -galactosidases não apresentam diferenças no seu modo de ação dependente da estrutura do galactomanano, ou seja, a quantidade de ramificação com galactose não interfere na sua ação, sendo o seu modo de ação não randômico, apresentando uma tendência em remover as ramificações com galactose sequencialmente de um dos lados da cadeia de manano.

As α -galactosidases utilizadas nos experimentos, semipurificada e comercial, muito embora apresentem características (pH ótimo, temperatura ótima e aspectos cinéticos) diferentes, atuaram sobre o polissacarídeo ou oligossacarídeos da mesma forma, apresentando, portanto, o mesmo modo de ação, visto pela similaridade dos perfis de oligossacarídeos gerados independente do experimento proposto (*Experimento II, III e IV*).

Sugere-se que esta similaridade esteja relacionada à importância da mobilização de reservas no sucesso da plântula, portanto, todo o processo seria muito conservado.

Feurtado *et al.* (2001) demonstraram que a sequência de aminoácidos das α -galactosidases de plantas são bastante conservadas. Sendo assim, é também provável que todo o processo fisiológico da mobilização de reservas seja conservado, inclusive com uma modulação da degradação realizada pela estrutura do polissacarídeo (distribuição das ramificações de galactoses).

5.2. Análise da estrutura fina do (Galacto)manano de 6 espécies com diferentes proporções de ramificações com galactose

Os estudos de determinação da estrutura fina, normalmente, são realizados comparativamente, ou seja, identificando o padrão de ação da

enzima sobre polissacarídeos de razão manose:galactose diversa (Emi *et al.*, 1972; McCleary *et al.*, 1976; McCleary, 1983; McCleary *et al.*, 1985).

Sendo assim, adotou-se a mesma estratégia para determinação da estrutura fina do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a fim de compreender a ação regulatória das substituições por galactose na degradação do polissacarídeo durante a mobilização de reserva (Tin *et al.*, 2003).

A anlise dos oligossacardeos provenientes da hidrlise dos (galacto)mananos com razo manose:galactose variadas (de 150:1 a 1:1 – Tabela 4) demonstra, como em McCleary (1983), que a quantidade e a distribuio das ramificaes com D-galactose influenciam na hidrlise do polissacardeo com endo--mananase, pois tanto a revelao do perfil dos oligossacardeos por TLC quanto por HPAEC-PAD, revelam a presena de bandas nicas a determinadas razes de manose:galactose, ausncia de grupos de oligossacardeos (F2 e F3), quando a substituio por galactose baixa; e proporo diversa (altura dos picos) de oligossacardeos iguais (identificados pela mesma letra) (Figura 35 e 36).

A ausncia de oligossacardeos F2 e F3 (Figura 35 e 36) aps hidrlise com endo--mananase do manano puro (150:1) de *Euterpe edulis* evidencia que a baixssima substituio por galactose no permite o equilbrio da reao, havendo, portanto, somente a produo de oligossacardeos F1.

O aumento gradual da presena destes oligossacardeos, F2 e F3, com o aumento das substituies por D-galactose, mostra que o pequeno aumento das ramificaes por D-galactose suficiente para levar a reao a atingir o equilbrio, impedindo a hidrlise mesmo de stios disponveis para a ao de endo--mananase, assim, produzindo F1, F2 e F3.

A regulao da hidrlise, com o impedimento da hidrlise completa do galactomanano durante a degradao de reserva (*in vivo*), de extrema importncia para evitar que toda a energia contida na reserva e utilizada no crescimento e estabelecimento da plntula seja rapidamente liberada com a produo de monossacardeos, os quais ficariam disponveis para fitopatgenos, como os fungos (Tin *et al.*, 2003), os quais competiriam com a prpria planta para o uso da energia armazenada no polissacardeo de reserva.

Portanto, ambos os resultados apresentados corroboram a hiptese formulada acima, que a presena dos oligossacardeos F2 e F3 nas hidrlises

de galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. também esteja relacionada ao equilíbrio de reação da hidrólise, causada pelas substituições por galactose, como demonstrado por Tiné *et al.* (2003).

É possível visualizar, principalmente no perfil de oligossacarídeos revelados por HPAEC-PAD, que os galactomananos de maior substituição por D-galactose (Figura 36 E e F) apresentam proporções de F1 (picos de a-h e j-m) e de F2 e F3 (pico i), quando comparados com os galactomananos de razão 2:1 (Figura 36 C e D), relativamente menores, demonstrando que a enzima, pela alta quantidade e distribuição das ramificações, não tem acesso à cadeia principal, resultando na baixa taxa de hidrólise do polissacarídeo, como demonstrado por Reese & Shibata (1965); Courtois & Le Dizet (1968); Tsujisaka *et al.* (1972); Emi *et al.* (1972).

A presença de galactose, levando ao equilíbrio de reação, aparentemente, esconde os sítios disponíveis para a ação da enzima endo- β -mananase. Sendo assim, evidencia a importância da interação da α -galactosidase (exo-hidrolase) com a endo- β -mananase no processo de degradação da mobilização de reserva. Embora a exo-hidrolase não participe diretamente na atuação da endo- β -mananase, parece haver, por parte da α -galactosidase, uma modulação na taxa de reação, alterando a afinidade da endo- β -mananase pelo galactomanano.

VI. Conclusão

Cpm base no conjunto de resultados apresentados, sugere-se que a estrutura fina do galactomanano, principalmente as ramificações com galactose, modula a ação da endo- β -mananase (de fungos ou de plantas), não permitindo a hidrólise completa do galactomanano na ausência da α -galactosidase.

Embora este trabalho tenha sido realizado com galactomanano, Fanuti, Gidley & Reid (1991) e Tiné *et al.* (2003) encontraram efeitos similares da ramificação de galactose no polímero de xiloglucano sobre a ação da celulase e a xiloglucano transglicosilase hidrolase.

Os resultados apresentados possuem implicações para as funções biológicas do galactomanano. Sabidamente os galactomananos exercem funções variadas na semente, além da função de reserva de sementes (Buckeridge *et al.*, 2000a). Reid & Bewley, 1979; Buckeridge *et al.*, 2000c demonstraram que o galactomanano pela sua alta solubilidade, dada pelo alto conteúdo de galactoses, exerce o controle da embebição, absorvendo grandes quantidades de água, distribuindo-a ao redor do embrião e protegendo este contra estresse hídrico (Reid & Bewley, 1979; Halmer & Bewley, 1979).

Dessa forma, o polissacarídeo altamente ramificado resulta em grande solubilidade da molécula (Reid & Bewley, 1979; Buckeridge *et al.*, 2000c), assim, o polímero com apreciáveis quantidades de ramificações será prontamente solúvel, mas de acordo com os resultados apresentados também será hidrolisado mais lentamente.

Além da característica de tampão de água, os galactomananos, mas principalmente os mananos, possuem a função de proteção e dureza das sementes, protegendo-as contra patógenos e digestão dos animais (Buckeridge *et al.* 2000c).

Assim, a outra implicação leva em consideração o ataque de fungos ao galactomanano presente em sementes. A existência de ramificações com galactose que modulam a degradação do polímero pela endo- β -mananase, como a abrangida nesta Dissertação, pode ter sido selecionada como uma forma de controle da degradação pela própria plântula, mas também uma forma de impedir ou dificultar a degradação por microorganismos, denotando um importante aspecto de coevolução das leguminosas, que possuem reserva de galactomanano, e os fungos capazes de degradá-lo.

VII. Bibliografia

- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol.1. Springer-Verlag, Berlin.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1990. Galactomannan from Brazilian seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13:109-112.
- BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G. & DIETRICH, S. M. C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 84:145–151.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117:33-43.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura* 48:153-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. & LIMA, D.U. 2000a. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K. & KAUR, N. Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation. Elsevier Science, Amsterdam. p. 283-317.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. & LIMA, D.U. 2000c. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Edição Especial*, p.137-162.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.
- CAVALARI, A. A. 2009. Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica Papaya*). Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas.
- COURTOIS, J.E. & LE DIZET. 1968. *Bult. Soc. Chim. Biol.* vol.50.
- EMI, S.; FUKUMOTO, J. & YAMAMOTO, T. 1972. *J. Agr. Biol. Chem. Japan* 36:991.
- FANUTI, C.; GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formly called xyloglucan-specific endo-(1,4)- β -D-glucanase) from cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant Journal* v.3: 691-700.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M. & BEWLEY, J.D. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52:1239-1249.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- HOFFMAN, J. & SVENSSON, S. 1978. *Carbohydrates Research* 65:65-71.
- LISBOA, C.G.S; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo- α -mananase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(2):269-280.

- McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. & SMALL, D.M. 1976. Galactomannans and a galactoglucomannan in Legume seed endosperms: structural requirements for β -mannanase hydrolysis. *Phytochemistry* 15:1111-1117.
- McCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry* 22:649-658.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1983. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. *Carbohydrate Research* 119: 191-219.
- McCLEARY, B.V.; NURTHEN, E.; TARAVEL, F.R. & JOSELEAU, J.P. 1983. Characterisation of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β -D-mannanase. *Carbohydrate Research* 118: 91-109.
- McCLEARY, B.V.; CLARK, A.H.; DEA, I.C.M. & REES, D.A. 1985. The fine structure of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research* 139:237-260.
- PALMER, K.L. & BALLANTYNE, M. J. 1950. *Am. Chem. Soc.* 72:736-741.
- REESE, E.T. & SHIBATA, Y. 1965. *Can. J. Microbiol.* 11:167.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed. *Planta* 147:145-150.
- REID, J.S.G. & EDWARDS, M. 1995. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York. p. 155-186.
- SAEMAN, J.F.; BUHL, J.L. & HARRIS, E.E. 1945. Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed* 17: 35-37.
- STREET, H.E. & ÖPIK, H. 1984. *The physiology of flowering plants*. Edward Arnold, Great Britain, 3 ed. p.279.
- TINÉ, M.A.S.; LIMA, D.U. & BUCKERIDGE, M.S. 2003. Galactose branching modulates the action of cellulose on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers* 52:135-141.
- TSUJISAKA, Y. HIYAMA, K.; TAKENISHI, S. & FUKUMOTO, J. 1972. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 46:155.
- WALDRON, K. & BRETT, C. 1990. *Physiology and biochemistry of the plant cell walls*. Unwin Hyman, London, p.193.

DISCUSSÃO GERAL

Os galactomananos são polissacarídeos compostos de uma cadeia linear de resíduos de D-manose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), a qual resíduos de D-galactose estão unidos por ligações α -(1,6), formando ramificações simples (Buckeridge *et al.*, 2000a).

O polissacarídeo galactomanano conjuntamente aos polissacarídeos xiloglucano e (arabino)galactanos são os polímeros encontrados como componentes de reserva de parede celular em sementes (Buckeridge *et al.*, 2000c).

Os galactomananos são hidrolisados por três enzimas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase ou β -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase ou β -manosidase (EC 3.2.1.25) produzindo galactose e manose livres ao mesmo tempo em que a glucose é produzida no endosperma. Aparentemente essa última é disponibilizada ao embrião e servirá como fonte de carbono e energia para o estabelecimento das plântulas (Buckeridge *et al.*, 2000a; Lisboa *et al.*, 2006).

As alfa-galactosidases (E.C. 3.2.1.22) catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6) de galacto-oligossacarídeos e de polímeros de galacto-(gluco)-mananos. Essas enzimas estão amplamente distribuídas em animais, plantas e microorganismos (Fujimoto *et al.*, 2003).

A presença de isoformas de α -galactosidase foi primeiramente descrita por Petek & Dong (1961) em sementes de *Coffea* sp. e *Plantago ovata*. Tonini *et al.* (2006) sugerem que a presença de isoformas de endo- β -mananase em endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seja para garantir a hidrólise do galactomanano, mesmo com as modificações estruturais que este sofre durante a mobilização.

Feurtado *et al.* (2001) sugeriram pelo menos três isoformas da α -galactosidase durante e após a germinação de sementes de tomate e, através da obtenção e sequenciamento do cDNA da enzima, demonstraram alta homologia da forma ativa da α -galactosidase do tomate (40 kDa) com outras galactosidases, especialmente com as de sementes de *Coffea arabica* (café) (Zhu & Goldstein, 1994). Como apenas um gene para a α -galactosidase foi

identificado em sementes de tomate, as isoformas aparentemente se formam a partir de modificações pós-traducionais (Feurtado *et al.*, 2001).

McCleary & Matheson (1974) também detectaram múltiplas isoformas da α -galactosidase, nas sementes de *Cyamopsis tetragonoloba*, embora apenas uma delas (40 kDa) esteja associada com o endosperma (Overbeeke *et al.* 1989).

Assim, as diferentes isoformas de α -galactosidase podem estar relacionadas tanto a diferenças estruturais do galactomanano durante a mobilização, como por exemplo, a diminuição de substituições por galactose demandaria uma α -galactosidase com maior afinidade ao substrato; como também a diferentes funções além da degradação do galactomanano, por exemplo, a degradação de açúcares da série rafínosica (Bewley, 1997) e até o amadurecimento de frutos (remodelamento da parede celular) (Gao & Schaffer, 1999; Soh *et al.*, 2006).

Tonini *et al.* (2010) demonstraram por Western Blot utilizando anticorpo anti α -galactosidase e extrato bruto enzimático de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a presença de 8 bandas variando de 78 kDa a 12 kDa reativas ao anticorpo, evidenciando a presença de isoformas da α -galactosidase com diferentes tamanhos, que poderiam interagir entre si formando a estrutura quaternária.

Os autores sugerem que a interação entre as α -galactosidases seria visando uma ação proteolítica da própria α -galactosidase para ativá-la, pois argumentam que esta não seria transcrita *de novo* após a maturação da semente, ou seja, toda a enzima necessária à degradação já estaria pronta, mas não ativa; e para adaptar a enzima as mudanças no substrato durante o processo de degradação da reserva.

A α -galactosidase semipurificada de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. apresentou 6 isoformas (Capítulo I – Figura 26 e figuras 38 – 42, 45, Anexo), sendo uma delas preponderante. No entanto, durante o início do processo de purificação ainda separou-se mais duas isoformas (Figuras 13 e 14). Sugere-se que as duas isoformas retiradas no início da purificação estejam relacionadas a degradação de outros substratos, como demonstrado por Bewley (1997); Gao & Schaffer (1999) Soh *et al.* (2006), na degradação de oligossacarídeos da série rafínosica e remodelamento da parede celular, respectivamente.

Já as demais isoformas encontradas, sugere-se que estejam relacionadas a ação proteolítica da própria α -galactosidase em sua ativação e remodelamento visando o aumento da afinidade ao substrato, como demonstrado por Tonini, *et al.* (2010).

A regulação da degradação de reserva de sementes já foi demonstrada pela ação de fitohormônios. O ácido abscísio (ABA) é um potente inibidor da degradação da reserva de galactomanano e está envolvido no mecanismo de regulação dessa mobilização em sementes de *Ceratonia siliqua* (Seller, 1977), *Lactuca sativa* (Halmer & Bewley, 1979), *Lycopersicon sculentum* (Groot & Karssen, 1992), *Trigonella foenum-graecum* (Reid & Meier, 1973; Malek & Bewley, 1991; Kontos & Spyropoulos, 1995) e *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Potomati & Buckeridge, 2002; Tonini *et al.*, 2006).

Tonini (2008) demonstrou que a mobilização de reserva de galactomanano de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. é modulada negativamente pela presença do ABA, enquanto o etileno é promotor da mobilização.

Além da regulação esperada por fitohormônios, Tiné *et al.* (2003) sugeriram que a estrutura do xiloglucano de reserva de sementes conteria, pelo menos, parte da informação requerida para o seu próprio metabolismo, ou seja, o próprio polissacarídeo, através da distribuição de suas ramificações com galactose, modularia a ação da endohidrolase, neste caso a endo- β -mananase.

Estes fatos realçam a importância na interação das exo-hidrolases (α -galactosidase e β -manosidase) com as endo-hidrolases (endo- β -mananase) que ocorrem nos processos biológicos como a degradação da reserva de sementes ou degradação da parede celular por fungos (Tiné *et al.*, 2003).

Durante a degradação do galactomanano existe uma ordem na atuação das enzimas (Reid & Edwards, 1995 e Lisboa *et al.*, 2006), mas compreende-se que elas estejam presentes concomitantemente em grande parte do processo de degradação, sendo assim, a α -galactosidase é capaz de alterar a afinidade da endo- β -mananase ao substrato (galactomanano) ao retirar algumas ramificações de galactose, dessa forma, modulando o processo de degradação.

McCleary & Matheson (1983), demonstraram que quanto menor for a razão manose:galactose de um polissacarídeo, ou seja, quanto mais ramificado

for um polissacarídeo, menor será a porcentagem de hidrólise de dado polissacarídeo pela endo- β -mananase.

A partir da análise dos resultados sugere-se que as ramificações por galactose no polissacarídeo galactomanano pode modular o reconhecimento dos sítios de clivagem pela enzima endo- β -mananase.

Sugere-se esta modulação uma vez que: existe a produção de oligossacarídeos limites de digestão F1, F2 e F3 (Figura 28) após hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase, como demonstrado para xiloglucanos (Tiné *et al.*, 2003); os oligossacarídeos F1 possuem proporções distintas quando da hidrólise do galactomanano com endo- β -mananase em diferentes concentrações (Figuras 29 e 33), evidenciando preferência por sítios com menor grau de galactosilação; a presença da α -galactosidase diminui a produção dos oligossacarídeos limites de digestão F2 e F3, mostrando que a estes não possuem resistência intrínseca a hidrólise e que a reação atinge o equilíbrio mesmo quando ainda existem sítios de clivagem ainda disponíveis (Figura 32); e que polissacarídeos com estruturas diferentes, razão manose:galactose variando entre 150:1 a 1:1, são digeridos em diferentes taxas de hidrólise pela mesma enzima (Figuras 35 e 36), evidenciando que a ramificação com galactose dificulta a ação da endo- β -mananase.

Através dos resultados obtidos nesta dissertação, sugere-se que a estrutura do polissacarídeo galactomanano também contenha, pelo menos, parte da informação requerida para seu próprio metabolismo, código para a sua degradação, estando esta informação contida na distribuição das ramificações com resíduos de D-galactose (Capítulo 2).

