

GIOVANNA BEZERRA DA SILVA

# **Análise comparada das hemiceluloses de parede celular de frondes de samambaias e licófitas**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração em Plantas Vasculares.

SÃO PAULO  
2009

GIOVANNA BEZERRA DA SILVA

## **Análise comparada das hemiceluloses de parede celular de frondes de samambaias e licófitas**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração em Plantas Vasculares.

ORIENTADOR: MARCOS SILVEIRA BUCKERIDGE  
CO-ORIENTADOR: JEFFERSON PRADO

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS:</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMO:</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT:</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>7</b>
A PAREDE CELULAR: .....	7
LICÓFITAS E SAMAMBAIAS: .....	11
PAREDES CELULARES, TAXONOMIA E EVOLUÇÃO: .....	12
<b>OBJETIVOS:</b> .....	<b>18</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS:</b> .....	<b>18</b>
<b>MATERIAL VEGETAL:</b> .....	18
<b>FRACIONAMENTO DA PAREDE CELULAR:</b> .....	22
<i>Extração de açúcares solúveis:</i> .....	22
<i>Extração de amido:</i> .....	23
<i>Extração de pectinas:</i> .....	23
<i>Fracionamento da parede celular com NaOH:</i> .....	23
<i>Hidrólise ácida:</i> .....	23
<i>Análise de monossacarídeos em HPLC:</i> .....	24
<b>METILAÇÃO:</b> .....	24
<b>ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF:</b> .....	25
<b>ANÁLISE DE AGRUPAMENTO:</b> .....	26
<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO:</b> .....	<b>26</b>
<b>PARTE I- ANÁLISES DA PAREDE CELULAR DE 17 ESPÉCIES SELECIONADAS:</b> .....	26
<i>Análises de monossacarídeos:</i> .....	29
<i>Análise estrutural dos polissacarídeos de parede celular de <i>Adiantum raddianum</i>:</i> .....	33
<b>PARTE II - ANÁLISES DE XILOGLUCANOS DE 67 ESPÉCIES DE SAMAMBAIAS E LICÓFITAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF:</b> .....	36
<i>Interação entre as hemiceluloses na parede celular e o acesso das enzimas aos polímeros:</i> .....	49
<i>Análises por regiões de origem da coleta:</i> .....	52
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES:</b> .....	<b>62</b>
<b>MANANOS E XILOGLUCANOS NAS PAREDES CELULARES DE SAMAMBAIAS E LICÓFITAS:</b> .....	62
<b>ANÁLISES POR AGRUPAMENTOS UTILIZANDO XILOGLUCANOS:</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS:</b> .....	<b>72</b>

## **Agradecimentos:**

À minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida, pelo apoio e compreensão desde o primeiro dia de faculdade, até o final dessa jornada acadêmica.

Ao meu noivo, João Henrique, por estar ao meu lado me apoiando e me ajudando o tempo todo, tentando entender essa loucura que é a ciência.

Aos meus amigos, Mari, Marcelo, Andréa, Pinho e Aline que me ajudaram, me apoiaram, tiraram dúvidas ou simplesmente me ouviram nos momentos mais difíceis.

A alguns amigos do grupo que sempre estiveram próximos dando grande apoio: Bruna, Adriana Yepes, Maraba, Ivan, Leila, Adriana Grandis, Amanda, Paloma e Wanderley.

A todos da seção de Fisiologia e bioquímica da USP e do Botânico, pela amizade e companheirismo, especialmente a Ana Maria por ter me ajudado na difícil transição para USP. E também a todos da secretaria de pós-graduação.

Aos meus orientadores Marcos S. Buckeridge e Jefferson Prado e ao meu coorientador Marco Aurélio Tiné, pela oportunidade e credibilidade, pelo apoio e orientação.

Ao professor Gregório Ceccantini pelo auxílio na coleta das plantas.

Ao Augusto Tomba, pela grande ajuda nas análises de agrupamento e ao professor Sérgio Tadeu Meirelles pela ajuda na interpretação desses dados.

A todos os funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica pela ajuda e pela amizade que surgiu e que tornou mais agradável a rotina do laboratório.

À chefia do departamento pelo suporte.

Ao Prof. Marcus Pauly, pelas análises de Maldi-Tof, e a todos que conheci e que me ajudaram na Michigan State University.

À Fapesp pelo suporte financeiro.

## Resumo:

Todas as células vegetais possuem uma parede celular, cujos componentes principais são: celulose, hemiceluloses e pectinas. A caracterização destes polímeros mostra que suas estruturas são conservadas em Gimnospermae e Angiospermae. O objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente os polissacarídeos da parede celular de samambaias e licófitas e buscar compreender o padrão de variação do xiloglucano nas plantas coletadas de acordo com a filogenia mais recente para o grupo. Foram coletadas frondes estéreis de sessenta e sete espécies de samambaias e licófitas em seis locais diferentes de coleta. Quinhentos miligramas de pó foram extraídos com etanol, oxalato de amônio, NaOH 0,1M, 1M, 4M e 8M. As frações 4M e 8M foram hidrolisadas com ácido sulfúrico e a composição de monossacarídeos determinada por HPAEC-PAD (DIONEX). Com uma alíquota da fração NaOH 4M foi realizada uma metilação de uma das espécies coletadas, em ambos os experimentos foram observadas porcentagens significativas de manoses ligadas através dos carbonos 1 e 4 sugerindo que uma das hemiceluloses presentes na parede celular dessas plantas seja um  $\beta$ -1,4-manano. Quando as paredes celulares intactas das espécies estudadas foram submetidas à hidrólise com xiloglucano endoglucanase, não houve liberação de oligossacarídeos mesmo de parede de *Adiantum raddianum* que apresentou comprovadamente xiloglucano. No entanto, oligossacarídeos de xiloglucano foram liberados com celulase de *Trichoderma*. Com base nos dados, sugere-se que mananos e xiloglucanos interajam entre si na parede celular de samambaias e licófitas, alterando o padrão de ação das enzimas. Além dessa análise, foram utilizadas 10 mg do pó das frondes estéreis para realização da análise de Maldi-Tof. O material foi previamente lavado com etanol e clorofórmio:metanol (1:1) e submetido à digestão com celulase. Foi possível identificar picos correspondentes aos oligossacarídeos de xiloglucano, além de outros picos que não puderam ser identificados e que indicam a presença de outros polissacarídeos. A partir dos resultados obtidos com a análise dos oligossacarídeos de xiloglucano através do Maldi-Tof, foi feita uma matriz de correlações entre as sessenta e sete espécies além do padrão comparativo, jatobá, para obtenção de um dendrograma que permitiu fazer uma análise de agrupamento das espécies estudadas. Esses resultados mostram a presença de seis grandes grupos, de acordo com a presença ou ausência de oligossacarídeos em comum. Esses dados não são consistentes com a filogenia e por este motivo concluiu-se que os oligossacarídeos de xiloglucano não são bons marcadores taxonômicos, nos níveis hierárquicos de classe, ordem e famílias.

## **Abstract:**

All plant cells are surrounded by a cell wall, whose main components are cellulose, hemicelluloses and pectins. The characterization of these polymers shows that their structure is conserved in Gimnospermae and Angiospermae. The objective of this work is to characterize composition of the cell walls of ferns, and try to understand the structure of xyloglucan in plants collected following the most recent phylogeny proposed for the group. Non reproductive leaves were collected from 67 species in 6 different locations. Five hundred milligrams of powder from these materials, was sequentially extracted with ethanol, ammonium oxalate, NaOH 0.1M, 1M, 4M and 8M, the 4M and 8M fractions were hydrolyzed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the monosaccharide composition was determined by HPAEC-PAD (DIONEX), with the 4M fraction a linkage analysis was performed on one of the species. Both experiments presented significant percentage of mannose, suggesting that one of the hemicelluloses present in the cell wall is a mannan. When intact walls of ferns and licophytes were subjected to hydrolysis with a xyloglucan specific enzyme (XEG- xyloglucan endoglucosidase) no release of oligosaccharides was observed. However they were released after treatment with *Trichoderma* sp. cellulase, a less specific enzyme that can release mannan oligosaccharides. These results suggest that xyloglucan and mannan are probably interactive in the cell wall composite, which profits the pattern of action of these enzymes. In another experiment 10 mg of milled leaves were used to perform the Maldi-Tof analyses. This material was washed with ethanol and chloroform:methanol (1:1). The material was subjected to digestion with *Trichoderma* cellulase (Megazyme). Xyloglucan oligosaccharides were identified in these samples and the composition of monosaccharides showed that other polysaccharides were present. From the results obtained with the xyloglucan analyses using Maldi-Tof, a dendrogram was assembled with data from 67 species plus *Hymenaea courbaril* (standard) which made possible the grouping analyses of all studied species. These results show the presence of six groups, according with the presence or absence of oligosaccharides. These data do not corroborate the phylogeny. Thus, xyloglucan seems not to be markers for taxonomy of ferns and licophytes.

## **Introdução:**

### A Parede Celular:

Praticamente todas as células vegetais possuem uma parede celular. Esta estrutura é muito dinâmica e complexa e está relacionada a diversos processos fisiológicos como dar forma e tamanho às células, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar sobre o transporte intercelular, participar da sinalização e do reconhecimento entre células, armazenar compostos de reserva e moléculas reguladoras e sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos celulares, além de participar dos mecanismos de proteção contra microorganismos (Darvill *et al.* 1992, Aldington & Fry 1993).

A composição dos monossacarídeos da parede é relativamente constante (Fry 1988; Brett & Waldron 1996; Mc Neil *et al.* 1998). Eles são organizados em polissacarídeos como a celulose, que é o principal composto das paredes celulares de plantas superiores. A celulose é um polímero linear constituído por unidades de glucose, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1→4). As hemiceluloses são polímeros que interagem fortemente com a celulose. Dentre elas, as mais comumente encontradas são os mananos, na maioria das vezes em tecidos de reserva, e xiloglucanos, em paredes celulares primárias e também em tecidos de reserva.

Os xiloglucanos são polissacarídeos de reserva ou de parede primária (a parede que se forma logo após a divisão celular e ainda não se diferenciou em outro tipo de parede como as de tecidos vasculares ou de reserva), que assim como a celulose, apresentam cadeia principal composta de glucoses unidas entre si por ligações do tipo  $\beta$ -(1→4), ramificada com ligações  $\alpha$ -(1→6) por resíduos de xilose, ou ainda oligossacarídeos que contêm uma galactose ligada à xilose. Os xiloglucanos de parede primária podem apresentar também resíduos de fucose ligados a uma das galactoses. Porém, a fucosilação não ocorre no polissacarídeo de reserva (Buckeridge *et al.* 2000 b). O xiloglucano apresenta ramificações em pontos específicos com a xilose  $\alpha$ -(1→6), a qual se liga com a galactose  $\beta$ -(1→2), e algumas galactoses no caso da parede primária estão ligadas à fucose através de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→6). As ramificações com xilose são regulares, sendo que na maioria dos xiloglucanos uma a cada quatro ou cinco glucoses não apresenta ramificações (Buckeridge *et al.* 2008 *in ver* anexo 4). Vale salientar que estes são os únicos pontos na cadeia principal dos xiloglucanos que são acessíveis ao ataque de endo- $\beta$ -glucanases, como as celulasas.

Os mananos puros são polímeros constituídos por manoses, unidas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1→4). Os mananos podem ser classificados como os galactomananos, que possuem ramificações de galactose, ligadas à cadeia principal através de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→6), ou ainda os galactoglucomananos, que possuem a cadeia principal formada por manoses intercaladas com glucose (geralmente duas moléculas de glucose para uma de manose), ligadas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1→4), e ramificações de galactose com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→6).

A razão manose:galactose (que indica o grau de ramificação do galactomanano) e o padrão de distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose variam de espécie para espécie em Angiospermas, sendo que estes são fatores que podem apresentar relevância para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos (Reid & Meier 1970; Buckeridge & Dietrich 1990; Buckeridge *et al.* 1995).

Os glucuronoarabinoxilanos (GAX) são polímeros ácidos e possuem uma cadeia de xiloses unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1→4), ramificados com arabinose e com ácido galacturônico. São característicos de monocotiledôneas e aparecem também na parede celular de tecido vascular (xilema) (Buckeridge *et al.* 2008, anexo 4).

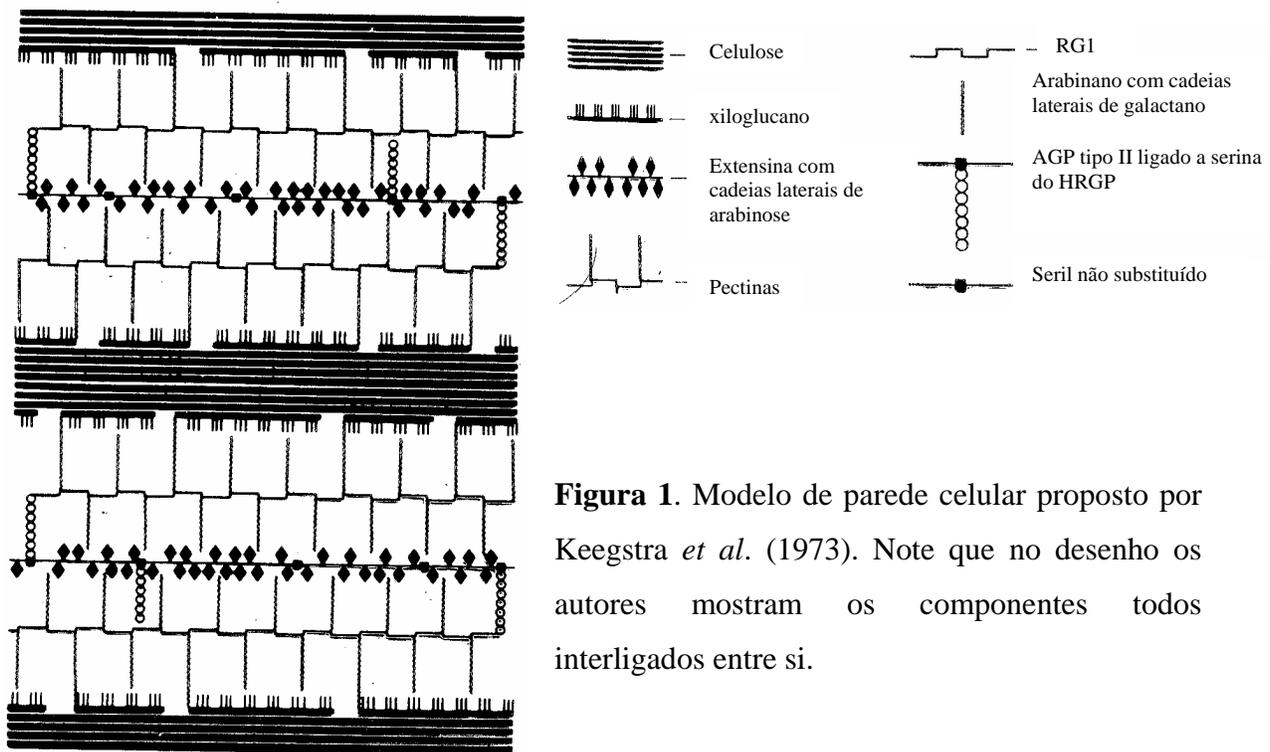
Outro grupo de polissacarídeos da parede celular é o das pectinas, que é constituído de polímeros menos fortemente ligados à parede que as hemiceluloses e têm um caráter ácido. Além desses polissacarídeos, a parede celular possui aproximadamente 10% de sua massa na forma de proteínas, que podem ter a função estrutural (extensina, por exemplo) ou enzimática e estão relacionadas com o metabolismo de polissacarídeos.

Em eudicotiledôneas e monocotiledôneas a composição da parede é relativamente constante. As gramíneas (Poaceae) contêm os mesmos resíduos de monossacarídeos, mas tendem a ter mais xilose e menos galactose, arabinose e fucose. Elas possuem duas importantes modificações evolutivas. A primeira é a ocorrência dos glucuronoarabinoxilanos, que apresentam ramificações com compostos fenólicos, os quais interagem com as microfibrilas de celulose, compondo um dos domínios da parede. A segunda, característica das Poales, é a presença de glucanos de cadeia mista do tipo  $\beta$ -(1→3),(1→4), que aumentam durante alguns estágios específicos do desenvolvimento (Carpita 1993), e ocorrem em toda a planta (Smith & Harris 1999, Buckeridge *et al.* 2004).

