

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO FRANCISCO BENTO

**ASPECTOS TAXÔNICOS DE POLISSACARÍDEOS DE ENDOSPERMA
DE LEGUMINOSAS**

CURITIBA

2008

JOÃO FRANCISCO BENTO

**ASPECTOS TAXÔNICOS DE POLISSACARÍDEOS DE ENDOSPERMA
DE LEGUMINOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

Co-orientador: Prof Dr Leonardo Magalhães Cruz

CURITIBA

2008

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Sérgio (*in memoriam*), e minha mãe, Maria, que sempre me estimularam, e deram o melhor de si para que eu pudesse crescer e por acreditarem em mim.

À minha irmã, Raquel, que, apesar de ser mais nova, é o meu porto-seguro e a maior alegria na minha vida.

À minha orientadora, Carmen, pela ajuda constante, pela troca de idéias, pela paciência, por ser um modelo de dedicação.

Ao meu co-orientador, Leonardo, pela extrema paciência que teve ao iniciar um aluno de carboidratos no mundo da biologia molecular. Por sempre estar disponível para esclarecimentos e por ser uma pessoa sempre agradável.

Aos membros da banca examinadora, pelos comentários e correções que foram extremamente valiosos para este trabalho.

À Professora Fany pelo apoio neste trabalho e entusiasmo constante.

À Professora Joana pela tranquilidade que transmite, pelo companheirismo e animação.

Ao Professor Irineu, do Departamento de Física desta Universidade, pelo auxílio nas análises de difração de raios X e pelo interesse constante.

Ao Dr. Sérgio Miana de Faria (EMBRAPA Agrobiologia), Prof. Dr. Renato Moreira e pelo Sr. José Aparecido Donizeti Carlos (Piraí Sementes), pela doação das sementes de *Sesbania virgata*, *Crotalaria juncea* e *Adenantha pavonina*, respectivamente.

A Nana, minha melhor amiga. O maior presente que posso ter é sua amizade. É imenso o carinho que tenho por você. Você é a pessoa que mais me entende. Podemos não ser irmãos de sangue, mas somos irmãos espirituais. Sempre

estaremos ligados, pois nossa amizade é eterna. E, além disso, sou padrinho do afilhado mais charmoso do mundo.

A Karina, minha amiga desde o Jardim III, pela amizade incondicional, pelas conversas, por estar sempre presente.

A Livy por ser a lingüista mais legal que existe. Posso dizer que ser seu amigo foi uma das melhores coisas que me ocorreram (So grrrrrrreattt!!!!!!).

A Mariana que apesar de estar, agora, longe, é inesquecível.

A Patricia e Kleber, grandes amigos da época da faculdade até hoje. Vocês foram e são essenciais.

A Carol pela amizade, pelas discussões dos filmes e, é claro, pela maldade.

Aos colegas do laboratório 259: Heide, Ana, Eneida, Meire, Marília, Larry, Ricardo, Andréa, Patrícia, Rhayla, Rafael. Obrigado pelas conversas e risadas.

A Ju Cassol, uma pessoa mais que especial que possui uma bondade enorme e quem admiro muito. A Lu, Ana Helena, Graci e Elaine, pessoas boníssimas que tive o prazer de conhecer melhor durante o mestrado.

Aos colegas de mestrado, em especial Lúcia, Larissa, Fhernanda, Michele, por serem colegas ótimos e que juntos compartilhamos todas as alegrias e tristezas nesta caminhada.

A Andréia primeiramente pelas análises de HPSEC-MALLS/RI, mas, e principalmente, por ser uma grande amiga que me apresentou uma nova maneira de ver a vida e por tudo que compartilhamos: livros, músicas, james e muitas histórias.

A Rosane pelas inúmeras análises de GLC e GLC-MS.

A quem diretamente ou indiretamente contribui para este trabalho e não tenha sido mencionado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Tudo vale a pena se a alma não é pequena.