A modulação da degradação feita pelo próprio polissacarídeo não só permite a regulação do processo de liberação dos açúcares, fonte de energia para o embrião em desenvolvimento, garantindo máximo aproveitamento pelo embrião, mas, principalmente, dificulta a ação dos microorganismos pelo aumento da complexidade, evidenciando um aspecto importante da co-evolução das leguminosas e fungos capazes de atacar os polissacarídeos de reserva de sementes.

Sugere-se que as diferentes isoformas da α -galactosidase relacionadas à degradação da reserva de galactomanano de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seriam produto da ação proteolítica da própria enzima a fim de

melhorar a afinidade da α -galactosidase ao substrato durante o processo de mobilização de reserva. Para a ação proteolítica da α -galactosidase possivelmente haveria a interação de duas enzimas, formando uma estrutura quaternária, onde uma ou ambas as enzimas teriam uma parte da cadeia de aminoácidos eliminada e, portanto, apresentariam uma diminuição do tamanho.

O aumento da afinidade da α -galactosidase ao substrato durante todo o processo de mobilização garante a liberação das ramificações com galactose de forma contínua, permitindo e aumentando a eficiência da ação da enzima endo- β -mananase aos sítios de clivagem, garantindo a degradação do polissacarídeo a oligossacarídeos de forma regulada, passível de bloqueio, pelo acúmulo de oligossacarídeos e galactose livre que inibem a ação das enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase, respectivamente (Tin *et al.*, 2003; Lisboa *et al.*, 2006), e dificultando a ação de microorganismos, propiciando ao embrio a maior quantidade de aares para o seu desenvolvimento, aumentando as chances de sucesso no estabelecimento da plntula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, K.; STALBRAND, H. 2001. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology* 29:441–448.
- ALCÂNTARA, P.H.N., DIETRICH, S.M.C. & BUCKERIDGE, M.S. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. *Plant Physiol. Biochem.*, 37 (9), 653-663.
- AL-KAISEY M.T., WILKIE C.B. 1992. The polysaccharides of agricultural lupin seeds, *Carbohydr. Res.* v.227: 147–161.
- ARAUJO, E.C.; MENDONÇA, A.V.R; BARROSO, D.G.; LAMÔNICA, K.R & SILVA, R.F. 2004. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 26, nº1, p.105-110.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. 2003. Semente. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. *Anatomia vegetal*. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 399-424.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1978. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Vol.1. Springer-Verlag, Berlin.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2ªed. Plenum Press, New York. 445p.
- BEWLEY J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of rotein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1990. Galactomannan from Brazilian seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13:109-112.
- BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G. & DIETRICH, S. M. C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 84:145–151.
- BUCKERIDGE, M.S. 1993. A novel β -galactosidase or exo-(1→4)- β -galactanase from cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds, and its role in post-germinative cell wall metabolism. Tese de Doutorado. University of Stirling.
- BUCKERIDGE M.S., REID J.S.G. 1994. Purification and properties of a novel α -galactosidase or exo-(1,4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds, *Planta* v.192: 502–511.
- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R. & DIETRICH, S.M.C. 1995a. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. *Revista Brasileira de Botânica* 18:171-175.

- BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117:33-43.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura* 48:153-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. & LIMA, D.U. 2000a. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K. & KAUR, N. *Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation*. Elsevier Science, Amsterdam. p. 283-317.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2000b. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:141-156.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. & LIMA, D.U. 2000c. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Edição Especial*, p.137-162.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004a. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A. & AIDAR, M.P.M. (2004b) Mobilização de Reservas. In: *Germinação. Do básico ao aplicado*. Alfredo Gui Ferreira & Fabian Borghetti (Eds.). Artmed, Porto Alegre pp.163-185.
- BUCKERIDGE, M.S. CAVALARI, A.A. & SILVA, G.B. 2008. Parede Celular. In: *Fisiologia Vegetal*, Gilberto B. Kerbauy (2ª Edição). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro Cap. 9: 165-181.
- BUCKERIDGE, M.S. 2010. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154: 1017-1023
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. 2008. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*: 1–6.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *The Plant Journal* 3:1-30.
- CARPITA, N.C. & McCANN, M.C. 2000. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & RUSSEL, R.J. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 3ªed. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 52-108.
- CAVALARI, A. A. 2009. Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica Papaya*). Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas.
- CHANDRA, S.K.N. & DEMASON, D.A. 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinating date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53-61.
- COURTOIS, J.E. & PETEK, F. 1966. α -galactosidase from coffee beans. *Methods in Enzymology* 8:565-670.

- COURTOIS, J.E. & LE DIZET. 1968. Bult. Soc. Chim. Biol. vol.50.
- CRAWSHAW, L.A. & REID, J.S.G. 1984. Changes in cell-wall polysaccharides in relation to seedling development and the mobilisation of reserves in the cotyledons of *Lupinus angustifolius* Cv. Unicrop. Planta v.160:449-454.
- DAVIS, M.O.; HATA, D.J.; JOHNSON, S.A.; WALKER, J.C. & SMITH D.S. 1996. Cloning, expression and characterization of a blood group B active recombinant α -D-galactosidase from soybean (*Glycine max*). Biochemistry and Molecular Biology international 39: 471-485.
- DAVIS, M.O.; HATA, D.J.; JOHNSON, S.A.; JONES, D.E.; HARMATA, M.A.; EVANS, M.L.; WALKER, J.C. & SMITH D.S. 1997. Cloning, expression and characterization of a blood group B active recombinant α -D-galactosidase from pinto bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochemistry and Molecular Biology international 42: 453-467.
- DEA, I.C.M. & MORRISON, A. 1975. Chemistry and Interactions of seed galactomannans. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 31:241-312.
- DEA I.C.M., CLARK A.H., MCCLEARY B.V. 1986. Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans. Carbohydr. Res. v.147: 275–294.
- DEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. 1972. Biochemistry of α -galactosidases. Advan. Enzymol. 36: 91:130.
- DHAR, M.; MITRA, M.; HATA, J.; BUTNARIU, O. & SMITH, D. 1994. Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -D-galactosidase isozymes. Biochemistry and Molecular Biology International 34:1055-1062.
- DEMASON, D.A.; MADORE, M.A.; SEKHAR, K.N.C. & HARRIS, M.J. 1992. Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. Protoplasma 166:177-186.
- DIRK, L.M.A.; GRIFFEN, A.M.; DOWNIE, B. & BEWLEY, J.D. 1995. Multiple isozymes of endo- β -mannanase in dry and imbibed seeds. Phytochemistry v.40: 1045-1056.
- EDWARDS M., DEA I.C.M., BULPIN P.V., REID J.S.G. 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination, Planta v.163 :133–140.
- EMI, S.; FUKUMOTO, J. & YAMAMOTO, T. 1972. J. Agr. Biol. Chem. Japan 36:991.
- FANUTI, C.; GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formly called xyloglucan-specific endo-(1,4)- β -D-glucanase) from cotyledons of germinated nasturtium seeds. Plant Journal v.3: 691-700.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M. & BEWLEY, J.D. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. Journal of Experimental Botany 52:1239-1249.
- FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H. & MIZUNO, H. 2003. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. J. Biol. Chem. 278 (22): 20313-20318.
- GAO, Z. & SCHAFFER, A.A. 1999. A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. Plant Physiology 119:979-987.

- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1987. Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening - a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171:525-531.
- GROOT, S.P.C. & KARSSSEN, C.M. 1992. Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds - studies with the sitiens mutant. *Plant Physiology* 99:952-958.
- GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKA-ROKICKIA, B.; VERMEER, E. & KARSSSEN, C.M. 1988. Gibberellins-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellindeficient tomato seeds prior to radicle emergence. *Planta* v.174: 500-504.
- GUERIN JR, LANCE RCM, WALLACE W. 1992 Release and activation of barley b-amylase by malt endopeptidases. *J Cereal Sci* 15:5-14.
- GUIMARÃES, V.M; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. & FELIX, C.R. 2001. Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligossacharides. *Phytochemistry* 58:67-73.
- GUZMÁN, J.M. & HERNANDEZ, G.L. 1982. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. *Phyton* 42:1-8.
- HALMER, P. & BEWLEY, J.D. 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144:333-340.
- HAMES B. D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D (eds) *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, New York.
- HIRST, E.L.; JONES, J.K.N.; WALDER, W.O. 1947. Pectic substances. Part 7: the constitution of the galactan from *Lupinus albus*. *J. Chem. Soc.* 1225-1229.
- HOFFMAN, J. & SVENSSON, S. 1978. *Carbohydrates Research* 65:65-71.
- HOFFMAN, K.; BUCHER, P.; FLAQUET, L.; BAIROCH, A. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research* 27:215-219.
- ITO, T.; SHIMURA, S.; ADACHI, S. 1979. α -galactosidase from alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 43:1499-1504.
- JARVIS, M.C. & MCCANN, M.C. 2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts
- KEUSCH L. 1968. Die mobilisierung des reservemannans im keimenden Dattelsamen, *Planta* v.78: 321-350.
- KISSMAN, K.G. & GROTH, D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. Tomo II. BASF, São Paulo. P.947-950.
- KOOIMAN, P.1960. On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Acta Bot. Neerl.* v.9: 208-219.
- KONTOS, F. & SPYROPOULOS, C.G. 1995. Production and secretion of α -galactosidase and endo- β -mannanase activity by carob (*Ceratonia siliqua* L.) in the endosperm protoplast. *Journal of Experimental Botany* v.46: 577-583.
- LABOURIAU, L.G. 1983. A germinação das sementes. Secretaria-geral da Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Washington. 173p.

- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 223, 680-685.
- LEUNG, D.W.M. & BEWLEY, J.D. 1983. A role for α -galactosidase in the degradation of the endosperm cell walls of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. *Planta* 157:274-277.
- LIMA, E.E.; DE REZENDE, S.T.; BORGES, R.C.G. & PEREZ, S.C.J.A. 2004. Caracterização de α -galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli, Var. Pubescens (Tamboril da mata). *Revista Brasileira de Sementes*, Vol. 26, nº 2, p.82-90.
- LISBOA, C.G.S. 2003. Endo- β -mannanase de endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.: purificação, caracterização e importância na germinação e desenvolvimento da plântula. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- LISBOA, C.G.S.; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(2):269-280.
- MALEK, A.E. & BEWLWY, J.D. 1991. Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* v.1: 45-49.
- MANZI, A.E. & CERESO, A.S. 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research* 134:115-131.
- MATHESON N.K., SAINI H.S. 1977. α -L-arabinofuranosidases and α -D-galactosidases in germinating-lupin cotyledons. *Carbohydr. Res.* v.57: 103–116.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. 2^oed. Pergamon Press, Oxford. 192p.
- McCANN, M.C. & ROBERTS, K. 1991. Architecture of the primary wall. In: LLOYD, C.W. The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press, Londres. p. 109-129.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1974. α -D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 13:1747-1757.
- MCCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1975. Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 14:1187–1194.
- McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. & SMALL, D.M. 1976. Galactomannans and a galactoglucomannan in Legume seed endosperms: structural requirements for β -mannanase hydrolysis. *Phytochemistry* 15:1111-1117.
- McCLEARY, B.V. 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry* 22:649-658.
- McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. 1983. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. *Carbohydrate Research* 119: 191-219.

- McCLEARY, B.V.; NURTHEN, E.; TARAVEL, F.R. & JOSELEAU, J.P. 1983. Characterisation of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β -D-mannanase. *Carbohydrate Research* 118: 91-109.
- McCLEARY, B.V.; CLARK, A.H.; DEA, I.C.M. & REES, D.A. 1985. The fine structure of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research* 139:237-260.
- McIlvaine, T. C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* 49:183-189.
- MOE, O.A.; MILLER, S.E. & IWEN, M.H. 1947. Investigation of the reserve carbohydrate of leguminous seeds. I. Periodate oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 69:2621-2825.
- NADELMANN, H. 1890. Über die Schleimendosperme der Leguminosen. *Pringsheims Jahrb Wissenschaft Botany* 21:1-83.
- NOMAGUCHI, M.; NONOGAKI, H. & YUKIO, M. 1995. Development of galactomannan-hydrolyzing in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior germination. *Physiologia Plantarum* 94:105-109.
- OVERBEEKE, N.; FELLINGER, A.J.; TOONEN, M.Y.; VAN WASSENAAR, D. & VERRIPS, C.T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the α -galactosidase cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). *Plant Molecular Biology* 13:541-550.
- PALMER, K.L. & BALLANTYNE, M. J. 1950. *Am. Chem. Soc.* 72:736-741.
- Parker M.L. 1984. Cell wall storage polysaccharide in cotyledons of *Lupinus angustifolius* L. II mobilization during germination and seedling development, *Protoplasma* v.120: 233–241.
- PETEK, F. & TO DONG. 1961. *Enzymologia*, 23, 133.
- PLANT, A.R. & MOORE, K.G. 1982. A-D-Mannosidase and α -D-galactosidase from proteins bodies of *Lupinus angustifolius* cotyledons. *Phytochemistry* 21:985-989.
- POTOMATI, A. & BUCKERIDGE, M.S. 2002. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. 6^oed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 906p.
- REESE, E.T. & SHIBATA, Y. 1965. *Can. J. Microbiol.* 11:167.
- REID, J.S.G. 1985a. Cell wall storage carbohydrates in seeds. *Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses. Advances in Botanical Research* 11:125-155.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed. *Planta* 147:145-150.
- REID, J.S.G. & EDWARDS, M. 1995. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York. p. 155-186.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germination seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson

- clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106:44-60.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1973. Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- SACHS, J. 1862. Zur Keimungsgeschichte der Dattel. *Bot. Zeitung* v.20: 241-246; 249-252.
- SAEMAN, J.F.; BUHL, J.L. & HARRIS, E.E. 1945. Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed* 17: 35-37.
- SCHALLER A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197.
- SEILER, A. 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134:209-221.
- SILVA, C.O. 2001. Papel da β -galactosidase no mecanismo de degradação do xiloglucano de parede celular durante a mobilização de reserva em cotilédones de *Copaifera lansgsdorffii*. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, G.A. 2007. Purificação parcial e caracterização de uma α -galactosidase de sementes de Guapuruvu (*Schizolobium parahyba*). Dissertação de Mestrado pela Universidade de Brasília.
- SOH, C-P; ALI, Z.M. & LAZAN, H. 2006. Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry* 67:242-254.
- SOMME, R. 1968. The structure of a galactomannan from *Medicago Lupulina* L. *Acta Chemica Scandinavica* 22:537-545.
- SPYROPOULOS, C.G. & REID, J.S.G. 1985. Regulation of α -galactosidase activity and the hydrolases of galactomannan in the endosperm of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed. *Planta* 166:271-275.
- STREET, H.E. & ÖPIK, H. 1984. The physiology of flowering plants. Edward Arnold, Great Britain, 3 ed. p.279.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3ªed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- TINÉ, M.A.; CORTELAZZO, A.L. & BUCKERIDGE, M.S. 2000. Xyloglucan mobilization in cotyledons of developing plantlets of *Hymenea courbaril* L. (Leguminosae – Caesalpinoideae). *Plant Sci.* v.154: 117-126.
- TINÉ, M.A.S.; LIMA, D.U. & BUCKERIDGE, M.S. 2003. Galactose branching modulates the action of cellulose on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers* 52:135-141.
- TOOKEY, H.L.; LOHMAR, R.L. & WOLFF, I.A. 1962. New sources of seed mucilages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v.10:131-133.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo-

- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: structure and function* 20:669-678.
- TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVAI, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees: structure and function* 21:13-21.
- TONINI, P. P. 2008. Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e carboidratos e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes *Sesbania virgata* de (Cav.) Pers. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- TONINI, P. P.; CARRARA, T.B.; BUCKERIDGE, M. S. 2010. Storage proteins and cell wall mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees: Structure and Function* v.24 (4): 675-684.
- TSUJISAKA, Y. HIYAMA, K.; TAKENISHI, S. & FUKUMOTO, J. 1972. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 46:155.
- UNRAU, A.M. 1961. The constitution of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Organic Chemistry* 26:3097-3101.
- VIANA, S.F.; GUIMARÃES, V.M.; MOREIRA, M.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; de REZENDE, S.T. 2002b. Reduction of raffinose oligosaccharides in soymilk by α -galactosidase from germinating soymilk seeds. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 31., 2002, Caxambu. *Anais Caxambu: (SBBQ)*, p.95.
- WALDRON, K. & BRETT, C. 1990. *Physiology and biochemistry of the plant cell walls*. Unwin Hyman, London, p.193.
- WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- WILLIAMS, J.; VILLARROYA, H. & PETEK, F. 1978. α -galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*: Purification, physiochemical properties and mode of galactomannan hydrolysis in vitro. *Biochemical Journal* 175:1069-1077.
- ZHU, A. & GOLDSTEIN, J. 1994. Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -galactosidase. *Gene* 140:227-231.

ANEXO

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	qil113497	773	45506	49 (26)	7 (6)	1.16 RecName: Full=Alpha-galactosidase; AltName: Full=Alpha-D-galactoside galactohydrolase; AltName: Full=Melibiase; Flag...
1.2	qil10178279	231	40531	24 (16)	5 (4)	0.37 alpha-galactosidase-like protein [Arabidopsis thaliana]
1.3	qil2492782	203	41626	15 (6)	5 (3)	0.26 RecName: Full=Alpha-galactosidase; AltName: Full=Alpha-D-galactoside galactohydrolase; AltName: Full=Melibiase; Flag...
1.4	qil927577	177	47473	15 (10)	4 (3)	0.22 alpha-galactosidase [Phaseolus vulgaris]
1.5	qil147810287	159	40131	20 (9)	5 (3)	0.27 hypothetical protein VITISV_001661 [Vitis vinifera]
2.1	qil219522337	146	84600	25 (13)	9 (5)	0.21 methionine synthase [Cicer arietinum]
2.2	qil255569484	101	84896	10 (3)	4 (2)	0.08 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus communis]
2.3	qil68655500	92	84717	3 (3)	2 (2)	0.08 methionine synthase 2 enzyme [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
3	qil30678275	102	46489	3 (3)	1 (1)	0.07 mannan endo-1,4-beta-mannosidase 1 [Arabidopsis thaliana]
4	qil205830697	74	1393	1 (1)	1 (1)	3.07 RecName: Full=Unknown protein 18
5	qil242076578	64	83979	2 (1)	1 (1)	0.04 hypothetical protein SORBIDRAFT_06g023450 [Sorghum bicolor]
6	qil414550	57	27366	1 (1)	1 (1)	0.12 cytosolic triose phosphate isomerase [Arabidopsis thaliana]
7	qil33340129	53	115864	5 (1)	1 (1)	0.03 sucrose-phosphate synthase [Triticum aestivum]
8	qil4510395	53	92890	2 (1)	1 (1)	0.04 putative beta-galactosidase [Arabidopsis thaliana]
9	qil9230771	51	42261	3 (1)	2 (1)	0.08 cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]
10	qil159470791	43	57215	2 (1)	1 (1)	0.06 exostosin-like glycosyltransferase [Chlamydomonas reinhardtii]
11	qil224065589	40	35247	1 (1)	1 (1)	0.09 predicted protein [Populus trichocarpa]
12	qil255545444	38	51512	6 (4)	2 (2)	0.13 Aminotransferase ybdL, putative [Ricinus communis]
13	qil194693606	38	46358	10 (2)	2 (1)	0.07 unknown [Zea mays]
14	qil38636771	36	7487	2 (1)	1 (1)	0.48 hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]
15	qil255073705	34	52734	2 (1)	1 (1)	0.06 predicted protein [Micromonas sp. RCC299]
16	qil159481610	25	32293	1 (1)	1 (1)	0.10 hypothetical protein CHLREDRAFT_195671 [Chlamydomonas reinhardtii]