As gimnospermas tendem a ter paredes mais ricas em manose. As principais hemiceluloses encontradas em parede celular secundária deste grupo de plantas são os

galactomananos e os arabinoxilanos ácidos (Bochicchio 2003). Em um trabalho realizado com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, uma gimnosperma, também foram encontradas quantidades significativas de xiloglucano na parede primária, sendo as pectinas mais comuns os homogalacturonanos. A parede celular de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. tem características típicas das paredes tipo I (Bochicchio 2003). Acebes, Moral & Zarra (1993) investigaram um xiloglucano de hipocótilos de *Pinus pinaster* e sugeriram que essa hemicelulose é mais próxima daquelas relatadas em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas.

O primeiro modelo sugerindo um arranjo tridimensional desses polímeros foi proposto pelo grupo de Peter Albersheim, em 1973 (Keesgtra *et al.* 1973) (Figura 1). Neste modelo, a parede celular foi definida como uma rede de polímeros interligados covalentemente, formando uma rede rígida que manteria as propriedades rígidas da parede celular. Nele, as microfibrilas de celulose estariam em forte interação com o xiloglucano. Já se sabia naquela época que estes polímeros eram similares à celulose, mas com cadeias laterais de xilose, galactose e/ou fucose. No modelo de 1973, as proteínas foram colocadas como o centro de rigidez da parede e supunha-se que a elas, todos os outros polímeros estariam ligados direta ou indiretamente, através de ligações covalentes. O modelo permitiu aos fisiologistas inferirem explicações para o processo de expansão celular e crescimento.



**Figura 1.** Modelo de parede celular proposto por Keesgtra *et al.* (1973). Note que no desenho os autores mostram os componentes todos interligados entre si.

Nos 20 anos que se seguiram, vários autores buscaram encontrar as ligações covalentes preconizadas pelo modelo, mas não foram encontradas evidências convincentes. Por este motivo, o modelo de 1973 não sobreviveu, e em 1991, McCann & Roberts propuseram um novo modelo (Figura 2). Nele, os autores aboliram a idéia de ligações covalentes e sugeriram que a parede seria formada por três domínios estruturais independentes: o domínio celulose-hemicelulose, o domínio das pectinas e o das proteínas. A idéia principal é que o domínio celulose-hemicelulose estaria embebido em uma matriz pectínica flexível. Alguns autores franceses sugeriram que a parede celular seria uma superestrutura com propriedades de um cristal líquido (Roland & Vian 1979, Buckeridge, 2006). Nesse caso, grande parte das propriedades da parede seriam resultantes da orientação espacial dos polímeros. Para chegar a este modelo McCann e Roberts (1991) utilizaram um tipo de microscopia em que um contramolde de metal é feito sobre a superfície de um bloco fraturado longitudinalmente através da parede celular. Os autores trataram os blocos com carbonato de sódio e álcali diluído, e o exame microscópico das amostras assim tratadas demonstrou que as pectinas podiam ser retiradas sem alterar a rede de polímeros formada pela celulose e hemiceluloses. Isso foi usado como evidência de que as pectinas não apresentavam ligações covalentes com o restante dos polímeros da parede celular. Com base nesses e outros experimentos os autores propuseram que a parede seria um compósito descontínuo, formado por três domínios estruturais independentes.

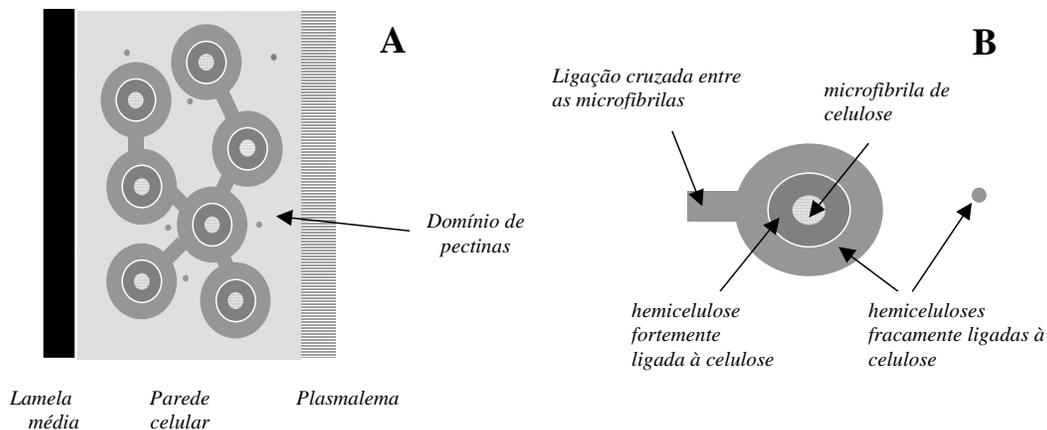


Figura 2. Modelo descontínuo da parede celular desenhado com base nas idéias propostas por McCann & Roberts (1991), em que o domínio celulose-hemicelulose estaria embebido em uma matriz pectínica flexível.

Carpita & Gibeaut (1993) discutiram e aprofundaram a teoria dos três domínios (ou matrizes) da parede celular. Os autores também propuseram que no reino vegetal as paredes poderiam ser divididas em Tipos I e II. A divisão proposta nesse artigo foi baseada principalmente na composição de hemiceluloses e na proporção entre as matrizes. Na parede Tipo I o xiloglucano é a principal hemicelulose e as proporções de celulose, hemicelulose e pectinas seriam de aproximadamente 30% cada, com cerca de 10% de proteínas. A parede do Tipo II seria a parede característica das Poaceae. Esta parede, em contraposição à do tipo I, apresenta um teor bem menor (quase zero em alguns casos) de pectinas e teores igualmente baixos de xiloglucano. Nas paredes do Tipo II a principal hemicelulose é o arabinoxilano e há também outro polissacarídeo chamado de  $\beta$ -glucano ou glucano de ligação mista. Devido a essas diferenças na proporção de polissacarídeos, as gramíneas (Poaceae) contêm os mesmos resíduos de monossacarídeos, mas tendem a ter mais xilose e menos galactose, arabinose e fucose. As gimnospermas tendem a ter paredes mais ricas em manose. As principais hemiceluloses encontradas em parede celular secundárias desse grupo de plantas são os galactomananos e os arabinoxilanos ácidos (Bohicchio 2003).

#### Licófitas e Samambaias:

As plantas vasculares estão divididas em duas grandes linhagens, representadas pelo clado das licófitas e outro que inclui as eufilófitas, sendo este último subdividido em outros dois grandes grupos, as monilófitas e as lignófitas. Acredita-se que esta divisão basal em licófitas e eufilófitas ocorreu na metade do Devoniano, há cerca de 400 milhões de anos, sendo marcada por uma variedade de aspectos morfológicos. Um dos mais relevantes é a presença de células espermáticas multiflageladas nas eufilófitas, em oposição às células espermáticas biflageladas das licófitas, com exceção de *Isoetes* e *Phylloglossum* (Raven *et al.* 2001).

As licófitas e samambaias atuais estão distribuídas nos cladogramas das licófitas e monilófitas. São dois grupos monofiléticos: Lycophyta (Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae) e Samambaias que inclui Psilotales (Psilotaceae), as Equisetales (Equisetaceae), Ophioglossales (Ophioglossaceae), Marattiales (Marattiaceae), Marsileales (Salviniales e Marsileaceae) e Salviniales (Salviniaceae) e as demais samambaias, (Pryer *et al.* 2001).

As samambaias são o primeiro grupo de plantas que conseguiu conquistar efetivamente o ambiente terrestre devido a características como um sistema de fixação e absorção, presença de rizomas; desenvolvimento de um sistema de condução, xilema e floema (neste a deposição de lignina é de grande importância); presença de cutícula, que evita a dessecação excessiva,

presença de estômatos para as trocas gasosas; tecidos fotossintetizantes e esporos. Essas características não surgiram necessariamente nas samambaias pela primeira vez, mas foram essas características que possibilitaram que essas plantas dominassem o ambiente terrestre. A maioria das samambaias e licófitas é homosporada, ou seja, produz apenas um tipo de esporo, que após germinar dá origem a um gametófito bissexuado. O ciclo de vida dessas plantas apresenta uma alternância de gerações (heteromorfas), na qual a geração esporofítica é a fase dominante e a geração gametofítica é nutricionalmente independente da esporofítica (Raven *et al.* 2001).

As samambaias geralmente ocorrem em ambientes úmidos, ou sazonalmente úmidos, na maioria das vezes em regiões tropicais, mas podem ocorrer ocasionalmente nas bordas de desertos e também no ártico (algumas poucas espécies de *Selaginella*) (Judd *et al.* 2002).

#### Paredes celulares, taxonomia e evolução:

Existem relativamente poucos trabalhos que discutem a parede celular do ponto de vista evolutivo. Os principais estudos foram feitos com sementes, que apresentam paredes enriquecidas com um determinado polímero de reserva, o que simplifica sua estrutura. Bailey (1971) notou que algumas leguminosas apresentavam galactomananos nas sementes e suas ramificações pareciam ter um significado taxonômico.

A última avaliação dos galactomananos como marcadores taxonômicos e evolutivos foi apresentada por Buckeridge *et al.* 2000b. Esses autores apresentaram uma separação de subgrupos com base nos dados de Leguminosae que referendam a taxonomia do grupo baseada em dados morfológicos. Espécies menos derivadas (Caesalpinioideae) apresentam galactomananos com menor grau de ramificação com galactose do que espécies mais derivadas em Faboideae. As Mimosoideae formam um grupo distinto das outras duas. Com base nesses dados, Buckeridge *et al.* 2000b, propuseram que as paredes celulares das sementes de Leguminosae teriam sido alteradas por mecanismos de transferência e intensificação de funções nos moldes propostos por Darwin (1865) e posteriormente por Stebbins (1974).

Um trabalho de cunho taxonômico também foi publicado por Mayworm *et al.* (2000), que examinaram polissacarídeos de paredes celulares de sementes de diversas espécies, os autores mostraram que a composição dos polissacarídeos pode ser usada para separar espécies de diferentes subfamílias de Vochysiaceae. Carpita (1996) e Smith & Harris (1999) utilizaram o sistema de Dahlgren (1985) para comparar a composição e estrutura das paredes celulares de monocotiledoneas. Utilizando parâmetros como a presença ou ausência de xiloglucano, de  $\beta$ -

glucanos, proporção de pectinas e também presença ou não de autofluorescência, foi possível mapear os polissacarídeos dos diferentes grupos de monocotiledôneas. Porém, pouco se sabe sobre os fatores seletivos que provocaram as mudanças observadas.

Em relação aos estudos de paredes celulares primárias de plantas superiores, há um número relativamente pequeno de estudos que contemplam a diversidade estrutural e funcional dos polímeros. A maioria do que se sabe é derivada de estudos com plantas de importância econômica, principalmente do ponto de vista do uso em agricultura. Ainda assim, o conhecimento disponível permitiu agrupamentos que vêm possibilitando compreender melhor como a parede celular das plantas foi moldada ao longo da evolução (Bailey, 1971).

Um ponto de vista é que as samambaias e licófitas tornaram-se relativamente menos importantes no planeta devido ao grande sucesso das angiospermas durante o período Cretáceo (cerca de 160 milhões de anos) (Niklas 1997). No entanto, descobertas recentes sugerem que as samambaias atuais são o resultado de uma diversificação mais recente, que ocorreu “à sombra” das angiospermas (Schneider *et al.* 2004). Apesar de possuírem ancestrais comuns no passado longínquo a partir do Devoniano, há 400 milhões de anos, o principal período de diversificação das samambaias e licófitas foi na segunda metade do Cretáceo, a partir de 100 milhões de anos e ocorreu paralelamente à diversificação das angiospermas (Schneider *et al.* 2004).

A maior parcela do conhecimento existente sobre a composição das paredes celulares de plantas vasculares está baseada nos grupos atuais de angiospermas, isto é, presentes no planeta durante os últimos 100 milhões de anos. Perdem-se, com isso, informações importantes relativas ao processo cumulativo que resultou nas paredes celulares das plantas vasculares durante cerca de 470 milhões de anos da história das plantas, durante os quais as samambaias e licófitas foram de grande importância (Niklas 1997 e Schneider *et al.* 2004).

A tabela 1 mostra os principais componentes da parede celular conhecidos. Os componentes foram distribuídos conforme os grandes grupos de organismos e nota-se que em todos eles a celulose está presente. Este parece, portanto, ser um composto essencial para qualquer tipo de parede. O que parece variar são as hemiceluloses e as pectinas. Em plantas superiores, aparentemente, todas as células parecem apresentar algum xiloglucano, mas em monocotiledôneas em proporção bem menor (Carpita, 1996).

Existem apenas alguns estudos com polissacarídeos de tecidos lignificados de espermatófitas e poucos estudos sobre samambaias e licófitas, e briófitas (Bremner e Wilkie 1971, Fry 2003). Fry (2003) realizou um trabalho com algas e briófitas, tratando da evolução da parede primária desses grupos e comparou seus resultados com os obtidos para plantas

vasculares. Ele encontrou xiloglucano, e detectou ácido galacturônico e manose em todas as briófitas analisadas. Em outro trabalho realizado por Fry (2004), foi detectada em algumas algas, briófitas e licófitas a presença de um açúcar incomum, identificado como 3-O-metil-ramnose. Em um estudo feito com *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, uma samambaia, o principal polissacarídeo encontrado foi um galactomanano (Bremner & Wilkie 1971).

Tabela 1. Composição descrita da parede celular de diferentes grupos taxonômicos vegetais.

<b>Grupos de organismos</b>	<b>Principais polissacarídeos encontrados</b>
Bactérias	Celulose, ácido teicoico e lipopolissacarídeos.
Fungos	Celulose, (1-3,1-6) beta-Glucanos, alfa (1,4) mananos, quitina, quitosano.
Algas	Celulose, galactanos com diferentes graus de sulfatação (agar, carragenano, furcellarano)
Briófitas	Celulose, açúcares incomuns como MeRha, RGII
Samambaias e licófitas*	Celulose, galactomanano e xiloglucano.
Eudicotiledôneas	Celulose, xiloglucanos, mananos, arabinogalactanos, ácido poligalacturônico.
Monocotiledôneas	Celulose, arabinoxilanos, mananos, glucoarabinogalactanos e $\beta$ -glucanos.

\* Utilizando os dados de Silva, 2005.

Matsunaga *et al.* (2004), examinaram a presença de um dos componentes das pectinas (Ramnogalacturonano II) na parede celular sob o ponto de vista da evolução em plantas vasculares, incluindo samambaias e licófitas. Até então, havia uma lacuna no estudo da parede celular dessas plantas sob o ponto de vista filogenético e/ou evolutivo e que, portanto, comparasse várias espécies escolhidas por critérios taxonômicos.

De acordo com Pryer *et al.* (2001), a maioria dos 470 milhões de anos da história das plantas em nosso planeta pertence às pteridófitas, que só cederam ao domínio das espermatófitas há cerca de 90 milhões de anos. Apesar da sua importância, não foi possível encontrar trabalhos em que as paredes celulares de samambaias e licófitas tenham sido analisadas com a coleta sistemática de espécies conforme o que se conhece sobre a filogenia do grupo.

Recentemente, Silva (2005) examinou em detalhe, através de fracionamento com álcali e análises de monossacarídeos, as paredes celulares de 11 espécies de samambaias e licófitas. Com os dados de composição monossacarídica, foi feito um estudo de agrupamento visando comparar as espécies, que haviam sido coletadas estrategicamente para tentar avaliar a possibilidade de que a composição variasse conforme a filogenia. A autora verificou que os dados não corroboravam a filogenia proposta por Pryer et al. (2001), mas que as espécies se agrupavam de acordo com diferenças fundamentais na composição de suas paredes. Houve a separação de dois grupos, um deles rico em mananos (H1) e outro rico em xiloglucanos (H2). Este trabalho levantou a hipótese de que apesar de haver um agrupamento que possibilita distinguir as paredes das folhas de diferentes espécies, este não referenda a classificação feita com base em dados morfológicos e moleculares (Pryer et al. 2001-Figura 3) e que outros fatores, como pressões ambientais, poderiam estar relacionados com estas diferenças. No entanto, como o número de espécies então analisado era relativamente pequeno para ter certeza das conclusões, o presente trabalho foi direcionado para examinar um dos grupos de hemiceluloses e tentar verificar se as alterações estruturais poderiam ou não estar relacionadas à filogenia das samambaias e licófitas.