Fernando Pessoa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL.....	19
FIGURA 2 - FLORES E SEMENTES DE <i>Cassia fastuosa</i>	38
FIGURA 3 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Delonix regia</i>	39
FIGURA 4 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Schizolobium amazonicum</i>	40
FIGURA 5 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Schizolobium parahybae</i>	41
FIGURA 6 - SEMENTES E FLOR DE <i>Adenantha pavonina</i>	42
FIGURA 7 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Leucaena leucocephala</i>	43
FIGURA 8 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Crotalaria juncea</i>	45
FIGURA 9 - ASPECTO GERAL E SEMENTES DE <i>Sesbania virgata</i>	46
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS ENDOSPERMAS DAS SEMENTES DE LEGUMINOSAS	50
FIGURA 11 - ESQUEMA DE ANELAMENTO DOS PRIMERS “e” (FORWARD) E “f” (REVERSE)	61
FIGURA 12 - PERFIS DE ELUIÇÃO PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DO ENDOSPERMA DE <i>Cassia fastuosa</i> POR HPSEC-RI.....	69
FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA MANANA DE <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i> EM URÉIA 50% (D ₂ O).....	71
FIGURA 14 - GRÁFICO DE ZIMM PARA A MANANA DE <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i>	73
FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA DO ENDOSPERMA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i>	76
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA GALACTOMANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> EM D ₂ O	78

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA MANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> EM URÉIA 50% (D ₂ O)	81
FIGURA 18 - GRÁFICO DE ZIMM PARA A MANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i>	82
FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA DO ENDOSPERMA DE <i>Adenanthera pavonina</i> E <i>Leucaena leucocephala</i>	86
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA GALACTOMANANA DE <i>Adenanthera pavonina</i> EM D ₂ O	88
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA CELULOSE DE <i>Leucaena leucocephala</i> EM SOLVENTE S1	90
FIGURA 22 - PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X OBTIDO PARA OS RESÍDUOS FINAIS INSOLÚVEIS ISOLADOS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE <i>Adenanthera pavonina</i> , <i>Cassia fastuosa</i> , <i>Crotalaria juncea</i> , <i>Delonix regia</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> E <i>Sesbania virgata</i>	91
FIGURA 23- PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE <i>Schizolobium amazonicum</i> E <i>Schizolobium parahybae</i>	94
FIGURA 24 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DA REGIÃO INTERGÊNICA DO GENE <i>trnL-trnF</i>	95
FIGURA 25 - ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A RELAÇÃO DE <i>Schizolobium amazonicum</i> COM ESPÉCIES PRÓXIMAS.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DA NOMENCLATURA DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.....	51
TABELA 2 - RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE, E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i> PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA CAESALPINIOIDEAE	65
TABELA 3 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA MANANA DE <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i> NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS	70
TABELA 4 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- ¹³ C PARA A MANANA DE <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i>	71
TABELA 5 - RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> PERTENCENTES À SUBFAMILIA FABOIDEAE.....	74
TABELA 6 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS	77
TABELA 7 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- ¹³ C PARA A GALACTOMANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i>	79
TABELA 8 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA MANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS	80

TABELA 9 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- ¹³ C PARA A MANANA DE <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i>	80
TABELA 10 - RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE <i>Adenantha pavonina</i> E <i>Leucaena leucocephala</i> PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE	84
TABELA 11 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>Adenantha pavonina</i> NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS	87
TABELA 12 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- ¹³ C PARA A GALACTOMANANA DE <i>Leucaena leucocephala</i>	88
TABELA 13 - RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK PELO PROGRAMA BLAST	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

CTAB	N-cetil-N,N,N-trimetil-amôniobrometo
D ₂ O	Óxido de deutério (água deuterada)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dn/dc	Variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
GLC-MS	Cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa
GLC	Cromatografia líquido gasosa
EtOH	Álcool etílico (etanol)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HPSEC-MALLS/RI	Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão acoplada a espalhamento laser de multiângulos
IPEF	Instituto de Pesquisas Florestais
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mw	Massa molar ponderal média
Na ₂ EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaN ₃	Azida de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
RI	Índice de refração
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
rpm	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Hidroximetil-aminometano