Figura 38: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 1 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. As proteínas realssadas pelo retângulo preto fazem referência a α -galactosidasas.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1.1	gil15825499	505	37543	24 (18)	9 (7)	0.97	aspartate aminotransferase [Securigera parviflora]
1.2	gil255551036	428	48583	30 (21)	10 (8)	1.06	aspartate aminotransferase, putative [Ricinus communis]
1.3	gil15239078	264	49152	29 (17)	10 (8)	1.04	aspartate aminotransferase [Arabidopsis thaliana]
1.4	gil169915	69	50725	8 (6)	4 (4)	0.29	aspartate aminotransferase [Glycine max]
2.1	gil9230771	602	42261	39 (27)	12 (11)	1.87	cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]
2.2	gil224109062	570	42767	25 (22)	9 (8)	1.11	predicted protein [Populus trichocarpa]
2.3	gil121485004	453	42334	26 (22)	11 (9)	0.97	cytosolic phosphoglycerate kinase [Helianthus annuus]
2.4	gil102139814	278	42326	15 (11)	7 (5)	0.57	phosphoglycerate kinase, putative [Musa acuminata]
3.1	gil113497	379	45506	27 (18)	7 (6)	1.32	RecName: Full=Alpha-galactosidase; AltName: Full=Alpha-D-galactoside galactohydrolase; AltName: Full=Melibiose; Flag...
3.2	gil2492782	228	41626	11 (7)	4 (3)	0.26	RecName: Full=Alpha-galactosidase; AltName: Full=Alpha-D-galactoside galactohydrolase; AltName: Full=Melibiose; Flag...
3.3	gil927575	227	46879	13 (11)	5 (4)	0.31	alpha galactosidase [Glycine max]
3.4	gil10178279	220	40531	16 (14)	5 (4)	0.37	alpha-galactosidase-like protein [Arabidopsis thaliana]
4.1	gil61162203	146	93126	11 (9)	5 (4)	0.19	beta-D-galactosidase [Pyrus pyrifolia]
4.2	gil217075793	135	30919	7 (5)	3 (3)	0.50	unknown [Medicago truncatula]
5.1	gil255569484	170	84896	9 (6)	4 (2)	0.08	S-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus communis]
5.2	gil219522337	76	84600	14 (4)	7 (3)	0.12	methionine synthase [Cicer arietinum]
6.1	gil284437984	160	25595	8 (5)	4 (3)	0.44	monodehydroascorbate reductase [Actinidia deliciosa]
6.2	gil15865451	144	51944	16 (6)	6 (4)	0.28	monodehydroascorbate reductase [Mesembryanthemum crystallinum]
6.3	gil217330688	113	34992	17 (7)	8 (6)	0.89	unknown [Medicago truncatula]
6.4	gil146432261	80	47478	14 (6)	5 (4)	0.31	monodehydroascorbate reductase [Vitis vinifera]
6.5	gil50400859	68	47501	6 (3)	4 (3)	0.22	RecName: Full=Monodehydroascorbate reductase, seedling isozyme; Short=MDAR seedling; AltName: Full=Ascorbate free r...
6.6	gil260780686	44	43112	3 (2)	1 (1)	0.08	RNA polymerase alpha subunit [Bryopsis hypnoides]
7.1	gil40645347	119	41093	9 (7)	5 (4)	0.36	hypothetical protein [Pisum sativum]
7.2	gil255644700	84	25192	6 (4)	4 (4)	0.65	unknown [Glycine max]
7.3	gil2232254	82	42125	7 (6)	3 (3)	0.25	old-yellow-enzyme homolog [Catharanthus roseus]
8	gil30678275	105	46489	2 (2)	1 (1)	0.07	mannan endo-1,4-beta-mannosidase 1 [Arabidopsis thaliana]
9.1	gil225458301	72	50098	3 (3)	2 (2)	0.14	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
9.2	gil224065589	59	35247	3 (3)	2 (2)	0.20	predicted protein [Populus trichocarpa]
10	gil10178872	68	47080	6 (4)	1 (1)	0.07	(1-4)-beta-mannan endohydrolase [Coffea arabica]
11	gil414550	57	27366	1 (1)	1 (1)	0.12	cytosolic triose phosphate isomerase [Arabidopsis thaliana]
12	gil115468758	50	47253	1 (1)	1 (1)	0.07	Os06g0594100 [Oryza sativa Japonica Group]
13	gil226530268	48	43106	2 (1)	1 (1)	0.08	hypothetical protein LOC100277508 [Zea mays]
14	gil167998044	46	30478	2 (2)	1 (1)	0.11	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
15	gil166876	41	35029	2 (1)	1 (1)	0.09	oxidase [Arabidopsis thaliana]
16	gil224031921	41	34640	1 (1)	1 (1)	0.10	unknown [Zea mays]
17	gil21645781	37	10364	5 (3)	1 (1)	0.34	glutamine synthase [Oxalis peduncularis var. pilosa]
18	gil148907444	36	49656	2 (2)	1 (1)	0.07	unknown [Picea sitchensis]
19	gil147841344	32	51228	1 (1)	1 (1)	0.06	hypothetical protein VITISV_011365 [Vitis vinifera]
20	gil75147005	28	45154	1 (1)	1 (1)	0.07	RecName: Full=Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial; Short=SLSCoAlbeta; Flags: Precursor

Figura 39: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 2 (gel de poliácridamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. As proteínas realssadas pelo retângulo preto fazem referência a α -galactosidases.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	qil211906450	1202	42294	53 (46)	15 (13)	2.59 phosphoglycerate kinase [Gossypium hirsutum]
1.2	qil9230771	1016	42261	59 (47)	15 (11)	2.59 cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]
1.3	qil102139814	586	42326	28 (24)	8 (7)	1.12 phosphoglycerate kinase, putative [Musa acuminata]
1.4	qil82621108	584	42512	26 (21)	10 (8)	0.82 phosphoglycerate kinase-like [Solanum tuberosum]
1.5	qil115469436	554	42310	21 (19)	6 (6)	0.69 Os06g0668200 [Oryza sativa Japonica Group]
1.6	qil2499498	488	42338	31 (23)	12 (9)	1.12 RecName: Full=Phosphoglycerate kinase, cytosolic
2.1	qil1122288	819	45544	38 (30)	13 (10)	1.49 aspartate aminotransferase [Lotus japonicus]
2.2	qil15825499	547	37543	27 (18)	10 (7)	1.14 aspartate aminotransferase [Securigera parviflora]
2.3	qil255551036	387	48583	32 (19)	11 (8)	0.93 aspartate aminotransferase, putative [Ricinus communis]
2.4	qil15239078	315	49152	31 (19)	10 (8)	0.91 aspartate aminotransferase [Arabidopsis thaliana]
2.5	qil169915	233	50725	17 (14)	8 (8)	0.65 aspartate aminotransferase [Glycine max]
2.6	qil224092554	147	51185	11 (8)	6 (5)	0.37 predicted protein [Populus trichocarpa]
3.1	qil219522337	265	84600	22 (14)	9 (6)	0.26 methionine synthase [Cicer arietinum]
3.2	qil33325957	264	84401	25 (16)	10 (6)	0.26 methionine synthase [Glycine max]
3.3	qil255569484	189	84896	10 (7)	5 (3)	0.12 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus communis]
3.4	qil68655500	127	84717	7 (4)	5 (3)	0.12 methionine synthase 2 enzyme [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
4.1	qil14764532	180	46604	5 (4)	2 (2)	0.15 monodehydroascorbate reductase [Brassica rapa subsp. pekinensis]
4.2	qil217330688	87	34992	16 (6)	7 (4)	0.57 unknown [Medicago truncatula]
4.3	qil146432261	84	47478	13 (5)	5 (4)	0.31 monodehydroascorbate reductase [Vitis vinifera]
4.4	qil15865451	82	51944	10 (3)	5 (3)	0.20 monodehydroascorbate reductase [Mesembryanthemum crystallinum]
4.5	qil50400859	50	47501	5 (2)	3 (2)	0.14 RecName: Full=Monodehydroascorbate reductase, seedling isozyme; Short=MDAR seedling; AltName: Full=Ascorbate free r...
5.1	qil217072302	148	43183	6 (5)	2 (2)	0.16 unknown [Medicago truncatula]
5.2	qil224065589	111	35247	6 (4)	3 (2)	0.20 predicted protein [Populus trichocarpa]
5.3	qil255536825	110	49252	7 (6)	4 (3)	0.21 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]
5.4	qil147812640	63	51640	3 (2)	2 (1)	0.06 hypothetical protein VITISV_043447 [Vitis vinifera]
6.1	qil255645241	134	43842	17 (7)	7 (3)	0.24 unknown [Glycine max]
6.2	qil124359617	104	73666	9 (5)	4 (2)	0.09 Glycoside hydrolase, clan GH-D; Ricin B-related lectin [Medicago truncatula]
7	qil255632556	105	30021	4 (3)	4 (3)	0.37 unknown [Glycine max]
8	qil255549046	96	45616	3 (3)	1 (1)	0.07 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase, putative [Ricinus communis]
9	qil255639059	86	24593	5 (3)	2 (1)	0.14 unknown [Glycine max]
10	qil224107747	57	73501	7 (4)	2 (1)	0.09 predicted protein [Populus trichocarpa]
11	qil2252630	56	61035	2 (1)	1 (1)	0.05 hypothetical protein; 35160-37580 [Arabidopsis thaliana]
12	qil225426140	55	168662	2 (1)	1 (1)	0.02 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
13	qil1854443	44	42333	3 (2)	2 (2)	0.16 CPRD8 protein [Vigna unguiculata]
14	qil224031921	49	34640	2 (2)	1 (1)	0.10 unknown [Zea mays]
15	qil414550	47	27366	2 (1)	1 (1)	0.12 cytosolic triose phosphate isomerase [Arabidopsis thaliana]
16	qil2213425	30	32737	2 (1)	1 (1)	0.10 hypothetical protein [Citrus x paradisi]
17	qil1143392	26	39425	1 (1)	1 (1)	0.08 uridine diphosphate glucose epimerase [Arabidopsis thaliana]
18	qil927575	25	46879	3 (1)	3 (1)	0.07 alpha galactosidase [Glycine max]