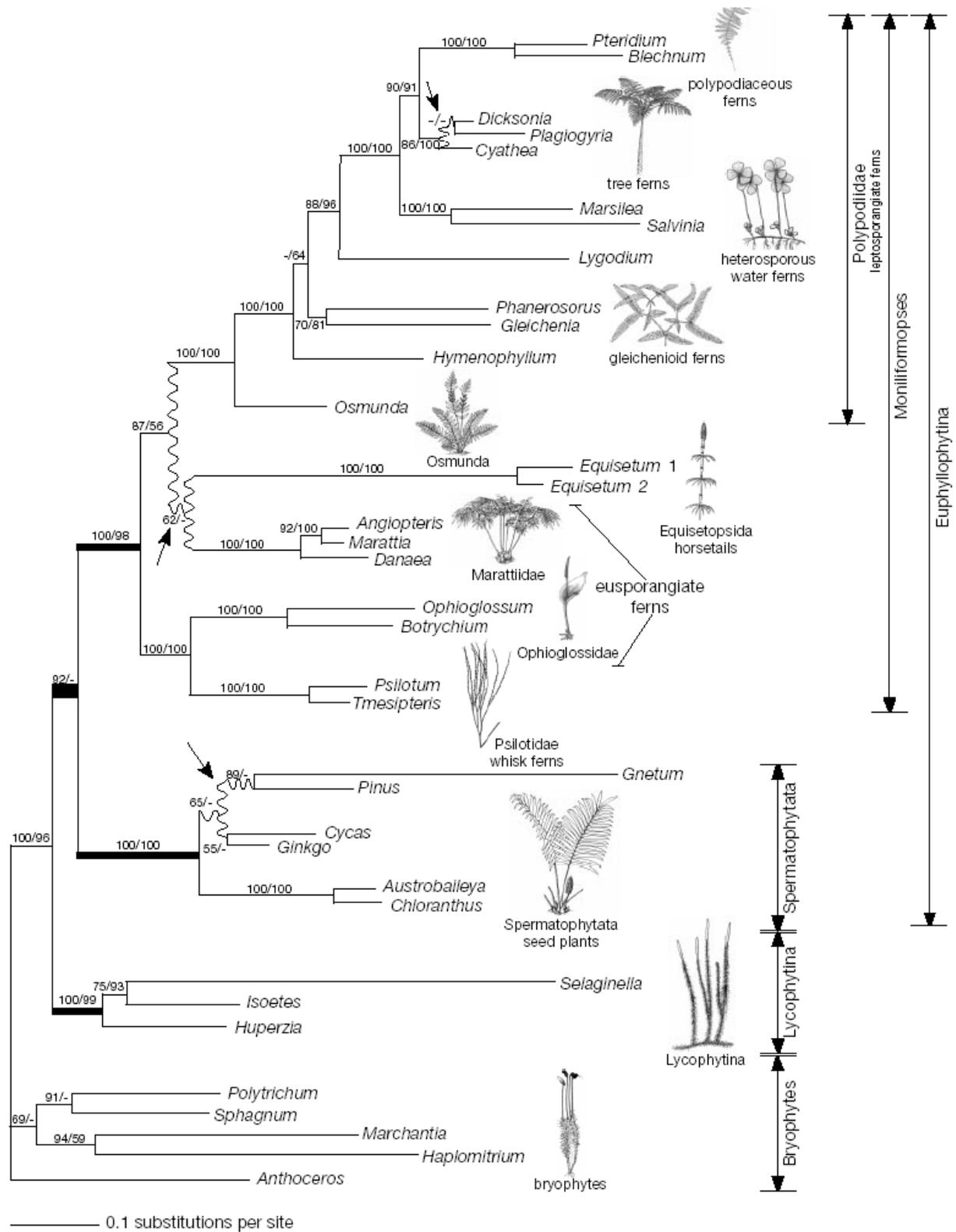


Figura 3 – Relações filogenéticas para todas as principais linhagens de plantas vasculares inferidas através de análise de máxima verossimilhança com base nos segmentos dos genes *rbcL*, *atpB*, *rps4* e *rRNA* (adaptado de Pryer *et al.* 2001).

O grupo escolhido foi o dos xiloglucanos. Esta escolha foi norteada pelo fato de que os xiloglucanos apresentam características estruturais bastante peculiares e relativamente bem conhecidas. Ao serem hidrolisados com celulase, eles formam oligossacarídeos característicos, compostos por 4 ou 5 glucoses na cadeia principal (ver detalhes sobre as ligações glicosídicas acima). Um sistema de classificação dos oligossacarídeos de xiloglucano foi proposto por Fry et al. (1993). Os nomes atualmente utilizados são listados abaixo:

- Glucoses sem ramificações: G
- Glucoses ramificadas com xilose: X
- Glucoses ramificadas com xilose e galactose: L
- Glucoses ramificadas com xilose, galactose e fucose: F.

Outros tipos de ramificações têm outros códigos, mas estes são os que serão relevantes neste trabalho.

Os xiloglucanos possuem uma combinação destes motivos estruturais bastante característicos. Em eudicotiledoneas, em geral a hidrólise do xiloglucano leva à produção de misturas de oligossacarídeos como XXXG, XLXG, XXLG, XLLG, XXFG. Eles ocorrem em diferentes proporções, dependendo da planta e do tecido vegetal que se examina. A combinação de oligossacarídeos que são encontrados em um dado tecido ou espécie é chamada de estrutura fina do xiloglucano.

Em tecidos de reserva, por exemplo, não se observa a presença de fucose e em espécies como *Tropaeolum majus*, *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii*, a hidrólise com celulase fúngica leva à produção de uma mistura de XXXG, XLXG, XXLG e XLLG apenas (Buckeridge et al. 1992). Nesse trabalho, os autores analisaram os xiloglucanos de sementes provenientes de diferentes populações de *C. langsdorffii* (da mata e do cerrado) e verificaram que a estrutura fina do xiloglucano de reserva das sementes desses dois biomas é distinta, denotando que variações ambientais poderiam influenciar nas características estruturais do xiloglucano.

Em 1997, Buckeridge e colaboradores encontraram em sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*) uma nova família de oligossacarídeos que tem como base o XXXXG, ou seja, com cinco, ao invés de quatro glucoses na cadeia principal. A estrutura fina do xiloglucano de jatobá tem sido estudada em profundidade (Tiné et al. 2006), sendo inclusive proposto que os xiloglucanos tenham combinações de oligossacarídeos que codifiquem suas funções na parede. Até o presente apenas espécies do gênero *Hymenaea* apresentaram estes oligossacarídeos, podendo assim ser utilizado para caracterizar o grupo taxonômico dentro de Leguminosae.

Em paredes celulares de tecidos vegetativos, como folhas e hipocótilos, os xiloglucanos geralmente apresentam fucose em sua composição. A presença de fucose leva à detecção dos oligossacarídeos XXFG, XLFG principalmente (Vincken et al. 1997). Os autores mencionam que xiloglucanos que não tenham sido extraídos com álcali podem revelar acetilação nas posições 2, 3 e 6 da galactose do XXFG e do XLFG.

## **Objetivos:**

Estudar a composição e estrutura das hemiceluloses da parede celular de samambaias e licófitas coletadas de acordo com a filogenia mais recente para o grupo proposta por Pryer et al. 2001 e Smith et al. 2006 com vistas a correlacionar este padrão com a filogenia e/ou com características ambientais e funcionais.

## **Material e Métodos:**

### **Material vegetal:**

Tendo como base a filogenia de samambaias apresentada no trabalho de Pryer *et al.* (2001) (Figura 3), foram selecionadas as espécies para o presente estudo sobre a parede celular. As espécies são provenientes das seguintes localidades: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, PEFI (São Paulo, SP); mata nativa do Jardim Botânico de Bauru (Bauru, SP); da Reserva de Cauaia, Lapa do Santo e Fazenda Castelo da Jaguará (Matosinhos, MG); da Reserva Particular do Patrimônio Natural “El Nagnal”, RPPN (Magé, RJ); do Parque Natural dos Aparados da Serra (Cambará do Sul, RS); da região de São José do Rio Preto, SP e Sorocaba, SP. As espécies, com suas respectivas famílias e número de coletor, estão listadas na tabela 2-7, abaixo. Os espécimes testemunhos estão depositados nos Herbários do Instituto de Botânica (SP) e no Departamento de Botânica da USP (SPF). A identificação do material coletado foi realizada com base nos trabalhos de Prado (2004 a, b, c) e Tryon & Stolze (1989 a, b).

Tabela 2 - Primeira coleta de frondes estéreis de samambaiase licófitas, realizada no PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga), reserva de Mata Atlântica.

Plantas coletadas	Nome e N. de Coletor	Família	Espécie
1	Prado 1604	Gleicheniaceae	<i>Gleichenella pectinata</i> (Willd.) Ching
2	Prado 1605	Gleicheniaceae	<i>Sticherus bifidus</i> (Willd.) Ching
3	Prado 1606	Polypodiaceae	<i>Serpocaulon catharinae</i> (Langsd. & Fisch.) A. R. Sm.
4	Prado 1607	Cyatheaceae	<i>Cyathea delgadii</i> Sternb.
5	Prado 1608	Blechnaceae	<i>Blechnum brasiliense</i> Desv.
6	Prado 1609	Cyatheaceae	<i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin
7	Prado 1610	Dryopteridaceae	<i>Lomagramma guianensis</i> (Aubl.) Ching
8	Prado 1611	Dicksoniaceae	<i>Lophosoria quadripinnata</i> (J. F. Gmel) C. Chr.
9	Prado 1612	Pteridaceae	<i>Pteris decurrens</i> C. Presl
10	Prado 1613	Dryopteridaceae	<i>Polybotrya cylindrica</i> Kaulf.
11	Prado 1614	Woodsiaceae	<i>Deparia petersenii</i> (Kunze) M. Kato
12	Prado 1615	Pteridaceae	<i>Pteris splendens</i> Kaulf.
13	Prado 1616	Dryopteridaceae	<i>Megalastrum connexum</i> (Kaulf.) A. R. Sm & R. C. Moran
14	Prado 1617	Dryopteridaceae	<i>Ctenitis aspidioides</i> (C. Presl) Copel.
15	Prado 1618	Polypodiaceae	<i>Campyloneurum major</i> (Hieron. ex Hicken) Lellinger
16	Prado 1619	Aspleniaceae	<i>Asplenium gastonis</i> Fée
17	Prado 1620	Dryopteridaceae	<i>Lastreopsis amplissima</i> (C. Presl) Tindale
18	Prado 1621	Blechnaceae	<i>Blechnum binervatum</i> subsp. <i>acutum</i> (Desv.) R. M. Tryon & Stolze
19	Prado 1622	Blechnaceae	<i>Blechnum occidentale</i> L.
20	Prado 1623	Dennstaedtiaceae	<i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.) Maxon
21	Prado 1624	Polypodiaceae	<i>Microgramma vacciniifolia</i> (Langsd. & Fisco.) Copel.
22	Prado 1625	Polypodiaceae	<i>Pleopeltis hirsutissima</i> (Raddi) de la Sota
23	Prado 1626	Blechnaceae	<i>Salpichlaena volubilis</i> (Kaulf.) Hook.

Tabela 3 - Segunda coleta de frondes estéreis de samambaias e licófitas, realizada na região do Jardim Botânico de Bauru. Reserva de mata de cerrado e mata pluvial decídua.

<b>Plantas coletadas</b>	<b>Nome e N. de coletor</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
24	Prado 1632	Polypodiaceae	<i>Serpocaulon latipes</i> (Langsd. & Fisch.) A. R. Sm.
25	Prado 1633	Polypodiaceae	<i>Pleopeltis polypodioides</i> (L.) E. G. Andrews & Windham
26	Prado 1634	Thelypteridaceae	<i>Thelypteris interrupta</i> (Willd.) K. Iwats.
27	Prado 1635	Thelypteridaceae	<i>Thelypteris conspersa</i> (Schrad.) A. R. Sm.
28	Prado 1636	Thelypteridaceae	<i>Thelypteris opposita</i> (Vahl) Ching
29	Prado 1638	Dryopteridaceae	<i>Polybotrya goyazensis</i> Brade
30	Prado 1639	Polypodiaceae	<i>Microgramma lindbergii</i> (Mett.) de la Sota
31	Prado 1640	Pteridaceae	<i>Adiantum serratodentatum</i> Willd.
32	Prado 1641	Polypodiaceae	<i>Pecluma paradiseae</i> (Langsd. & Fisch.) M. G. Price
33	Prado 1642	Dryopteridaceae	<i>Cyclodium meniscioides</i> (Willd.) C. Presl
34	Prado 1643	Thelypteridaceae	<i>Thelypteris biformata</i> (Rosenst.) R. M. Tryon
35	Prado 1644	Thelypteridaceae	<i>Thelypteris longifolia</i> (Desv.) R. M. Tryon
36	Prado 1647	Pteridaceae	<i>Doryopteris lomariacea</i> Klotzsch
37	Prado 1650	Blechnaceae	<i>Blechnum imperiale</i> (Fée & Glaziou) H. Christ
38	Prado 1651	Blechnaceae	<i>Blechnum regnellianum</i> (Kunze) C. Chr.
39	Prado 1652	Pteridaceae	<i>Doryopteris concolor</i> (Langsd. & Fisch.) J. Sm.

Tabela 4 - Terceira coleta de frondes estéreis de samambaias e licófitas, realizada em Matozinhos, MG. Reserva Cauaia, Lapa do Santo e Fazenda Castelo da Jaguará. Reserva de mata ciliar e cerrado.

<b>Plantas coletadas</b>	<b>Nome e N. de coletor</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
40	Ceccantini 2953	Lygodiaceae	<i>Lygodium venustum</i> Sw.
41	Ceccantini 2959	Thelypteridaceae	<i>Macrothelypteris torresiana</i> (Gaudich.) Ching
42	Ceccantini 2960	Pteridaceae	<i>Adiantum deflectens</i> Mart.
43	Ceccantini 3010	Pteridaceae	<i>Adiantopsis chlorophylla</i> (Sw.) Fée
44	Ceccantini 3011	Pteridaceae	<i>Pteris vittata</i> L.
45	Ceccantini 3014	Pteridaceae	<i>Pteris denticulata</i> Sw.
46	Ceccantini 3015	Pteridaceae	<i>Hemionitis tomentosa</i> (Lam.) Raddi
47	Ceccantini 3022	Polypodiaceae	<i>Pecluma plumula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.G. Price

Tabela 5 - Quarta coleta de frondes estéreis de samambaias e licófitas, realizada em Magé, RJ. RPPN (Reserva Particular do Patrimônio Natural “El Nagnal”). Reserva de Mata Atlântica.

<b>Plantas coletadas</b>	<b>Nome e N. de coletor</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
48	Ceccantini 3067	Pteridaceae	<i>Acrostichum danaeifolium</i> Langsd. & Fisch.
49	Ceccantini 3075	Polypodiaceae	<i>Serpocaulon meniscifolium</i> (Langsd. & Fisch.) A. R. Sm.
50	Ceccantini 3082	Dryopteridaceae	<i>Elaphoglossum iguapense</i> Brade
51	Ceccantini 3083	Dryopteridaceae	<i>Bolbitis serratifolia</i> Schott
52	Ceccantini 3084	Dryopteridaceae	<i>Olfersia cervina</i> (L.) Kunze
53	Ceccantini 3085	Anemiaceae	<i>Anemia mandioccana</i> Raddi
54	Ceccantini 3086	Tectariaceae	<i>Tectaria incisa</i> Cav.
55	Ceccantini 3088	Hymenophyllaceae	<i>Hymenophyllum polyanthos</i> (Sw.) Sw.
56	Ceccantini 3089	Hymenophyllaceae	<i>Trichomanes rigidum</i> Sw.
57	Ceccantini 3090	Selaginellaceae	<i>Selaginella valida</i> Alston
58	Ceccantini 3091	Selaginellaceae	<i>Selaginella decomposita</i> Spring
59	Ceccantini 3092	Aspleniaceae	<i>Asplenium triquetum</i> N. Murak & R. C. Moran

Tabela 6 - Quinta coleta de frondes estéreis de samambaias e licófitas, realizada em Cambará do Sul, RS no Parque Natural dos Aparados da Serra. Reserva de Floresta de Araucária, campos e floresta pluvial atlântica.