RESUMO

Galactomananas foram obtidas do endosperma de sementes pertencendo as diferentes subfamílias de Leguminosae a partir de extrações aquosas seqüenciais em diferentes temperaturas (4, 25 and 60°C) e extrações sucessivas com NaOH 2M e NaOH 4M. As espécies da subfamília Caesalpinioideae, *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, deram origem a galactomananas com valores crescentes de relação manose:galactose, variando de 3,0:1 até 10:1 e 3,0:1 até 6,8:1, respectivamente. Esta alteração é acompanhada pelos valores de rotação óptica específica das galactomananas que variam de + 28,4° para - 31,7° para *C. fastuosa* e de + 36,9° para - 9,0° para as galactomananas de *D. regia*. O resíduo final das extrações obtido após remoção das galactomananas apresentou 95,1% de manose, sendo considerados mananas puras. A análise de metilação deste polissacarídeo apresentou como derivado principal 2,3,6-Me₃-Man . A estrutura das mananas foi confirmada por RMN-¹³C. A massa molar das mananas de *C. fastuosa* e *D. regia*, determinada pelo método de Zimm, foi de 1,263 x 10⁶ e 7,11 x 10⁶ g/mol, respectivamente. A relação manose:galactose das galactomananas de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, pertencentes a subfamília Faboideae, foi de 2,0:1 e 1,5:1, respectivamente, e manteve-se constante para todas as frações obtidas. As galactomananas obtidas na primeira extração aquosa foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI e indicaram que ambas são homogêneas, com valores de *Mw* de 2,07x10⁵ g/mol para *C. juncea* e 7,68x10⁵ g/mol para *S. virgata*. As análises de metilação e RMN-¹³C mostraram uma estrutura convencional para as galactomananas: uma cadeia principal de manose ligada β-(1→4) tendo ramificações laterais de galactose unidas por ligações α-(1→6). O resíduo final obtidos destas espécies apresentou manose como monossacarídeo principal. Análises de metilação e RMN-¹³C indicaram a presença de unidades de manose em ligação β (1→4), confirmando a presença de uma manana pura. A massa molar das mananas de *C. juncea* e *S. virgata* foi de 2,68 x 10⁶ e 7,2 x 10⁶ g/mol, respectivamente. Das espécies da subfamília Mimosoideae, *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*, foram obtidas galactomananas que apresentaram relação manose:galactose de 1,6:1 para ambas, independente das condições de extração. A análise de HPSEC-MALLS/RI das galactomananas obtidas da primeira extração aquosa mostrou que as frações são homogêneas com valores de *Mw* de 2,23 x 10⁶ e 1,35 x 10⁵ g/mol para *A. pavonina* e *L. leucocephala*, respectivamente. Os resíduos finais das extrações foram analisados e mostraram a presença de glucose como componente majoritário. A análise de RMN-¹³C indicou a presença de celulose. Análise de difração de raios-X confirmou a identidade dos resíduos. A partir da análise da região intergênica *trnL-trnF* sugere-se que *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* são de fato, espécies distintas.