Figura 40: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 3 (gel de poliácridamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	qil211906450	475	42294	41 (27)	14 (9)	1.29 phosphoglycerate kinase [Gossypium hirsutum]
1.2	qil121485004	377	42334	31 (19)	12 (7)	0.69 cytosolic phosphoglycerate kinase [Helianthus annuus]
1.3	qil9230771	291	42261	31 (16)	12 (7)	0.97 cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]
1.4	qil102139814	198	42326	18 (11)	7 (5)	0.69 phosphoglycerate kinase, putative [Musa acuminata]
2.1	qil217072302	282	43183	11 (7)	3 (2)	0.25 unknown [Medicago truncatula]
2.2	qil255536825	156	49252	9 (9)	2 (2)	0.21 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]
2.3	qil147812640	103	51640	4 (4)	1 (1)	0.06 hypothetical protein VITISV_043447 [Vitis vinifera]
3.1	qil255639059	233	24593	14 (9)	4 (4)	0.66 unknown [Glycine max]
3.2	qil255636694	101	37217	8 (4)	3 (3)	0.29 unknown [Glycine max]
4.1	qil224092113	152	40845	5 (3)	3 (2)	0.17 predicted protein [Populus trichocarpa]
4.2	qil217073780	63	29717	4 (3)	2 (2)	0.24 unknown [Medicago truncatula]
4.3	qil255550131	54	36386	4 (2)	3 (2)	0.19 nitrilase and fragile histidine triad fusion protein, putative [Ricinus communis]
5	qil224065158	139	37376	17 (6)	3 (1)	0.09 predicted protein [Populus trichocarpa]
6.1	qil68655500	110	84717	7 (6)	3 (2)	0.08 methionine synthase 2 enzyme [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
6.2	qil166244561	92	22357	5 (4)	3 (2)	0.32 MetE [Quercus mongolica subsp. crispula]
6.3	qil33325957	85	84401	11 (7)	4 (3)	0.12 methionine synthase [Glycine max]
6.4	qil224146039	85	85301	8 (5)	3 (2)	0.08 vitamin-b12 independent methionine synthase, 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine [Populus trichocarpa]
7	qil1122288	86	45544	4 (2)	4 (2)	0.15 aspartate aminotransferase [Lotus japonicus]
8.1	qil12585296	85	63513	6 (4)	4 (3)	0.16 RecName: Full=Phosphoglucomutase, cytoplasmic; Short=PGM; AltName: Full=Glucose phosphomutase
8.2	qil15223226	46	63670	4 (2)	3 (2)	0.11 phosphoglucomutase [Arabidopsis thaliana]
9	qil29335747	80	47547	4 (4)	3 (3)	0.22 alpha-galactosidase [Helianthus annuus]
10.1	qil3913008	73	38599	4 (3)	3 (2)	0.28 RecName: Full=Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme
10.2	qil255632556	53	30021	4 (2)	4 (2)	0.23 unknown [Glycine max]
10.3	qil15227981	50	38705	3 (2)	3 (2)	0.18 fructose-bisphosphate aldolase, class I [Arabidopsis thaliana]
11.1	qil118485066	72	26747	3 (3)	2 (2)	0.26 unknown [Populus trichocarpa]
11.2	qil255537811	42	33191	2 (2)	2 (2)	0.21 UDP-glucose 4-epimerase, putative [Ricinus communis]
12	qil225451800	54	40778	1 (1)	1 (1)	0.08 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
13	qil109892850	50	1707	3 (1)	1 (1)	2.57 RecName: Full=Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17
14	qil2252630	46	61035	1 (1)	1 (1)	0.05 hypothetical protein; 35160-37580 [Arabidopsis thaliana]
15	qil2827080	45	36003	5 (1)	2 (1)	0.09 malate dehydrogenase precursor [Medicago sativa]
16	qil168048904	44	50622	3 (1)	1 (1)	0.07 predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
17	qil15226197	44	79284	3 (1)	1 (1)	0.04 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase-like protein [Arabidopsis thaliana]
18	qil224141539	39	54345	2 (1)	2 (1)	0.06 predicted protein [Populus trichocarpa]
19	qil147857410	39	130834	3 (1)	1 (1)	0.02 hypothetical protein VITISV_028768 [Vitis vinifera]
20	qil3378650	35	34843	3 (2)	2 (2)	0.20 orf [Medicago sativa]
21	qil225426310	34	38403	2 (2)	1 (1)	0.09 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
22	qil163960967	32	47637	4 (1)	2 (1)	0.07 monodehydroascorbate reductase [Vaccinium corymbosum]
23	qil255553771	20	57213	1 (1)	1 (1)	0.06 pentatricopeptide repeat-containing protein, putative [Ricinus communis]

Figura 41: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 4 (gel de poliácridamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	gil217073780	632	29717	26 (23)	5 (5)	1.10 unknown [Medicago truncatula]
1.2	gil255550131	449	36386	24 (19)	4 (3)	0.42 nitrilase and fragile histidine triad fusion protein, putative [Ricinus communis]
1.3	gil224092113	428	40845	19 (14)	4 (3)	0.37 predicted protein [Populus trichocarpa]
2.1	gil224114557	327	35794	15 (13)	6 (6)	0.70 predicted protein [Populus trichocarpa]
2.2	gil21388550	234	36429	12 (11)	5 (5)	0.55 putative mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase [Solanum tuberosum]
2.3	gil255563084	190	36136	8 (8)	4 (4)	0.42 malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]
3.1	gil255544582	282	42530	18 (13)	7 (6)	0.57 phosphoglycerate kinase, putative [Ricinus communis]
3.2	gil102139814	68	42326	6 (3)	4 (3)	0.25 phosphoglycerate kinase, putative [Musa acuminata]
4.1	gil217072302	225	43183	9 (6)	3 (2)	0.16 unknown [Medicago truncatula]
4.2	gil255536825	72	49252	7 (3)	2 (2)	0.14 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]
5.1	gil225440480	179	35345	17 (10)	8 (5)	0.71 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
5.2	gil217071994	92	24385	6 (4)	3 (3)	0.47 unknown [Medicago truncatula]
5.3	gil217072642	90	34979	4 (4)	3 (3)	0.31 unknown [Medicago truncatula]
6.1	gil224141539	108	54345	8 (5)	2 (2)	0.12 predicted protein [Populus trichocarpa]
6.2	gil255574183	99	53547	6 (5)	2 (2)	0.13 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]
7	gil2213425	93	32737	4 (2)	2 (1)	0.10 hypothetical protein [Citrus x paradisi]
8.1	gil224120514	85	30819	4 (3)	3 (2)	0.23 predicted protein [Populus trichocarpa]
8.2	gil255648287	64	34112	4 (3)	3 (2)	0.20 unknown [Glycine max]
9.1	gil255642907	80	34801	14 (4)	8 (3)	0.31 unknown [Glycine max]
9.2	gil217072752	43	35009	8 (2)	4 (2)	0.20 unknown [Medicago truncatula]
10	gil15825499	72	37543	3 (2)	2 (2)	0.18 aspartate aminotransferase [Securigera parviflora]
11	gil47169030	70	24962	4 (4)	1 (1)	0.13 Chain A, The 2.0 A Crystal Structure Of The Kdel-Tailed Cysteine Endopeptidase Functioning In Programmed Cell Death Of ...
12.1	gil10178279	64	40531	3 (2)	3 (2)	0.17 alpha-galactosidase-like protein [Arabidopsis thaliana]
12.2	gil242044154	59	33295	3 (2)	2 (2)	0.21 hypothetical protein SORBIDRAFT_02g018580 [Sorghum bicolor]
13	gil15229809	59	21727	3 (1)	1 (1)	0.15 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]
14	gil255637531	58	34290	10 (7)	4 (3)	0.32 unknown [Glycine max]
15	gil112837	55	35639	1 (1)	1 (1)	0.09 RecName: Full=NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase
16	gil224138590	48	102591	3 (2)	2 (2)	0.06 predicted protein [Populus trichocarpa]
17	gil255569764	50	35932	2 (2)	2 (2)	0.19 2-nitropropane dioxygenase precursor, putative [Ricinus communis]
18	gil147812640	48	51640	2 (1)	1 (1)	0.06 hypothetical protein VITISV_043447 [Vitis vinifera]
19	gil297815272	46	64141	2 (1)	1 (1)	0.05 hypothetical protein ARALYDRAFT_905257 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
20	gil109892850	44	1707	3 (1)	1 (1)	2.57 RecName: Full=Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17
21	gil242088611	41	53421	2 (1)	1 (1)	0.06 hypothetical protein SORBIDRAFT_09g026690 [Sorghum bicolor]
22	gil297740316	40	5334	2 (2)	1 (1)	0.68 unnamed protein product [Vitis vinifera]
23	gil255560902	36	129803	3 (1)	1 (1)	0.03 Myosin-13, putative [Ricinus communis]
24	gil118482497	34	45282	2 (1)	1 (1)	0.07 unknown [Populus trichocarpa]
25	gil118487000	29	49155	2 (1)	1 (1)	0.07 unknown [Populus trichocarpa]
26	gil110288976	24	180915	2 (1)	1 (1)	0.02 transposon protein, putative, Mutator sub-class [Oryza sativa Japonica Group]