<b>Plantas coletadas</b>	<b>Nome e N. de coletor</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
60	Bezerra da Silva 1	Gleicheniaceae	<i>Dicranopteris linearis</i> (Burm. f.) Underw.
61	Bezerra da Silva 2	Lycopodiaceae	<i>Lycopodium clavatum</i> L.
62	Bezerra da Silva 3	Dryopteridaceae	<i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forst.) Ching

Tabela 7 - Sexta coleta de frondes estéreis de samambaias e licófitas, realizada na região de São José do Rio Preto, SP, com exceção de *Alsophila setosa*, coletada em Sorocaba. Reservas de mata seca semi-decídua.

<b>Plantas coletadas</b>	<b>Nome e N. de coletor</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>
63	Prado 1689	Cyatheaceae	<i>Alsophila setosa</i> Kaulf.
64	Prado 1712	Dennstaedtiaceae	<i>Dennstaedtia obtusifolia</i> (Willd.) T. Moore.
65	Prado 1721	Pteridaceae	<i>Adiantum abscissum</i> Schrad.
66	Prado 1763	Pteridaceae	<i>Adiantopsis radiata</i> (L.) Fee
67	Prado 1767	Aspleniaceae	<i>Asplenium otites</i> Link

As frondes foram lavadas com água corrente, secas com papel absorvente, pesadas, congeladas em nitrogênio líquidas, e secas em liofilizador, antes da obtenção do pó em moinho manual de facas IKA A11 basic. As fibras das nervuras foram separadas para que fosse extraído o material mais rico em parede celular primária do mesofilo, evitando ao máximo utilizar material dos tecidos vasculares. O material pulverizado foi passado por uma peneira para minimizar a interferência das fibras.

### **Fracionamento da parede celular:**

A metodologia de fracionamento foi desenvolvida a partir do procedimento de Gorshkova *et al.* (1996). O acerto do procedimento foi feito inicialmente com algumas espécies para a melhor adaptação possível aos materiais de samambaias e licófitas. O fracionamento da parede celular foi feito a partir de 500 mg de material vegetal seco e moído.

### **Extração de açúcares solúveis:**

Foram pesados os tubos vazios e neles colocados os pós das frondes. Foram feitas quatro extrações sucessivas de açúcares solúveis com etanol 80% por 20 minutos sob agitação. O material foi centrifugado a 1000g durante 40 min a 15° C (centrífuga Sorvall e rotor HS-4), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com água destilada, seco no liofilizador e pesado.

#### Extração de amido:

Trinta e cinco mililitros de DMSO 90% foram adicionados ao material vegetal previamente submetido à extração de açúcares. Foram feitas duas extrações com DMSO 90%, a primeira durante cinco horas e a segunda, *overnight*, sempre sob agitação constante. Após essa extração o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado lavado três vezes com água destilada. Novamente o precipitado foi seco em liofilizador e pesado.

#### Extração de pectinas:

Essa extração foi feita adicionando-se 40 mL de oxalato de amônio 0,5% (p/v) para os 500 mg iniciais de pó. O material foi incubado por 1h com agitação constante a 80° C (quatro vezes). Terminada a extração foi levado à centrífuga, o sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado três vezes com água destilada, seco e pesado.

#### Fracionamento da parede celular com NaOH:

Foram adicionados aos tubos 20 mL de solução NaOH 0,1M com NaBH<sub>4</sub> (3 mg/ml). As amostras permaneceram em agitação por 1h à temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. O precipitado foi lavado de três a quatro vezes em água destilada, seco no liofilizador e pesado. Posteriormente essa extração foi feita da mesma maneira com NaOH 1M, 4M e 8M. Para análise de hemiceluloses os sobrenadantes das frações 4M e 8M foram, neutralizados, e dialisados contra água corrente durante 24 horas e depois foram efetuadas de três a cinco trocas com água destilada. Esse sobrenadante das frações 4 e 8M foram secos em liofilizador para posterior análise em HPLC.

Ao final desse procedimento apenas as frações NaOH 4M e NaOH 8M foram reservadas para posterior análise.

#### Hidrólise ácida:

O polissacarídeo obtido com esse fracionamento descrito acima foi submetido a uma diálise e liofilização.

Cinco miligramas do material liofilizado das extrações NaOH 4M e NaOH 8M foram retiradas para hidrólise. Esse material foi colocado em tubos de ensaio de vidro com 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% p/p e levado ao banho-maria por 45 minutos a 30° C para pré-hidrólise. Posteriormente foi acrescentado 1 mL de água destilada e levado para autoclave por 1 hora.

Ao final desse processo as amostras foram neutralizadas e passadas em coluna de troca iônica Dowex.

#### Análise de monossacarídeos em HPLC:

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida foram analisados por cromatografia de troca iônica com detector de pulso amperométrico (DIONEX, USA) em coluna Carbo Pac PA-1. A separação foi feita em 60 minutos, com água, tendo um pulso, nos primeiros 2 minutos, de NaOH 20 mM e um fluxo de 1mL/min. Foi utilizada pós-coluna com NaOH 500 mM e fluxo de 0,5 mL/min.

#### Metilação:

Uma alíquota da fração NaOH 4M de 5mg do pó liofilizado da fração extraída com NaOH 4M de *Adiantum raddianum* foi solubilizada em 1mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM pH 4,6 com agitação por 1 hora. Após este período, 0,3 g de 1-Ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meta-p-toluenosulfonato 95% (Aldrich C106402) foram adicionados e a solução foi incubada por mais 1 hora a temperatura ambiente. A amostra foi então resfriada e o pH conferido (4,75). Com este procedimento, as carboxilas das pectinas foram reduzidas a álcool, transformando assim as unidades de ácido galacturônico e glucurônico das pectinas em galactose e glucose respectivamente. O material foi dialisado por 24 horas com água destilada e, em seguida, liofilizado. O polissacarídeo duplamente reduzido e seco foi armazenado à vácuo com pentóxido de fósforo em um dessecador em tubos Corex de borosilicato por 3 horas. Em seguida, o material seco foi incubado com 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido) por 1 hora. Um mL de butilítio foi adicionado cuidadosamente mantendo-se uma atmosfera de argônio em sistema aberto em cada um dos tubos. Este é um íon forte que promove a ionização das hidroxilas livres dos carboidratos. Estas hidroxilas foram metiladas com a adição de 1 mL de iodeto de metila (CH<sub>3</sub>I) (Gibeaut & Carpita 1991).

Após esse procedimento o material foi hidrolisado com ácido trifluoracético (TFA) 1M por 2h e em seguida reduzido com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). O excesso de boroidreto de sódio foi retirado com adição de ácido acético glacial que forma acetato de sódio e gás hidrogênio. Finalmente, o material foi acetilado por incubação com anidrido acético (1 mL) e Piridina (0,1 mL), tornando os compostos em alditóis acetatos metilados, os quais são compostos voláteis que foram analisados por Cromatografia Gás-Líquido com detecção por espectrometria de massas GC-MS da Agilent (Carpita & Shea 1989). As fragmentações obtidas na

espectrometria de massas e os tempos de retenção foram interpretados com auxílio do Prof. Nick Carpita do Department of Botany and Plant Pathology da Universidade de Purdue.

Além disso, 1 mg do mesmo material foi submetido à hidrólise ácida com TFA 1M por 3 horas e os monossacarídeos livres foram acetilados como descrito acima. Este procedimento permitiu avaliar a composição de monossacarídeos.

### **Análises por espectrometria de massas Maldi-Tof:**

Amostras de pó de folhas (10 mg) foram submetidas à extração com 1 mL etanol 70% a temperatura ambiente (3 vezes) seguido de lavagens com uma mistura de clorofórmio metanol (1:1) até que toda a pigmentação fosse retirada (em média de seis a oito lavagens). O precipitado foi seco por liofilização em *Speedvac*.

Alíquotas de 1mg de cada amostra foram submetidas à lavagem com 50 µL de tampão acetato de amônio 1M, pH 4,5 + 950 µl de água milli-Q. A mistura foi fervida por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com o mesmo tampão, sem fervura. Ao precipitado foi adicionada a enzima xiloglucano endo-glucanase, em um primeiro teste e posteriormente, num segundo teste, foi adicionada celulase Megazyme (4 µL contendo 0,2U), 5 µL de acetato de amônio 1M pH 4,5, 5 µL de azida sódica e 86 µL de água deionizada (milli-Q). A incubação foi feita a 37° C por 15 horas com agitação constante. Após centrifugação a 14000g, 20 µL do sobrenadante da reação foram retirados e submetidos a um tratamento com resina de troca aniônica para que somente os cátions ficassem presentes, ionizando os oligossacarídeos. Após contato com a resina durante 15 minutos, a placa de Maldi-Tof foi preparada através da aplicação de 2 µL de ácido 2,5-dihidroxi benzóico. Após secagem a vácuo, 2 µL dos oligossacarídeos obtidos pela ação enzimática e tratamento com a resina aniônica, foram aplicados em placa sobre os mesmos pontos na matriz. Todo o processo de aplicação dos oligossacarídeos nunca excedeu 3 minutos e após este período foi seco à vácuo por 2 minutos. A matriz foi analisada em um espectrômetro da Shimadzu Biotech Axima CFRPlus.

Após a fragmentação, os dados foram analisados em software da Shimadzu Biotech MALDI-MS. Os dados quantitativos relativos às massas relevantes para a estrutura do xiloglucano foram transferidos para o programa MS Excel e expressos em gráficos de barra.

Os oligossacarídeos são detectados por intensidade medida em Milivolt. Apesar de o equipamento ter detectado vários outros picos, que não foi possível identificar, consideramos a soma das intensidades correspondentes aos picos dos oligossacarídeos citados, como 100%. É

importante lembrar que a composição da parede celular dessas plantas possui outros picos correspondentes a outras substâncias, dando margem à continuidade desse estudo sobre polissacarídeos de samambaias e licófitas.

### **Análise de agrupamento:**

Para o tratamento dos dados foi desenvolvida uma matriz de correlações entre as 67 espécies e o padrão comparativo, jatobá (*Hymenaea courbaril*), que foram investigadas quanto à composição dos polissacarídeos de parede celular primária, utilizando os dados de oligossacarídeos obtidos com a análise de Maldi-tof.

As análises de agrupamento foram conduzidas por meio da construção de uma matriz binária, onde o “0” atesta ausência dos oligossacarídeos e o “1” atesta a presença, tendo sido construído um dendograma a partir do cálculo dos coeficientes de Jaccard, fazendo uso do algoritmo do vizinho mais distante, a partir disso, procedeu-se com uma análise de agrupamento, fazendo uso do pacote estatístico R project.

As matrizes geradas e as linhas de comando estão disponíveis à consulta na seção de anexos desta tese.

## **Resultados & Discussão:**

### **Parte I- Análises da parede celular de 17 espécies selecionadas:**

Foram estudadas 67 espécies de samambaias e licófitas. Das espécies coletadas, 17 (ca. 25%) foram selecionadas para extração completa de parede celular.

Para interpretar os resultados obtidos, partiu-se do princípio que na parede celular de samambaias e licófitas temos os mesmos padrões de ligações glicosídicas encontrados em polissacarídeos que ocorrem em Spermatophyta. De fato, nossos dados do trabalho anterior a este (Silva et al. submetido Anexo) dão suporte a esta hipótese. Além disso, tal observação tem sido confirmada pela literatura (ver introdução) e agora também confirmada para as hemiceluloses de *Adiantum raddianum* (Silva et al, submetido – anexo 3 – tabela 10).

Na Tabela 8, observam-se os rendimentos expressos em miligramas e em porcentagem, da parede celular obtida com o fracionamento completo. Como o objetivo do projeto é também

investigar mais profundamente as hemiceluloses, somente as frações 4 e 8M foram dialisadas e liofilizadas para posterior análise em HPAEC.

Tabela 8 - Rendimento expresso em miligramas e em porcentagem. Os números destacados em vermelho mostram as espécies que possuem praticamente o dobro do rendimento na fração 4M, em azul as espécies que possuem o rendimento da fração 8M com praticamente o dobro do rendimento em relação à 4M, e as em preto espécies com rendimentos semelhantes.

Espécies	NaOH 4M		NaOH 8M		razão 4M/8M
	mg	%	Mg	%	
<i>Cyathea delgadii</i>	26,8	8,85	7,8	2,58	3,43
<i>Cyclodium meniscioides</i>	14,9	4,64	8,4	2,62	1,77
<i>Hemionitis tomentosa</i>	9,2	6,28	7,6	<b>5,19</b>	1,21
<i>Hymenophyllum polyanthos</i>	9,2	5,70	7,6	<b>4,45</b>	1,28
<i>Lastreopsis amplíssima</i>	24,5	7,65	22,8	<b>7,12</b>	1,07
<i>Lomagramma guianensis</i>	36,2	12,44	4,1	1,41	8,82
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	17,1	4,97	8,4	2,44	2,04
<i>Lygodium venustum</i>	21,0	6,43	10,3	3,15	2,04
<i>Pecluma plúmula</i>	22,3	9,26	12,0	4,98	1,86
<i>Polybotyia goyazensis</i>	14,3	4,60	16,9	<b>5,43</b>	0,85
<i>Serpocaulon catharinae</i>	24,4	7,47	15,7	4,80	1,56
<i>Pteris splendens</i>	27,1	8,05	7,6	2,26	3,56
<i>Sticherus bifidus</i>	13,6	4,71	11,2	<b>3,87</b>	1,22
<i>Tectaria incisa</i>	21,0	8,17	10,3	<b>8,17</b>	1,00
<i>Thelypteris longifolia</i>	29,0	10,16	5,4	1,89	5,38
<i>Thelypteris opposita</i>	23,4	9,17	4,3	1,68	5,46
<i>Trichomanes rigidum</i>	22,3	<b>4,24</b>	12,0	9,04	0,47
<b>MÉDIA</b>	<b>21</b>	<b>7,2</b>	<b>10,1</b>	<b>4,2</b>	1,73
<b>Máximo</b>	<b>36,2</b>	<b>12,4</b>	<b>22,8</b>	<b>9,1</b>	8,82
<b>Mínimo</b>	<b>9,2</b>	<b>4,2</b>	<b>4,1</b>	<b>1,4</b>	0,47
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>7,2</b>	<b>2,3</b>	<b>4,8</b>	<b>2,3</b>	2.2

O rendimento das hemiceluloses mostrado na Tabela 8 foi obtido a partir do peso após as extrações de açúcares solúveis e amido, ou seja, foram considerados 100% de parede celular, apenas os rendimentos de pectinas, hemiceluloses e celulose.

Até o momento, 17 espécies foram analisadas e os rendimentos após fracionamento com NaOH deram resultados cujas médias se aproximam de 7 e 4% de rendimento para NaOH 4 e 8M respectivamente. Estes dados contêm um alto nível de variação quando analisados comparativamente, mas através dos valores máximos observados pode-se concluir que as hemiceluloses podem chegar a cerca de 20% da parede celular no máximo e cerca de 5%, em média, no mínimo. Das 17 espécies analisadas 6 (ca. 35% - em preto na coluna 4M/8M da Tabela 8) apresentaram o rendimento em NaOH 8M similar ao de 4M. Pode-se observar ainda que a fração NaOH 4M apresentou um rendimento relativamente maior do que em NaOH 8M, sendo a primeira, em média, o dobro da segunda. Isto provavelmente significa que a maior parte das hemiceluloses é extraída nessa etapa do fracionamento, com exceção de *Lastreopsis amplissima*, que teve os rendimentos das frações 4 e 8M muito semelhantes.

#### Análises de monossacarídeos:

A Tabela 9 mostra as análises de monossacarídeos das espécies selecionadas e cujas paredes celulares foram fracionadas com NaOH. Os dados analisados foram os das frações 4M e 8M que constituem as hemiceluloses. Tentamos encontrar correlações entre os rendimentos e a composição de monossacarídeos. Isto foi feito porque inicialmente levantamos a hipótese de que os 35% (em negrito na Tabela 8) das espécies em que se encontraram proporções relativamente maiores de hemiceluloses na fração 8M poderia se correlacionar com a presença de vasos condutores, que segundo se aceita amplamente, deveria apresentar maior teor de xilose, uma vez que os xilanos são os polímeros que são detectados em células do xilema e fibras juntamente com altos teores de celulose.