ABSTRACT

Galactomannans were obtained from the endosperm of seeds belonging to the different subfamilies of Leguminosae by sequential aqueous extractions at increasing temperatures (4, 25 and 60°C) and successive extractions with 2M NaOH and 4M NaOH. The species from the Caesalpinioideae subfamily, *Cassia fastuosa* and *Delonix regia*, gave rise to galactomannans with increasing values of mannose:galactose ratio, varying from 3.0:1 to 10:1 and from 3.0:1 to 6.8:1, respectively. These changes were accompanied by specific optical rotations of galactomannans, that varied from + 28.4° to – 31.7° for that of *C. fastuosa* and from + 36.9° to – 9.0° for *D. regia*. The final residue from the extractions contained 95.1% of mannose, a content being considered to be that of a pure mannan. Methylation analysis of this mannan showed 2,3,6-Me₃-Man as major derivative and its structure was confirmed by ¹³C-NMR. The molar mass from the mannans from *C. fastuosa* and *D. regia*, as determined by Zimm Plot, was 1.263 x 10⁶ and 7.11 x 10⁶ g/mol, respectively. The mannose:galactose ratios from the galactomannans from *Crotalaria juncea* and *Sesbania virgata*, belonging to the Faboideae subfamily, were 2.0:1 and 1.5:1, respectively, and was constant for all isolated fractions. The galactomannans obtained from the first aqueous extraction were analysed by HPSEC-MALLS/RI and indicated that both were homogeneous, and the *M_w* values for the galactomannans were 2.07x10⁵ g/mol for *C. juncea* and 7.68x10⁵ g/mol for *S. virgata*. Methylation analysis and the ¹³C-NMR spectra showed a conventional structure for the galactomannans: namely a (1→4)-linked mannosyl main chain substituted at O-6 by α-galactosyl single units. The final residue obtained for these species presented mannose as major monosaccharide. Methylation analysis and ¹³C-NMR indicated the presence of mannose units linked β (1→4), confirming the presence of a pure mannan. The molar mass from the mannans of *C. juncea* and *S. virgata* was 2.68 x 10⁶ e 7.2 x 10⁶ g/mol, respectively. The galactomannans obtained from the species from the Mimosoideae subfamily, *Adenanthera pavonina* and *Leucaena leucocephala*, had a mannose:galactose ratio of 1.6:1 for both species, independently on the extractions conditions. The HPSEC-MALLS/RI analysis from the galactomannans obtained from the first aqueous extraction showed that these fractions are homogenous and presented *M_w* values of 2.23 x 10⁶ and 1.35 x 10⁵ g/mol for *A. pavonina* e *L. leucocephala*, respectively. The final residues from the extractions contained glucose as their major component. ¹³C-NMR analysis indicated the presence of cellulose. X-ray diffraction analysis confirmed the identity of the residues. From analysis of the intergenic spacer *trnL-trnF* it is suggested that *Schizolobium amazonicum* and *Schizolobium parahybae* are not the same specie.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 GALACTOMANANAS.....	18
1.2 MANANAS	29
1.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE	32
1.3.1 Taxonomia de leguminosas	33
1.4 ESPÉCIES UTILIZADAS NESTE TRABALHO	37
1.4.1 Subfamília Caesalpinioideae	37
1.4.1.1 <i>Cassia fastuosa</i>	37
1.4.1.2 <i>Delonix regia</i>	38
1.4.1.3 <i>Schizolobium amazonicum</i>	39
1.4.1.4 <i>Schizolobium parahybae</i>	40
1.4.2 Subfamília Mimosoideae.....	41
1.4.2.1 <i>Adenantha pavonina</i>	42
1.4.2.2 <i>Leucaena leucocephala</i>	43
1.4.3 Subfamília Faboideae	44
1.4.3.1 <i>Crotalaria juncea</i>	44
1.4.3.2 <i>Sesbania virgata</i>	45
2. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 MÉTODOS GERAIS	48
3.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES.....	48
3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	49
3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	51
3.5 POLARIMETRIA	53
3.6 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA ACOPLADA A DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LASER MULTIÂNGULOS (HPSEC-MALLS/RI)	53

3.6.1	Determinação do <i>dn/dc</i> e cálculo da massa molar das galactomananas	54
3.7	DETERMINAÇÃO DO <i>dn/dc</i> E CÁLCULO DA MASSA MOLAR DAS MANANAS	54
3.8	ANÁLISES DE METILAÇÃO.....	55
3.8.1	Metilação das galactomananas	55
3.8.2	Metilação das mananas	56
3.9	ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	57
3.10	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	58
3.11	GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	58
3.12	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	59
3.13	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA DO GENE <i>trnL-trnF</i>	60
3.14	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS.....	61
3.15	PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO	62
3.16	SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS	62
3.17	ANÁLISE DAS SEQUENCIAS.....	63
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
4.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES <i>Cassia fastuosa</i> E <i>Delonix regia</i> PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA CAESALPINIOIDEAE	64
4.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES <i>Crotalaria juncea</i> E <i>Sesbania virgata</i> PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA FABOIDEAE	73
4.3	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES <i>Adenanthera pavonina</i> E <i>Leucaena leucocephala</i> PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE.....	83

4.4	TAXONOMIA DE <i>Schizolobium amazonicum</i> E <i>Schizolobium parahybae</i>	94
5.	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE	113