Figura 42: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 5 (gel de poliácridamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	qil255637531	684	34290	36 (27)	8 (6)	1.09 unknown [Glycine max]
1.2	qil225428442	374	33921	17 (13)	4 (4)	0.45 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
1.3	qil224105365	278	34110	14 (10)	4 (4)	0.59 phenylcoumaran benzylic ether reductase 2 [Populus trichocarpa]
1.4	qil7578895	187	34056	12 (10)	3 (3)	0.32 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog F1 [Forsythia x intermedia]
1.5	qil116077986	140	33970	7 (6)	2 (2)	0.32 pterocarpan reductase [Lotus japonicus]
1.6	qil7578899	104	33501	10 (7)	3 (2)	0.21 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH1 [Tsuga heterophylla]
2.1	qil255554865	382	31641	14 (13)	5 (5)	0.65 lactoylglutathione lyase, putative [Ricinus communis]
2.2	qil211906514	156	32609	19 (8)	7 (4)	0.47 lactoylglutathione lyase [Gossypium hirsutum]
3.1	qil224092113	365	40845	15 (14)	4 (4)	0.37 predicted protein [Populus trichocarpa]
3.2	qil217073780	300	29717	18 (16)	5 (5)	0.89 unknown [Medicago truncatula]
3.3	qil255550131	281	36386	15 (14)	4 (4)	0.42 nitrilase and fragile histidine triad fusion protein, putative [Ricinus communis]
4.1	qil211906450	319	42294	23 (16)	8 (8)	0.83 phosphoglycerate kinase [Gossypium hirsutum]
4.2	qil9230771	183	42261	19 (12)	8 (8)	0.83 cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]
5	qil33325957	161	84401	10 (7)	5 (4)	0.21 methionine synthase [Glycine max]
6.1	qil224141539	121	54345	8 (5)	2 (2)	0.12 predicted protein [Populus trichocarpa]
6.2	qil255574183	32	53547	3 (2)	2 (2)	0.13 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative [Ricinus communis]
7.1	qil255642907	117	34801	16 (9)	8 (6)	0.73 unknown [Glycine max]
7.2	qil217072752	85	35009	9 (5)	4 (3)	0.44 unknown [Medicago truncatula]
8.1	qil217072642	77	34979	5 (3)	3 (2)	0.20 unknown [Medicago truncatula]
8.2	qil18404526	61	34948	4 (2)	2 (2)	0.20 NAD(P)-linked oxidoreductase-like protein [Arabidopsis thaliana]
9	qil15221116	74	31965	2 (2)	1 (1)	0.10 lactoylglutathione lyase-like protein [Arabidopsis thaliana]
10	qil147857949	69	47643	4 (3)	1 (1)	0.07 hypothetical protein VITISV_038701 [Vitis vinifera]
11	qil242088611	65	53421	1 (1)	1 (1)	0.06 hypothetical protein SORBIDRAFT_09g026690 [Sorghum bicolor]
12	qil14970841	59	92316	5 (3)	2 (2)	0.07 beta-galactosidase [Fragaria x ananassa]
13	qil255639059	56	24593	1 (1)	1 (1)	0.14 unknown [Glycine max]
14	qil255547636	54	51184	2 (2)	1 (1)	0.06 amino acid binding protein, putative [Ricinus communis]
15	qil109892850	54	1707	2 (1)	1 (1)	2.57 RecName: Full=Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17
16	qil242044154	53	33295	3 (1)	2 (1)	0.10 hypothetical protein SORBIDRAFT_02g018580 [Sorghum bicolor]
17	qil11124572	52	27014	4 (1)	2 (1)	0.12 triosephosphat-isomerase [Triticum aestivum]
18	qil190688728	45	49456	1 (1)	1 (1)	0.07 pectinacetyltransferase family protein [Sorghum bicolor]
19	qil145350548	44	15243	2 (1)	1 (1)	0.22 predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]
20	qil168025026	42	29628	2 (1)	1 (1)	0.11 predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
21	qil118158	37	40596	2 (1)	1 (1)	0.08 RecName: Full=Vignain; AltName: Full=Bean endopeptidase; AltName: Full=Cysteine proteinase; AltName: Full=Sulphydryl-...
22	qil224054972	34	36001	4 (1)	1 (1)	0.09 cinnamoyl CoA reductase-like protein [Populus trichocarpa]
23	qil217073624	34	27929	2 (1)	2 (1)	0.12 unknown [Medicago truncatula]
24	qil9759007	34	64148	1 (1)	1 (1)	0.05 pectin methyltransferase-like protein [Arabidopsis thaliana]
25	qil48773765	33	27441	2 (2)	1 (1)	0.12 triosephosphate isomerase [Glycine max]
26	qil147800072	33	29667	3 (2)	1 (1)	0.11 hypothetical protein VITISV_027797 [Vitis vinifera]
27	qil190613917	32	35126	4 (1)	1 (1)	0.09 putative allergen Pru du 2.04 [Prunus dulcis x Prunus persica]

Figura 43: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 6 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	gil255554865	662	31641	30 (27)	5 (5)	0.82 lactoylglutathione lyase, putative [Ricinus communis]
1.2	gil211906514	612	32609	37 (27)	8 (6)	1.17 lactoylglutathione lyase [Gossypium hirsutum]
1.3	gil15221116	78	31965	6 (2)	2 (2)	0.22 lactoylglutathione lyase-like protein [Arabidopsis thaliana]
2	gil168025026	208	29628	6 (5)	2 (1)	0.24 predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
3.1	gil15219412	174	42162	13 (6)	5 (4)	0.35 phosphoglycerate kinase [Arabidopsis thaliana]
3.2	gil2257598	91	23646	11 (5)	4 (4)	0.70 phosphoglycerate kinase [Robinia pseudoacacia]
4	gil33325957	129	84401	9 (6)	5 (3)	0.12 methionine synthase [Glycine max]
5	gil225445150	93	39550	15 (8)	2 (1)	0.08 PREDICTED: similar to lactoylglutathione lyase, putative / glyoxalase I, putative [Vitis vinifera]
6	gil11124572	93	27014	4 (3)	2 (2)	0.26 triosephosphat-isomerase [Triticum aestivum]
7	gil217072894	71	25544	14 (4)	2 (1)	0.13 unknown [Medicago truncatula]
8	gil217072756	54	28272	8 (3)	3 (1)	0.25 unknown [Medicago truncatula]
9	gil205830697	45	1393	2 (1)	1 (1)	3.07 RecName: Full=Unknown protein 18
10	gil99909	43	54953	2 (1)	1 (1)	0.06 glycinin G3 precursor - soybean
11	gil109892850	42	1707	3 (1)	1 (1)	2.57 RecName: Full=Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17
12	gil14970841	42	92316	7 (2)	2 (2)	0.07 beta-galactosidase [Fragaria x ananassa]
13	gil255642907	38	34801	4 (1)	3 (1)	0.10 unknown [Glycine max]
14	gil48773765	36	27441	3 (2)	1 (1)	0.12 triosephosphate isomerase [Glycine max]
15	gil33772275	33	10931	4 (2)	1 (1)	0.32 dermal glycoprotein precursor [Malus x domestica]
16	gil242068663	28	43653	6 (1)	1 (1)	0.08 hypothetical protein SORBIDRAFT_05g019890 [Sorghum bicolor]
17	gil255637531	26	34290	3 (1)	2 (1)	0.10 unknown [Glycine max]