No entanto, não foi encontrada correlação clara entre os teores de xilose na fração 4M e as razões 4M/8M de rendimento para as espécies. Testes para correlações com os demais açúcares foram efetuados. Porém somente um deles se mostrou com uma tendência digna de nota.

A Figura 4 mostra uma proposta hipotética de correlações entre os teores de manose na fração 4M e as razões 4M/8M dos rendimentos. O significado destas razões é que quanto menores elas são, maior seria a força com que o polissacarídeo que contém o monossacarídeo analisado (neste caso a manose) se liga à celulose. Em outras palavras, maior é a dificuldade de

extraí-lo. Uma outra forma de ver é que as razões 4M/8M mais altas significam que uma concentração menor (4M) de NaOH já foi suficiente para solubilizá-lo. Na figura 4, os pontos foram artificialmente divididos, pois é possível observar que em algumas amostras com baixo teor de manose, as razões são baixas enquanto para um outro grupo de 11 espécies, é possível observar que quanto maior o teor de manose na fração 4M, menor a razão 4M/8M (ou seja, maior a força de ligação à celulose, ou menor a solubilidade). Uma hipótese que poderia explicar esta diferença na solubilidade em álcali e interação dos mananos com a celulose é que o grau de ramificação com galactose poderia ser distinto conforme a interação. Em outras palavras, o maior nível de ramificação com galactose tornaria o manano menos interativo. Esta hipótese foi testada através da análise da correlação entre as proporções de manose e galactose nas mesmas frações (4M) (Figura 4B). Observamos que não há uma correlação geral quando se observam todas as espécies, mas que a parte do gráfico que agrupou as espécies cuja correlação é negativa na Figura 4A, é formada por várias das espécies que apresentaram correlação negativa entre galactose e manose. Esta observação sugere que nas espécies com maior teor de manose provavelmente apresentam mananos menos ramificados que se ligam mais fortemente à celulose.

De todas as correlações analisadas entre os monossacarídeos encontrados nas 17 espécies analisadas e seus respectivos rendimentos de hemiceluloses nas frações 4 e 8M, aquelas mostradas na Figura 4 foram as únicas que mostraram algum sentido e permitiram especulações.

Tabela 9. Composição em monossacarídeos das frações NaOH 4M e 8M das espécies listadas na Tabela 8. Para efeito de comparação, são mostrados novamente os dados das razões 4M/8M dos rendimentos que dão uma estimativa do quão fortemente as hemiceluloses estão aderidas à celulose.

Espécies	NaOH 4M							NaOH 8M							Solubilidade
	Fuc	Ram	Ara	Gal	Glc	Xil	Man	Fuc	Ram	Ara	Gal	Glc	Xil	Man	Razão 4M/8M
<i>Cyathea delgadii</i>	0,0	0,0	7,3	19,7	37,9	15,1	20,1	0,0	0,0	15,1	19,6	37,2	9,9	18,2	3,4
<i>Cyclodium meniscioides</i>	0,0	0,0	0,0	11,8	38,9	24,3	25,0	0,0	0,0	6,6	9,6	41,2	37,2	5,5	1,8
<i>Hemionitis tomentosa</i>	0,9	4,4	7,3	16,6	27,6	11,0	32,3	0,9	6,0	8,3	19,6	25,1	6,7	33,4	1,2
<i>Hymenophyllum polyanthos</i>	0,6	12,5	7,7	14,6	16,6	7,3	40,7	6,6	9,3	13,9	11,8	22,6	5,5	30,3	1,3
<i>Lastreopsis amplissima</i>	0,0	0,0	15,6	19,7	43,9	14,5	6,4	0,0	0,0	11,4	12,8	55,3	16,7	3,9	1,1
<i>Lomagrumma guianensis</i>	0,0	0,0	12,2	18,7	48,6	13,7	6,9	0,0	0,0	17,0	21,0	49,0	8,4	4,6	8,8
<i>Lophosoria quadripinata</i>	0,2	5,7	0,7	16,7	23,3	24,1	29,5	0,0	5,9	0,8	13,0	21,1	17,6	41,7	2,0
<i>Lygodium venustum</i>	0,3	1,9	58,0	8,7	10,6	9,0	11,5	1,2	4,4	8,2	16,7	19,5	11,4	38,5	2,0
<i>Pecluma plúmula</i>	1,4	3,6	22,5	11,7	42,9	9,0	8,9	1,6	7,6	31,7	14,5	25,5	8,8	10,4	1,9
<i>Polybotrya goyazensis</i>	0,0	0,0	8,7	17,1	41,4	28,0	4,8	0,0	0,0	8,7	17,1	41,4	28,0	4,8	0,9
<i>Pteris splendens</i>	0,0	0,0	8,6	13,0	60,1	7,4	10,9	0,0	0,0	11,1	11,9	55,0	5,7	16,3	1,6
<i>Serpocaulon catharinae</i>	0,0	0,0	10,8	17,2	34,3	7,9	29,9	0,0	0,0	3,6	9,8	53,8	5,5	27,3	3,6
<i>Sticherus bifudus</i>	1,7	0,0	8,5	18,9	38,0	12,1	20,8	1,3	0,0	11,6	19,5	41,4	7,8	18,5	1,2
<i>Tectaria incisa</i>	3,5	0,0	26,8	16,6	29,4	17,7	6,1	4,1	10,3	20,2	12,7	29,6	21,4	1,6	1,0
<i>Thelypteris longifolia</i>	1,6	2,8	8,3	14,0	44,4	16,8	12,1	1,2	0,0	33,0	12,7	30,2	16,4	6,5	5,4
<i>Thelypteris opposita</i>	0,0	0,0	6,1	9,4	52,2	13,8	18,6	0,0	3,4	6,4	10,6	46,1	6,3	27,1	5,5
<i>Trichomanes rigidum</i>	1,2	1,5	5,8	10,6	27,5	13,6	39,8	1,6	5,8	11,2	15,0	30,0	17,9	18,6	0,5
<b>Média</b>	<b>0,7</b>	<b>1,9</b>	<b>12,6</b>	<b>15,0</b>	<b>36,3</b>	<b>14,4</b>	<b>19,1</b>	<b>1,1</b>	<b>3,1</b>	<b>12,9</b>	<b>14,6</b>	<b>36,7</b>	<b>13,6</b>	<b>18,1</b>	<b>1,7</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>1,0</b>	<b>3,3</b>	<b>13,5</b>	<b>3,6</b>	<b>12,7</b>	<b>6,2</b>	<b>12,0</b>	<b>1,8</b>	<b>3,7</b>	<b>8,7</b>	<b>3,7</b>	<b>12,3</b>	<b>8,9</b>	<b>13,0</b>	<b>2,2</b>
<b>Máximo</b>	<b>3,5</b>	<b>12,5</b>	<b>58,0</b>	<b>19,7</b>	<b>60,1</b>	<b>28,0</b>	<b>40,7</b>	<b>6,6</b>	<b>10,3</b>	<b>33,0</b>	<b>21,0</b>	<b>55,3</b>	<b>37,2</b>	<b>41,7</b>	<b>8,8</b>
<b>Mínimo</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>8,7</b>	<b>10,6</b>	<b>7,3</b>	<b>4,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,8</b>	<b>9,6</b>	<b>19,5</b>	<b>5,5</b>	<b>1,6</b>	<b>0,5</b>

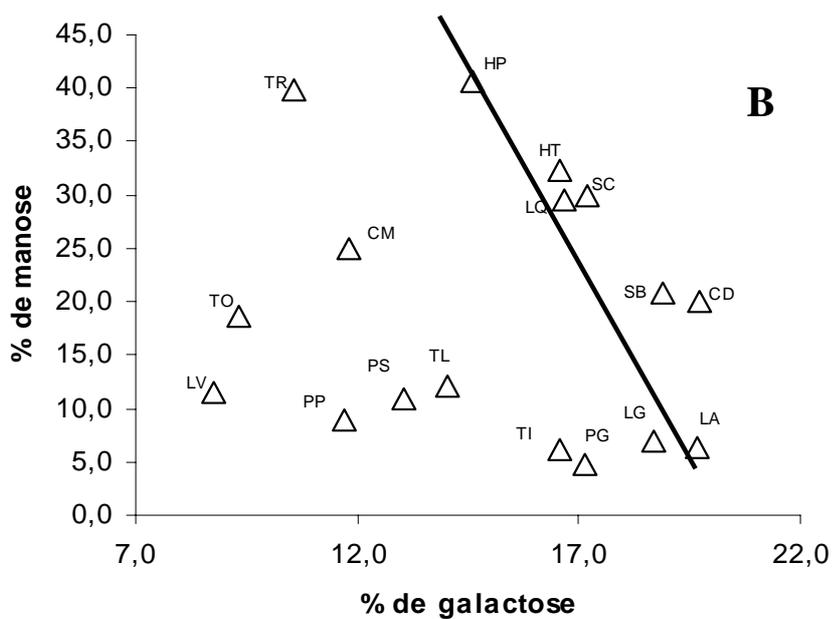
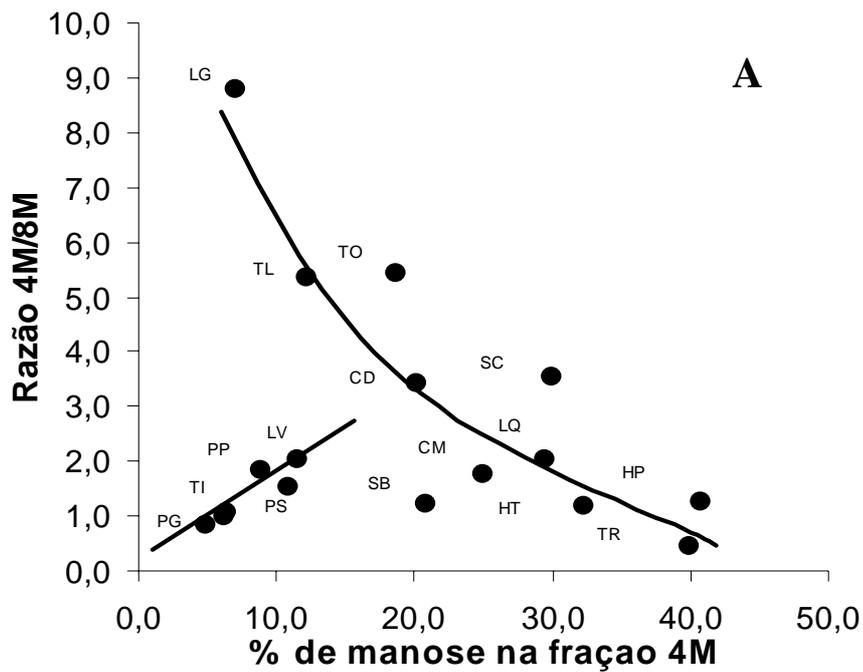


Figura 4. Possíveis correlações entre os teores de manose na fração NaOH 4M e as razões 4M/8M para os rendimentos das frações. (A) Relação entre as razões 4M/8M e a % de manose na fração 4M e (B) relação entre as % de manose e de galactose nas mesmas frações (4M)

Análise estrutural dos polissacarídeos de parede celular de *Adiantum raddianum*:

Na Tabela 10 a primeira coluna mostra os resíduos de açúcares encontrados na metilação, os números indicam qual o carbono está ligado na cadeia. A segunda coluna mostra a porcentagem encontrada desses açúcares. Nas colunas das pectinas, xiloglucanos, mananos e xilanos são colocadas as porcentagens de modo que seja possível somar a porcentagem encontrada de cada açúcar, em cada polissacarídeo, de acordo com os carbonos ligados. Esta é uma sugestão hipotética, já que a ocorrência dos açúcares metilados pode variar.

Os números indicados antes do resíduo de açúcar significam qual o número do carbono ligado, no caso dos açúcares precedidos por uma letra “t”, indica que é um açúcar terminal, ou seja, ligado pelo carbono 1. Analisando-se o número do carbono ligado é possível determinar a qual cadeia ele pertence e assim, pode-se concluir qual a hemicelulose presente na amostra.

Tabela 10- Porcentagem dos açúcares ligados (metilação) da fração NaOH 4M de *Adiantum raddianum* C. Presl.

<b>Açúcar ligado</b>	<b>%</b>	<b>Pectinas</b>	<b>Xiloglucano</b>	<b>Manano</b>	<b>Xilano</b>
<b>Rhamnose</b>					
t-Rham	0,43	0,43	-	-	-
2-Rham	0,5	0,5	-	-	-
2,4-Rham	0,63	0,63	-	-	-
<b>Arabinose</b>					
t-Arap	Tr	Tr	-	-	-
t-Ara	0,38	0,38	-	-	-
2-Ara	0,5	0,5	-	-	-
3-Araf	0,6	0,6	-	-	-
5-Ara	0,55	0,55	-	-	-
2,5-Ara	0,32	0,32	-	-	-
<b>Ácido Galacturônico</b>					
t-GalA	Tr	Tr	-	-	-
4-GalA	1,73	1,73	-	-	-
3,4-GalA	0,52	0,52	-	-	-
<b>Ácido Glucurônico</b>					
t-GlcA	0,59	-	-	-	0,59
<b>Fucose</b>					
t-Fuc	1,38	-	1,38	-	-
<b>Galactose</b>					
t-Gal	5,47	-	5,47	-	-
2-Gal	4,59	4,59	-	-	-
3-Gal	1,06	1,06	-	-	-
4-Gal	0,72	0,72	-	-	-
6-Gal	0,82	-	0,82	-	-
2,4-Gal	0,72	0,72	-	-	-
3,6-Gal	0,97	0,97	-	-	-
<b>Manose</b>					
t-Man	0,51	-	-	0,51	-
4-Man	18,31	-	-	18,31	-
4,6-Man	1,16	-	-	1,16	-
<b>Xilose</b>					
t-Xyl	3,38	-	3,38	-	-
2-Xyl	6,10	-	6,10	-	-
4-Xyl	3,99	-	-	-	3,99
2,4-Xyl	0,94	-	-	-	0,94
3,4-Xyl	0,16	-	-	-	0,16
2,3-Xyl	0,32	-	-	-	0,32
<b>Glucose</b>					
t-Glc	1,33	-	1,33	-	-
2-Glc	0,51	-	-	0,51	-
4-Glc	12,64	-	12,64	-	-
2,4-Glc	0,49	-	0,49	-	-
3,4-Glc	0,49	-	0,49	-	-
4,6-Glc	26,25	-	26,25	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>14,22</b>	<b>58,35</b>	<b>20,49</b>	<b>6</b>

Observou-se um rendimento aproximado de 14,22% de pectinas, com muitos resíduos de galactose em suas ramificações (2-Gal; 3-Gal; 3,6-Gal), que corroboram a hipótese de que as pectinas, nessa espécie, são muito ramificadas e, portanto, muito solúveis, o que explica seu alto rendimento (ver tabela 2 do manuscrito anexo 3).

A maior proporção (58,35%) dos resíduos de açúcares ligados são característicos de xiloglucano, hemicelulose mais abundante na parede celular tipo I (ver introdução). A porcentagem elevada do fragmento 4-Glc indica glucose 4 ligada, que é encontrada no xiloglucano, o qual possui sua cadeia principal formada por resíduos de glucose ligados entre si através de ligações do tipo  $\beta$  1-4. A ocorrência de 6-Gal, pode ser explicada pelas ramificações do xiloglucano, que possui uma galactose ligada a um resíduo de glucose da cadeia principal. Esta galactose pode ainda estar ligada a uma unidade de fucose, através de seu carbono 6 que no caso de parede primária pode ser explicada pela ocorrência de t-Fuc (fucose terminal). Já o resíduo t-Gal (galactose terminal) explica as ramificações de galactoses ligadas à xilose.

Em contrapartida, 20,49 % de açúcares típicos de mananos, como 4-Man, indicam a presença de uma cadeia de manano 1,4 ligado (provavelmente beta). Essa porcentagem de 20,49 pode ser considerada muito elevada em comparação aos aproximadamente 2% encontrados em paredes tipo I (Shiga et al. 2006; Reard et al. 1993). Esse dado corrobora nossa proposta de que as paredes celulares de algumas espécies de samambaias (Grupo H1 do anexo 3, Figura 3) podem ter um terceiro tipo de parede celular.

Também foi possível detectar 6% de resíduos de açúcares com ligações típicas de xilano. A ocorrência de 4-Xyl indica a presença de um xilano 1,4 ligado (provavelmente beta) que é típico das paredes celulares de tecidos vasculares (xilema e fibras). A contaminação com este tipo de polímero é relativamente pequena, mas sempre ocorre. Mesmo após uma seleção do material, que foi peneirado para exclusão de fibras, não foi possível eliminá-las completamente.

A composição de monossacarídeos da fração submetida à análise estrutural foi analisada também por hidrólise ácida e acetilação. Os dados são mostrados na tabela 11 e estão expressos em porcentagem de monossacarídeos obtidos com a hidrólise de TFA (ácido trifluoracético) ao valores de alguns monossacarídeos são semelhantes aos obtidos após a hidrólise feita com ácido sulfúrico (ver tabela do anexo 2).

Estes resultados mostram claramente que o procedimento de metilação foi bastante eficiente e com poucas perdas durante o processo, pois as composições pelas duas metodologias são bastante próximas.

Tabela 11- Porcentagem dos monossacarídeos obtidos através da hidrólise com TFA (ácido trifluoracético) para realização da metilação. E porcentagem total dos monossacarídeos encontrados após a metilação. Legenda: Rha- ramnose, Fuc-fucose, Ara-arabinose, Xyl-xilose, Man-manose, Gal-galactose, Glc-glucose, GalA-ácido galacturônico.

<i>Adiantum raddianum</i>								
Monossacarídeos	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA
TFA	2,53	3,42	3,88	18,85	21,92	11,34	34,78	3,28
Metilação	1,57	1,38	2,35	14,89	19,99	14,95	42,03	2,25

## **Parte II - Análises de xiloglucanos de 67 espécies de samambaias e licófitas por espectrometria de massas Maldi-Tof:**

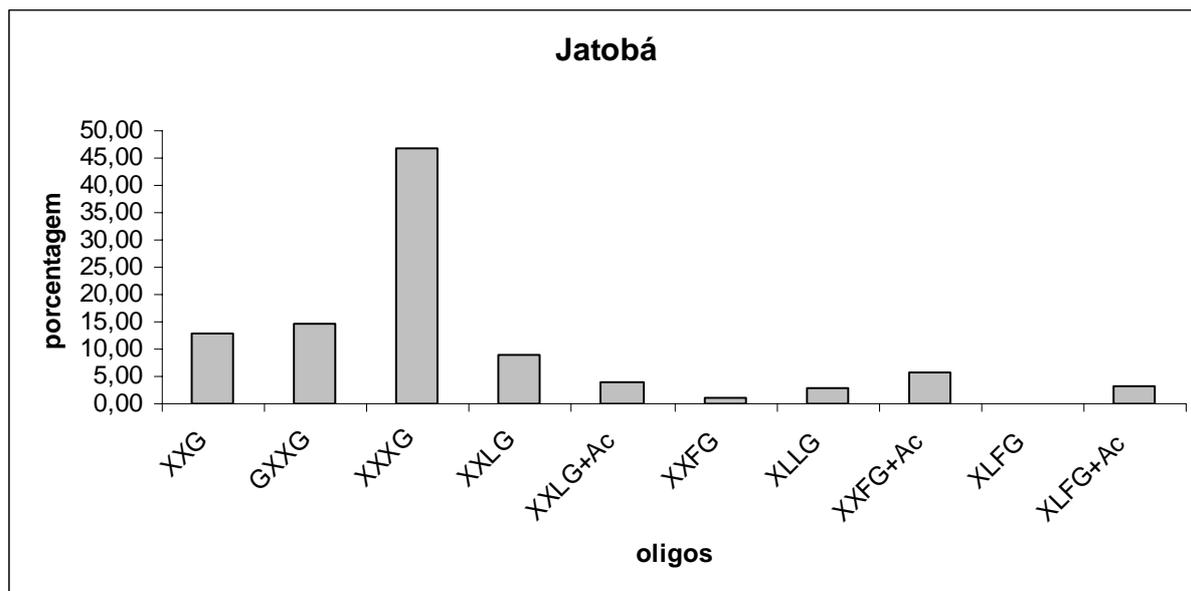
A seguir são mostrados os resultados correspondentes às composições de oligossacarídeos de xiloglucanos nas espécies estudadas. Das 67 espécies utilizadas neste estudo, apenas 6 delas (8,9%) não apresentaram fragmentos (oligossacarídeos) que atestassem suscetibilidade ao ataque da celulase de *Trichoderma* sp. Porém, é importante salientar que a ausência de produção de oligossacarídeos não significa que não exista xiloglucano nas paredes celulares, mas que estes não estão acessíveis ao ataque da enzima e podem ou ter estrutura fina diferente ou então estarem em interação com outro polímero de forma a impedir o acesso da celulase.

Para realizar as análises por espectrometria de massas Maldi-tof os primeiros testes foram realizados com uma xiloglucanase específica (xiloglucano endo glucosidase – XEG), que ataca as paredes de folhas de arabidopsis e produz os oligossacarídeos de xiloglucano nela existentes (Pauly *et al.* 1999). No entanto, a despeito de inúmeros testes, as espécies de samambaias e licófitas, não foram suscetíveis ao ataque desta enzima, mas somente ao da celulase de *Trichoderma*. Esta diferença não pode ser atribuída à acetilação presente na galactose, uma vez que observamos, pela primeira vez, que o xiloglucano de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril*) é acetilado e mesmo assim suscetível ao ataque daquela enzima. Na literatura encontram-se informações de que a acetilação da glucose pode modificar a ação das celulases, mas além de não termos encontrado fragmentos compatíveis com a presença desses oligossacarídeos, o fato de a celulase de *Trichoderma* atacar o xiloglucano de samambaias e licófitas indica que este não seria o fator que difere a suscetibilidade dos xiloglucanos das espécies desse grupo às duas enzimas utilizadas. Por isto, uma investigação mais acurada

comparando o ataque de diversas celulasas foi efetuada para compreender melhor este fenômeno.

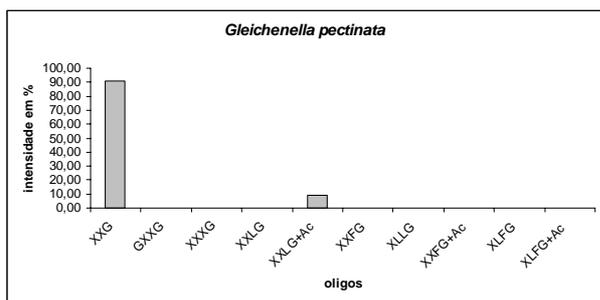
Os resultados a seguir mostram as porcentagens de oligossacarídeos de xiloglucano que foram liberados a partir das paredes celulares das espécies estudadas.

Foram considerados com oligossacarídeos de xiloglucano os compostos com massas correspondentes a: XXG, GXXG, XXXG, XXLG, XXLG+Ac, XXFG, XLLG, XXFG+Ac, XLFG e XLFG+Ac.

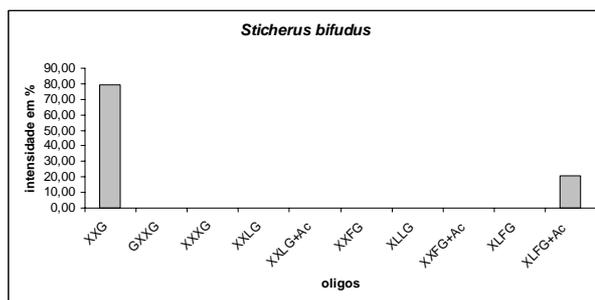


**Figura 5:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas de Jatobá.

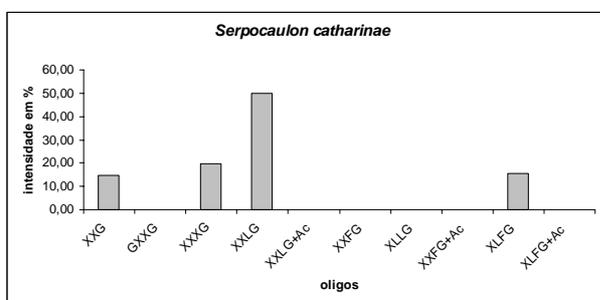
A seguir são apresentadas as distribuições de oligossacarídeos nas paredes celulares  
Plantas coletadas no PEFI, reserva de Mata Atlântica:



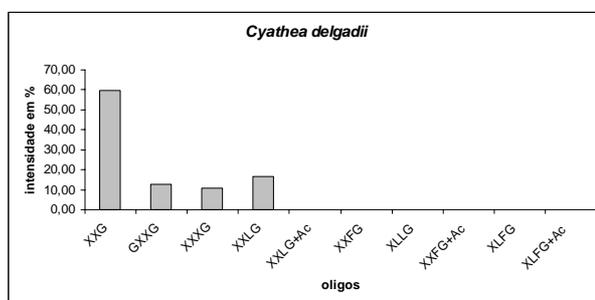
**Figura 6:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Gleichenella pectinata*.



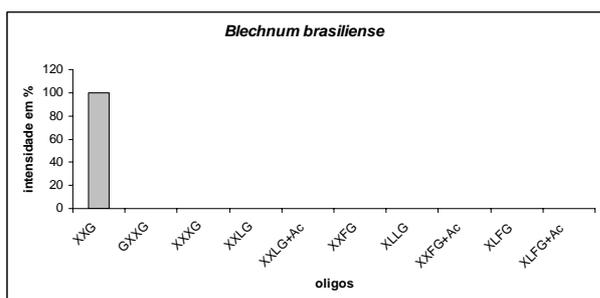
**Figura 7:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Sticherus bifidus*.



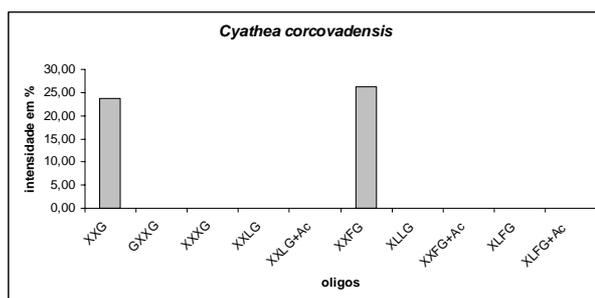
**Figura 8:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Serpocaulon catharinae*.



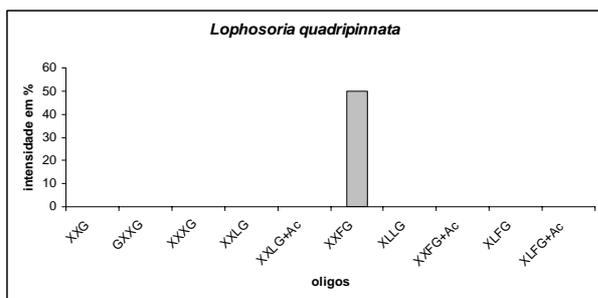
**Figura 9:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Cyathea delgadii*.



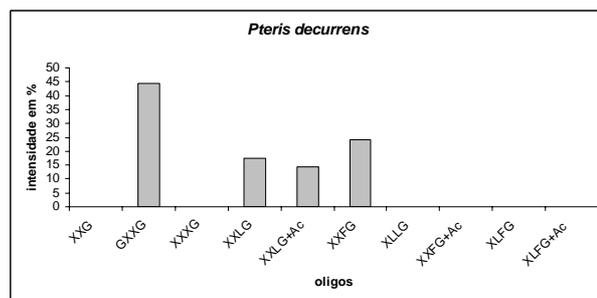
**Figura 10:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Blechnum brasiliense*.



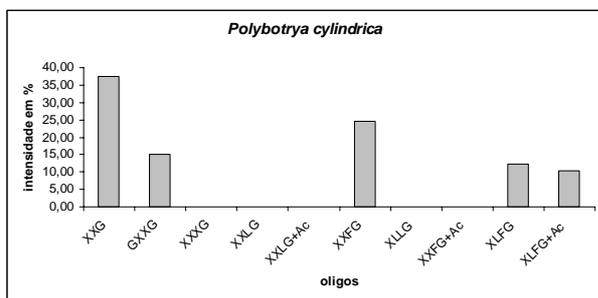
**Figura 11:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Cyathea corcovadensis*.



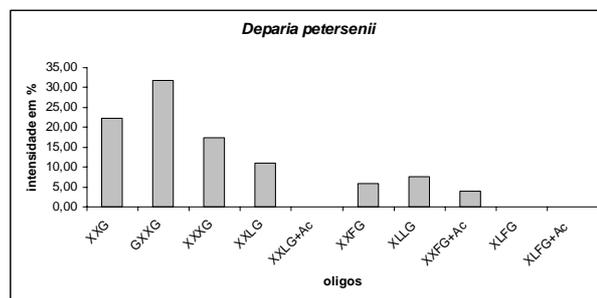
**Figura 12:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Lophosoria quadripinnata*.



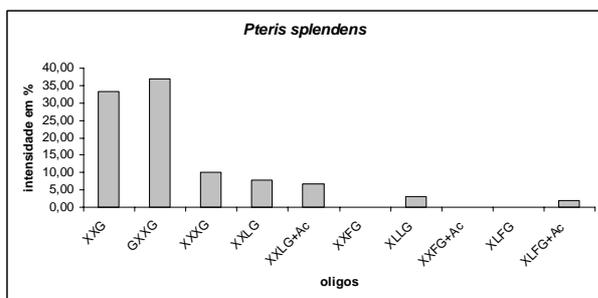
**Figura 13:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pteris decurrens*.



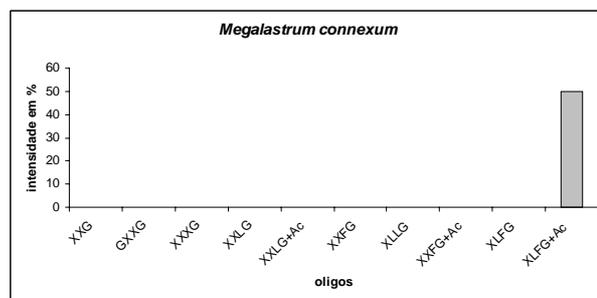
**Figura 14:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Polybotrya cylindrica*.



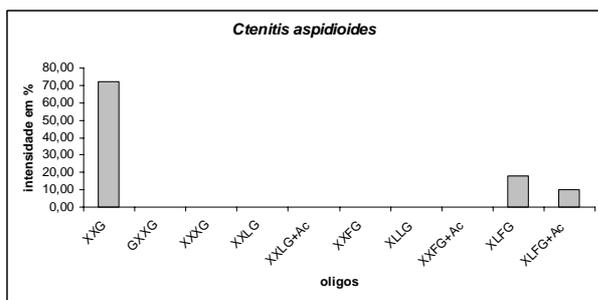
**Figura 15:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Deparia petersenii*.



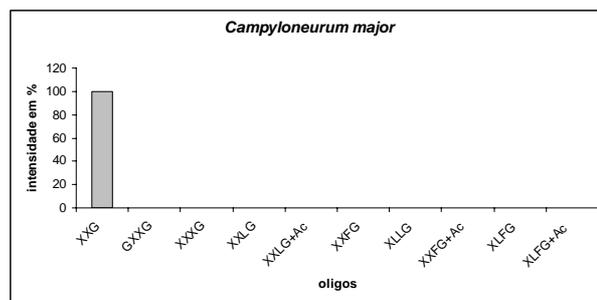
**Figura 16:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Pteris splendens*.



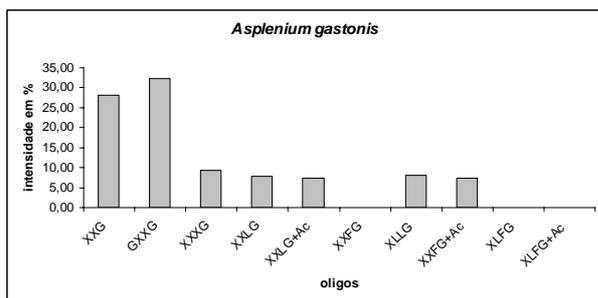
**Figura 17:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Megalastrum connexum*.



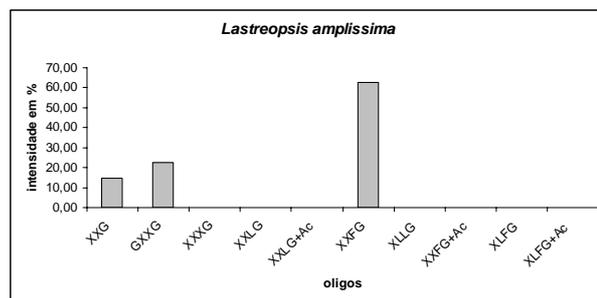
**Figura 18:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Ctenitis aspidioides*.