Figura 44: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 7 (gel de poliacrilamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1	qil11124572	1308	27014	62 (52)	5 (5)	1.26 triosephosphat-isomerase [Triticum aestivum]
1.2	qil77540216	472	27415	36 (27)	8 (8)	2.15 triosephosphate isomerase [Glycine max]
1.3	qil1351274	438	20756	12 (11)	2 (2)	0.57 RecName: Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic; Short=TIM; Short=Triose-phosphate isomerase
1.4	qil225434935	437	27616	14 (12)	4 (3)	0.58 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
1.5	qil15233272	423	27380	17 (13)	4 (4)	0.58 triosephosphate isomerase [Arabidopsis thaliana]
1.6	qil261280336	302	27417	16 (13)	4 (4)	0.99 triosephosphate isomerase-like protein type I [Dimocarpus longan]
1.7	qil136057	226	27244	21 (15)	5 (4)	0.78 RecName: Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic; Short=TIM; Short=Triose-phosphate isomerase
1.8	qil224059488	224	27701	16 (13)	4 (4)	0.57 predicted protein [Populus trichocarpa]
1.9	qil192910674	214	27476	19 (15)	4 (4)	0.77 triose phosphate isomerase cytosolic isoform [Elaeis guineensis]
1.10	qil57283985	186	27411	20 (14)	6 (6)	1.23 triose-phosphate isomerase [Phaseolus vulgaris var. nanus]
1.11	qil118481011	143	27395	53 (12)	5 (5)	0.77 unknown [Populus trichocarpa]
1.12	qil115434516	133	27274	14 (9)	5 (5)	0.78 Os01g0147900 [Oryza sativa Japonica Group]
1.13	qil211906460	100	27472	17 (11)	6 (5)	0.77 triosephosphate isomerase [Gossypium hirsutum]
1.14	qil195608720	94	25217	22 (9)	6 (5)	0.86 triosephosphate isomerase, cytosolic [Zea mays]
1.15	qil38112662	85	27251	12 (4)	4 (3)	0.41 triose phosphate isomerase cytosolic isoform [Solanum chacoense]
1.16	qil115480367	77	32715	9 (6)	3 (2)	0.21 Os09g0535000 [Oryza sativa Japonica Group]
2.1	qil15225693	427	25962	28 (20)	5 (4)	0.83 carboxymethylenebutenolidase [Arabidopsis thaliana]
2.2	qil147809484	375	26438	16 (12)	5 (4)	0.61 hypothetical protein VITISV_041925 [Vitis vinifera]
3	qil255641537	320	29197	9 (8)	4 (3)	0.38 unknown [Glycine max]
4.1	qil211906450	208	42294	8 (7)	7 (6)	0.57 phosphoglycerate kinase [Gossypium hirsutum]
4.2	qil82621108	138	42512	5 (4)	5 (4)	0.35 phosphoglycerate kinase-like [Solanum tuberosum]
5	qil255583536	204	26193	5 (5)	1 (1)	0.27 glutathione S-transferase, putative [Ricinus communis]
6	qil2213425	135	32737	3 (2)	2 (1)	0.10 hypothetical protein [Citrus x paradisi]
7.1	qil294992077	114	25880	7 (5)	5 (3)	0.44 glutathione S-transferase [Caragana korshinskii]
7.2	qil1170781	46	26112	5 (3)	3 (2)	0.27 RecName: Full=Glutathione S-transferase 3
8	qil11385579	77	27071	6 (3)	3 (2)	0.26 In2-1 protein [Glycine max]
9	qil255627415	67	23530	4 (4)	2 (2)	0.30 unknown [Glycine max]
10	qil927575	62	46879	4 (3)	2 (2)	0.15 alpha galactosidase [Glycine max]
11	qil225462618	61	26053	2 (2)	1 (1)	0.27 PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Vitis vinifera]
12	qil303277047	58	22852	5 (2)	1 (1)	0.15 predicted protein [Micromonas pusilla CCMP1545]
13	qil255584168	56	25627	11 (4)	4 (2)	0.44 glutathione S-transferase, putative [Ricinus communis]
14	qil109892850	51	1707	4 (3)	1 (1)	2.57 RecName: Full=Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17
15	qil260447265	46	56798	2 (1)	1 (1)	0.06 flavonoid 3',5'-hydroxylase [Cyclamen persicum]
16	qil308081130	40	87573	3 (1)	1 (1)	0.04 hypothetical protein LOC100501079 [Zea mays]
17	qil168058113	35	19904	2 (1)	1 (1)	0.17 predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
18	qil50509095	29	66466	2 (1)	1 (1)	0.05 unknown protein [Oryza sativa Japonica Group]
19	qil224128079	20	48545	3 (1)	1 (1)	0.07 predicted protein [Populus trichocarpa]
20	qil255076513	19	26483	15 (2)	1 (1)	0.13 adenylate kinase [Micromonas sp. RCC299]
21	qil20042893	19	114438	3 (1)	1 (1)	0.03 Putative copia-type pol polyprotein [Oryza sativa Japonica Group]

Figura 45: Comparação dos fragmentos gerados por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da BANDA 8 (gel de poliácridamida 12% após purificação em coluna de Gel Filtração Superose 6 utilizando FPLC) com banco de dados do NCBI. As proteínas estão organizadas quanto ao *Score*, ou seja, quanto maior o *Score* maior a probabilidade dos fragmentos gerados serem pertencentes àquela proteína ou similares. A proteína realssada pelo retângulo preto faz referência a α -galactosidase.

Figura 46: Análise de 35 sequências de aminoácidos de α -galactosidase de plantas. Grupos identificados por letras estão de acordo com a filogenia: (A – azul escuro) Fabaceae; (B - verde) Rubiaceae; (C - amarelo) Solanaceae; (D - vermelho) Fabaceae; (E – azul claro) Pinaceae; (F – roxo) Poaceae. (•) *Bootstrap* > 95, ou seja, em 95% ou mais das 1000 árvores de relação geradas os ramos marcados com (•) ficaram agrupados como mostrado nesta árvore de relação.

Figura 47: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) dos oligossacarídeos produto da hidrólise do galactomanano a 1% de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 0,005U, 0,05U e 1U (Experimento I). (I) Controle (galactomanano a 1% sem enzima); (II) Controle (galactomanano a 1% com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®); (III) Controle (galactomanano a 1% com celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme®)); (IV) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,005U; (V) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 0,05U; (VI) perfil de oligossacarídeos formados após ação da α -galactosidase sobre prévia hidrólise com endo- β -mananase a 1U; (VII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,005U de endo- β -mananase; (VIII) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 0,05U de endo- β -mananase; (IX) comparação dos perfis de oligossacarídeos formados no *Experimento I* e *Experimento II* na concentração de 1U de endo- β -mananase. (A) Manobiose (M_2); (B) Manotriose (M_3) e/ou trissacarídeo G^1M_2 ; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos (possíveis oligossacarídeos presentes: $G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$); (K-L) octassacarídeos e nonassacarídeos sem ramificação; (M) oligossacarídeos >10 resíduos de manose (possivelmente resultado da desramificação do pico I). Os oligossacarídeos identificados A-M são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.

Figura 48: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA- 100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -

mananase (Megazyme®) a 1U com acréscimo ou não da α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®). (I) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com endo- β -mananase a 1U; (II) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% com endo- β -mananase a 1U/mL e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (III) perfil de oligossacarídeos formados na hidrólise do galactomanano a 1% somente com α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (IV) Controle (galactomanano sem enzima). (Gal) Galactose; (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3) e/ou G^1M_2 ; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$; $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios

Figura 49: Cromatogramas gerados por HPAEC-PAD, utilizando coluna PA-100, da análise dos oligossacarídeos, produto da hidrólise enzimática do galactomanano de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers com endo- β -mananase (Megazyme®) a 0,005U e 1U e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL. (I) Galactomanano a 1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (II) Galactomanano a 0,1%, 0,005U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme®) a 0,5U/mL; (III) Galactomanano a 1%, 1U de

endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL; (IV Galactomanano a 0,1%, 1U de endo- β -mananase e α -galactosidase comercial de *Cyamopsis tetragonoloba* (Megazyme[®]) a 0,5U/mL. (A) manobiose (M_2); (B) manotriose (M_3) e/ou trissacarídeo G^1M_2 ; (C) tetrassacarídeos (manotetraose – M_4 e/ou G^1M_3); (D) pentassacarídeos (manopentose – M_5 e/ou G^1M_3 e/ou G^3M_4); (E) hexassacarídeos (manohexose – M_6 e/ou $G^{1,3}M_4$ e/ou G^4M_5 e/ou G^3M_5); (F) heptassacarídeos (manoheptose – M_7 e/ou $G^{3,4}M_5$); (G-I) oligossacarídeos >8 resíduos ($G^{1,3,4}M_5$; $G^{4,5}M_6$, $G^{3,4}M_6$; $G^{3,4,5}M_6$; $G^{1,4,5}M_6$; $G^{1,3,4}M_6$ e/ou $G^{4,5}M_7$). Os oligossacarídeos identificados A-I são denominados oligossacarídeos F1; os oligossacarídeos restantes são identificados como F2, quanto combinação aos pares, e F3, quando combinação aos trios.