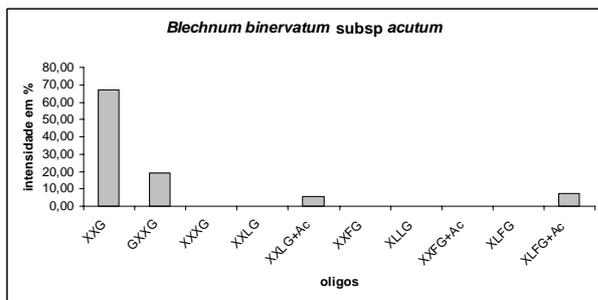
**Figura 19:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Campyloneurum major*.



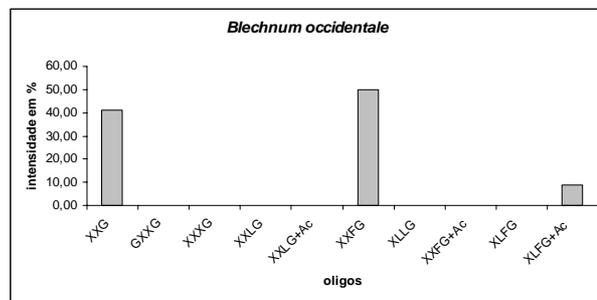
**Figura 20:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Asplenium gastonis*.



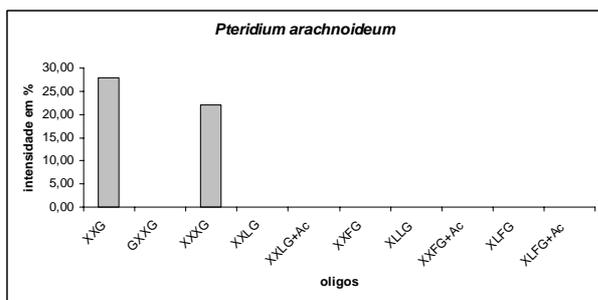
**Figura 21:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Lastreopsis amplissima*.



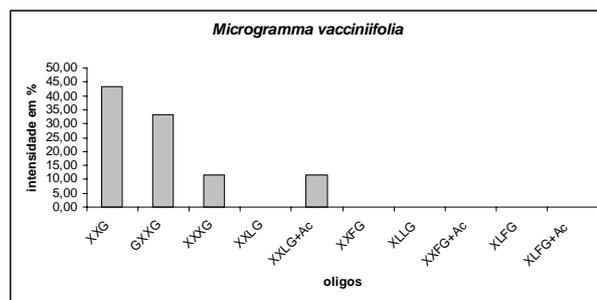
**Figura 22:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Blechnum binervatum subsp acutum*.



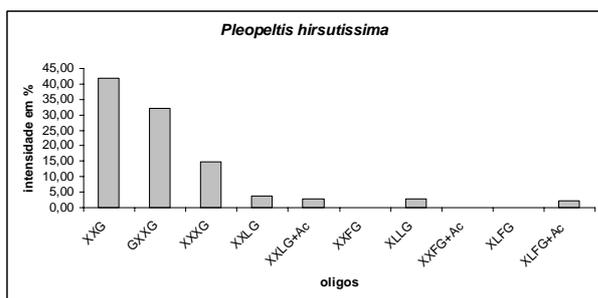
**Figura 23:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Blechnum occidentale*.



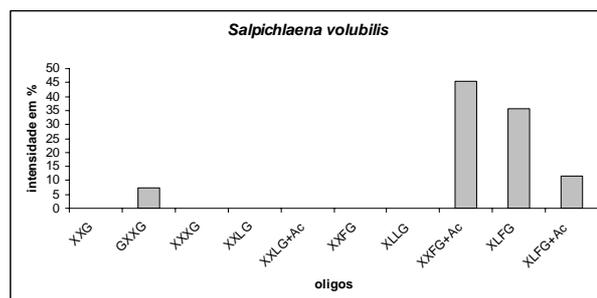
**Figura 24:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Pteridium arachnoideum*.



**Figura 25:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Microgramma vacciniifolia*.



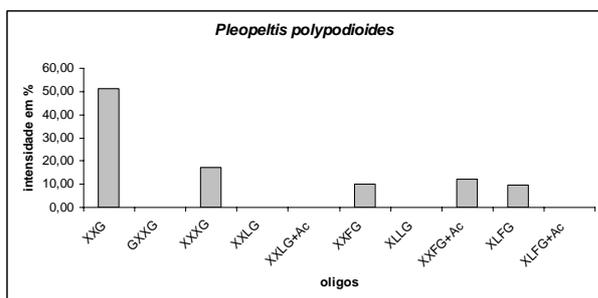
**Figura 26:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Pleopeltis hirsutissima*.



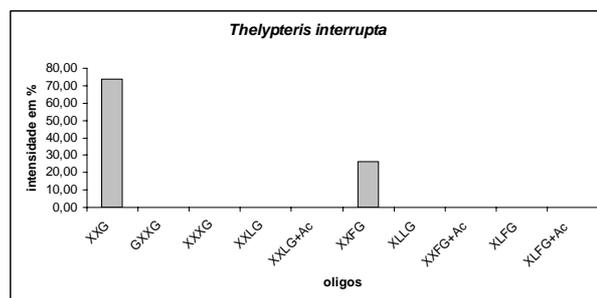
**Figura 27:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis *Salpichlaena volubilis*.

Em *Lomagramma guianensis*, planta também coletada no Pefi, não foram encontrados oligossacarídeos de xiloglucano.

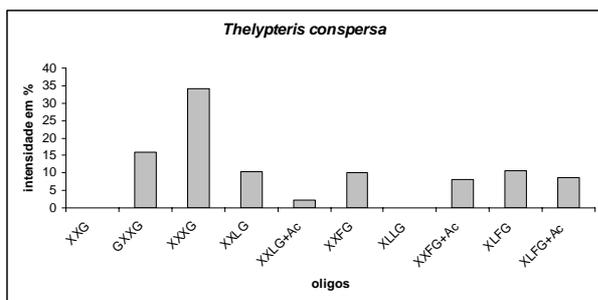
Plantas coletadas na região do Jardim Botânico de Bauru:



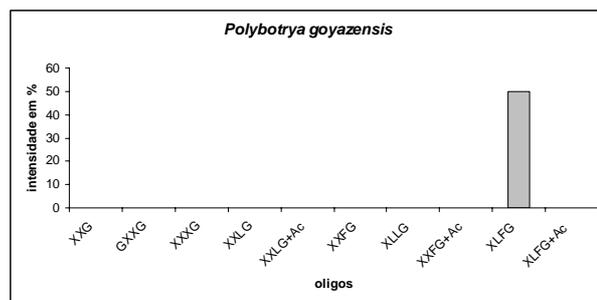
**Figura 28:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pleopeltis polypodioides*.



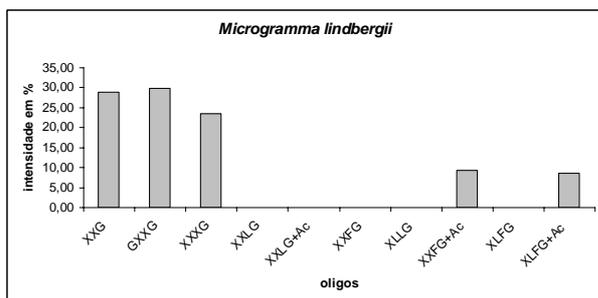
**Figura 29:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Thelypteris interrupta*.



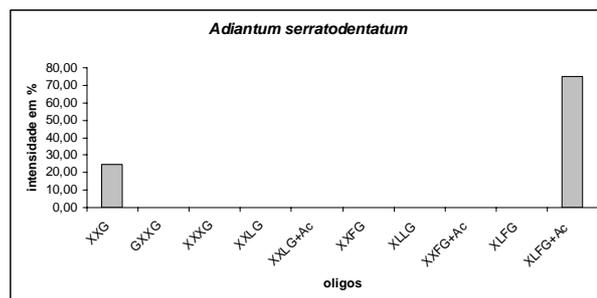
**Figura 30:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Thelypteris conspersa*.



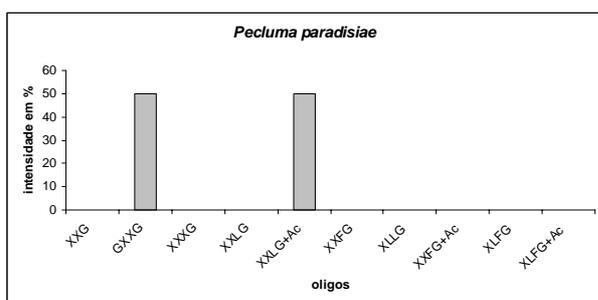
**Figura 31:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Polybotrya goyazensis*.



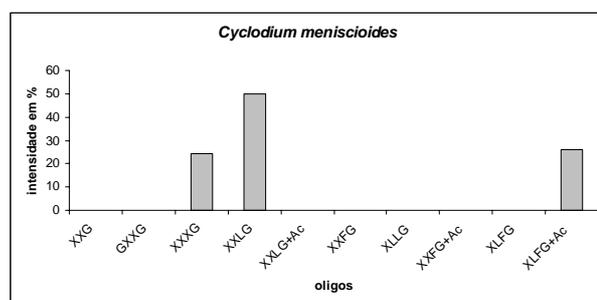
**Figura 32:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Microgramma lindbergii*.



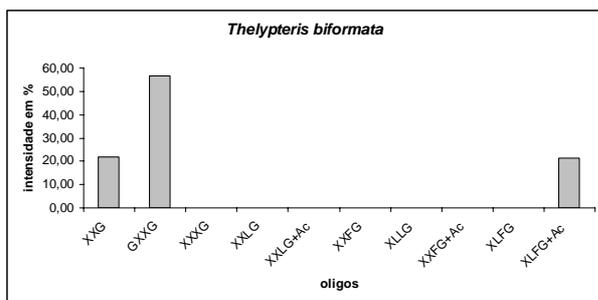
**Figura 33:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantum serratodentatum*.



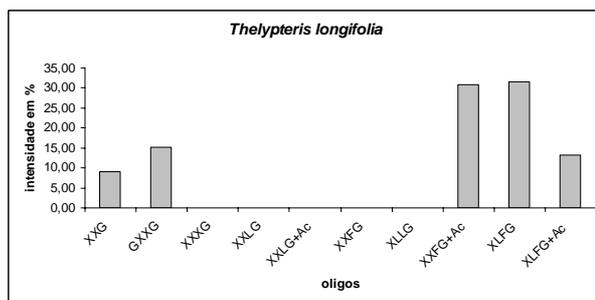
**Figura 34:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pecluma paradisiae*.



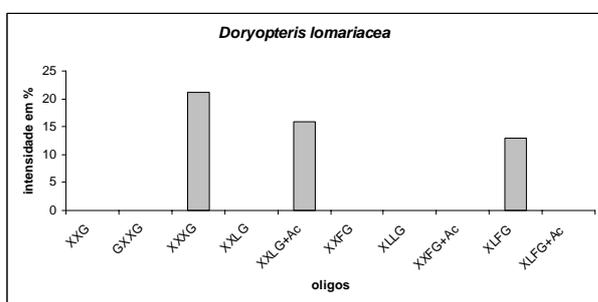
**Figura 35:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Cyclodium meniscioides*.



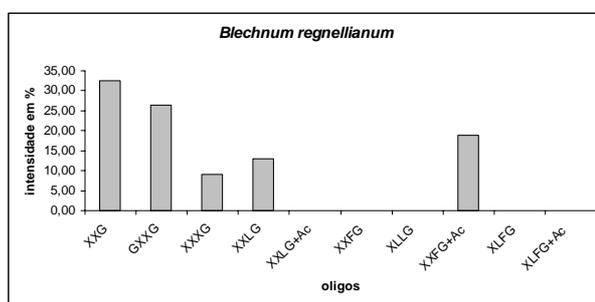
**Figura 36:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Thelypteris biformata*.



**Figura 37:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Thelypteris longifolia*.



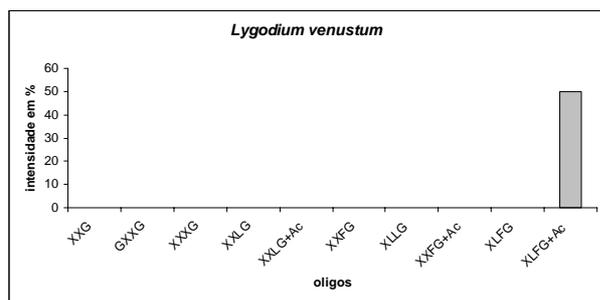
**Figura 38:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Doryopteris lomariacea*.



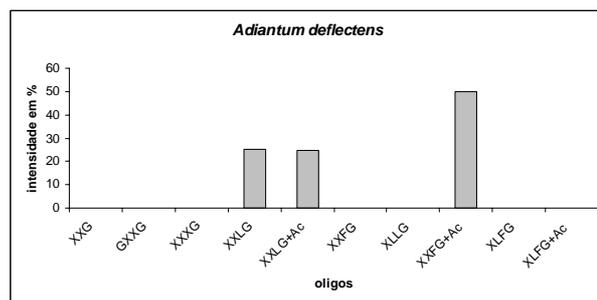
**Figura 39:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Blechnum regnellianum*.

*Blechnum imperiale*, *Doryopteris concolor*, *Serpocaulon latipes* e *Thelypteris opposita*, coletadas no Jardim Botânico de Bauru, não apresentaram oligossacarídeos de xiloglucano.

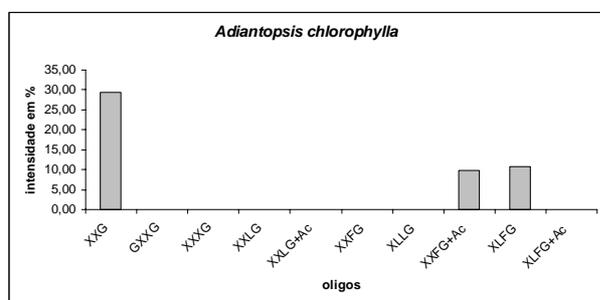
Plantas coletadas na Fazenda Castelo da Jaguará e Fazenda Cauaia, Lapa do Santo, Matozinhos, MG:



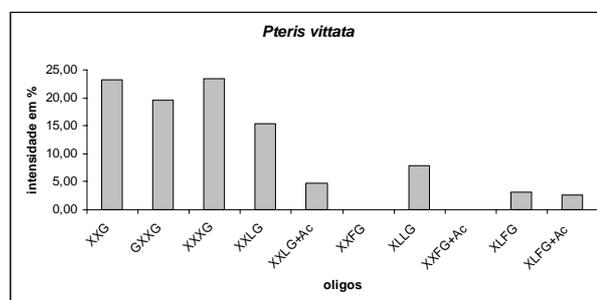
**Figura 40:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Lygodium venustum*.



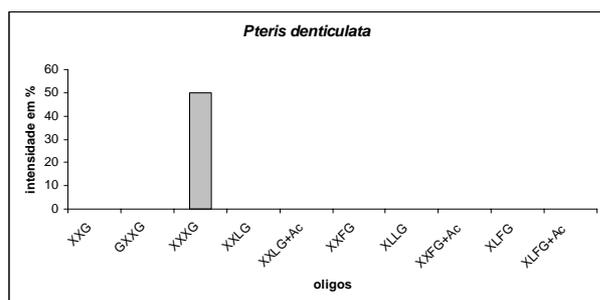
**Figura 41:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantum deflectens*.



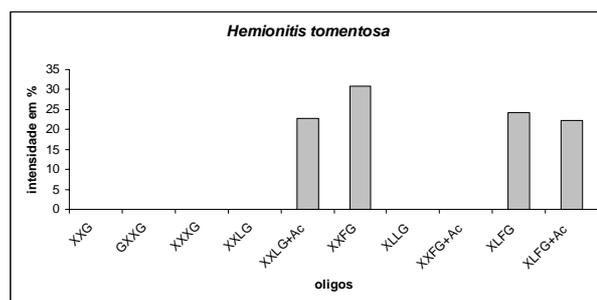
**Figura 42:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantopsis chlorophylla*.



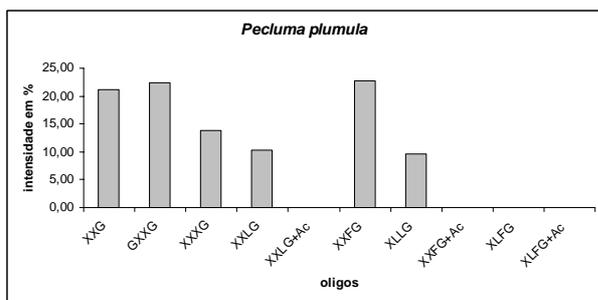
**Figura 43:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pteris vittata*.



**Figura 44:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pteris denticulata*.



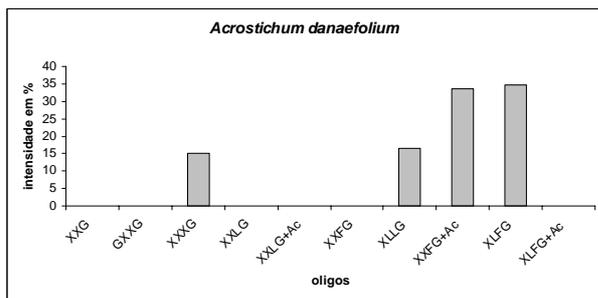
**Figura 45:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Hemionitis tomentosa*.



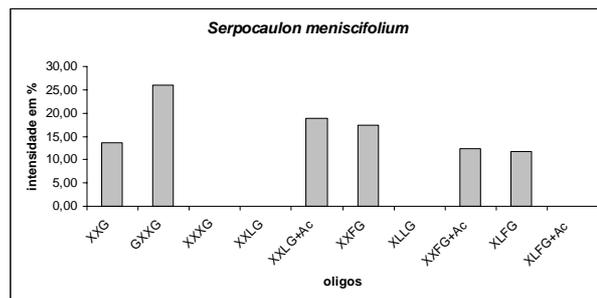
**Figura 46:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Pecluma plumula*.

*Macrothelypteris torresiana*, coletada em Matozinhos, MG, não apresentou oligossacarídeos de xiloglucano.

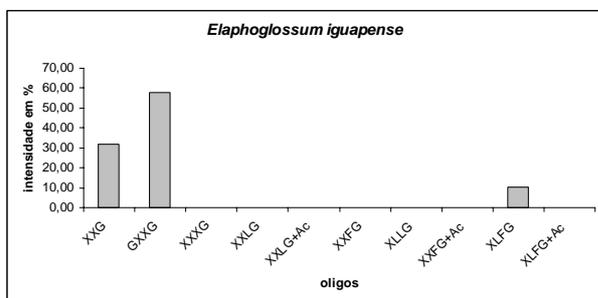
Plantas coletadas na RPPN (Reserva Particular do Patrimônio Natural “El Nagnal”), em Magé, RJ:



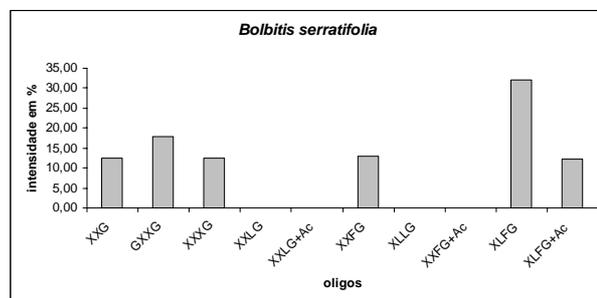
**Figura 47:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Acrostichum danaefolium*.



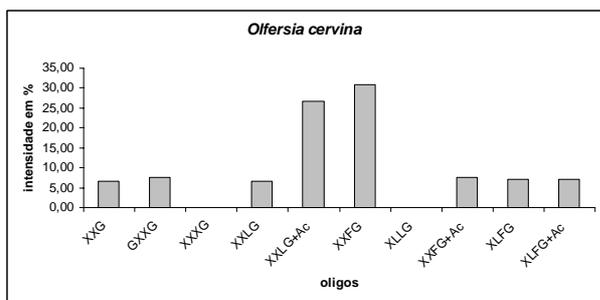
**Figura 48:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Serpocaulon meniscifolium*.



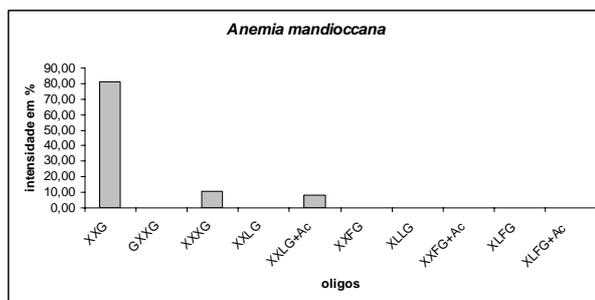
**Figura 49:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Elaphoglossum iguapense*.



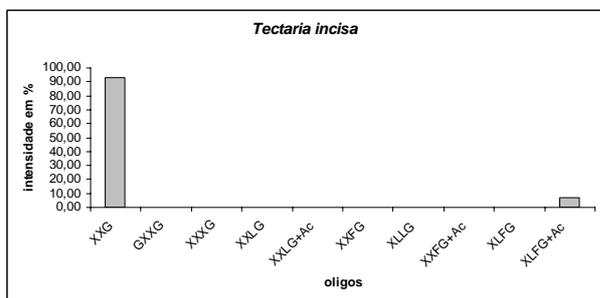
**Figura 50:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Bolbitis serratifolia*.



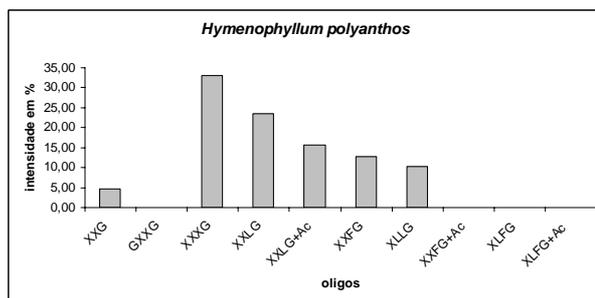
**Figura 51:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Olfersia cervina*.



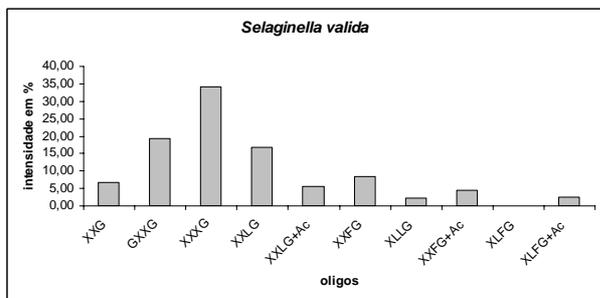
**Figura 52:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Anemia mandioccana*.



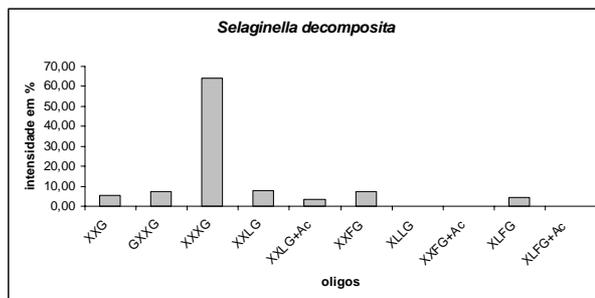
**Figura 53:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Tectaria incisa*.



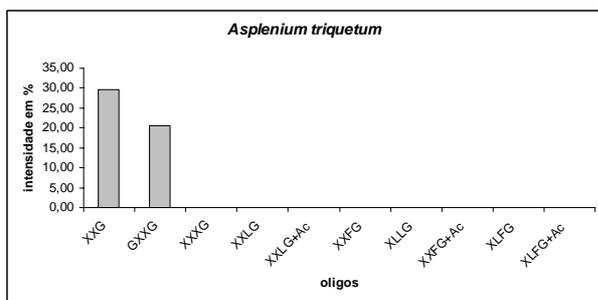
**Figura 54:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Hymenophyllum polyanthos*.



**Figura 55:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Selaginella valida*.



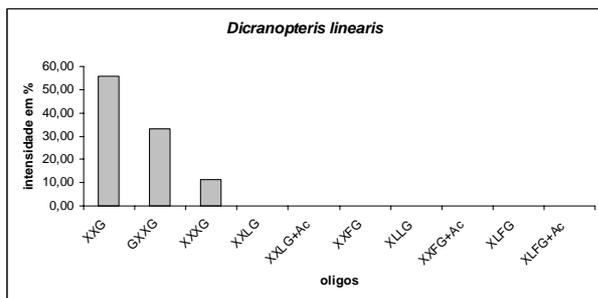
**Figura 56:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Selaginella decomposita*.



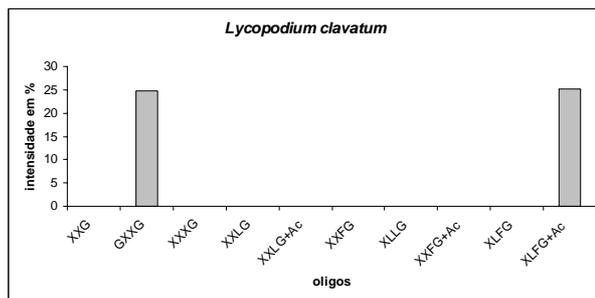
**Figura 57:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Asplenium triquetum*.

*Trichomanes rigidum*, coletada em Magé, RJ, não apresentou oligossacarídeos de xiloglucano.

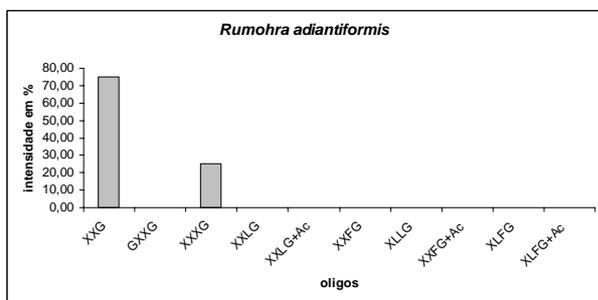
Plantas coletadas no Parque Natural dos Aparados da Serra em Cambará do Sul, RS. Floresta de Araucária, campos e floresta pluvial atlântica:



**Figura 58:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Dicranopteris linearis*.

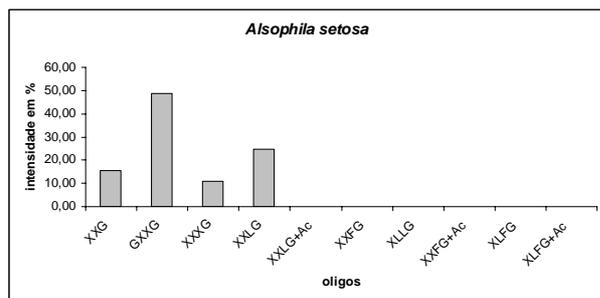


**Figura 59:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Lycopodium clavatum*.

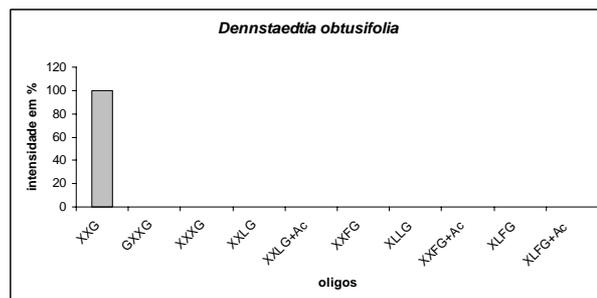


**Figura 60:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas *Rumohra adiantiformis*.

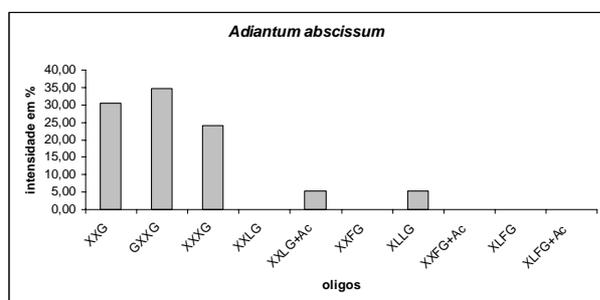
Plantas coletadas em São José do Rio Preto, SP e em Sorocaba, SP. Mata seca semi-decídua:



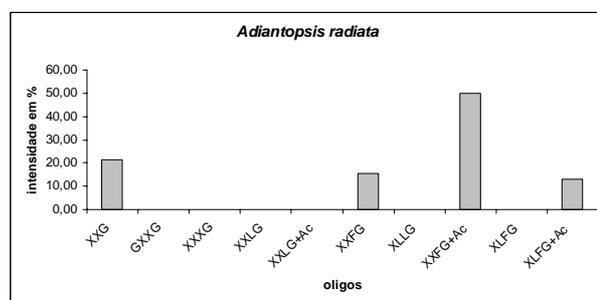
**Figura 61:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Alsophila setosa*. (Planta coletada na região de Sorocaba).



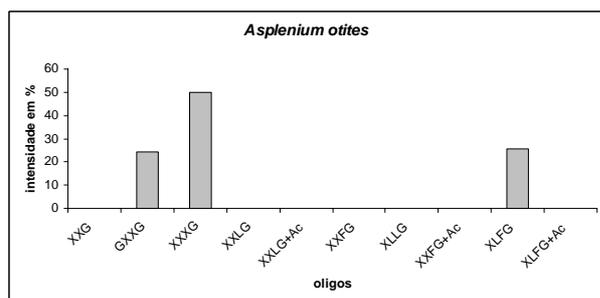
**Figura 62:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Dennstaedtia obtusifolia*.



**Figura 63:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantum abscissum*.



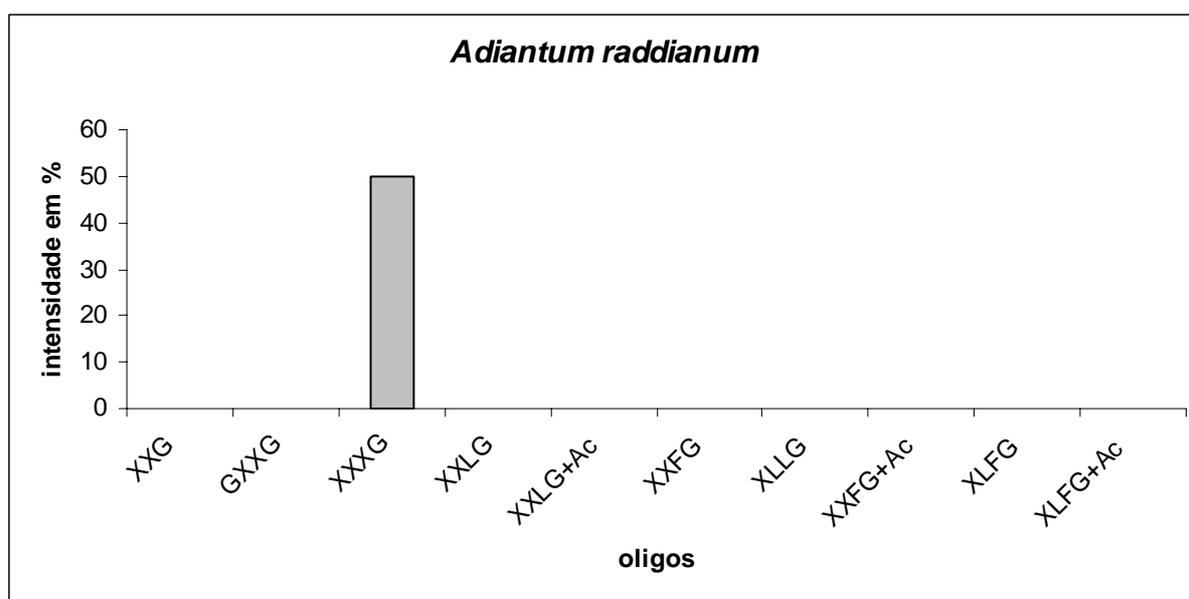
**Figura 64:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantopsis radiata*.



**Figura 65:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Asplenium otites*.

### Interação entre as hemiceluloses na parede celular e o acesso das enzimas aos polímeros:

Os resíduos de açúcar encontrados na análise de ligação de *Adiantum raddianum*, uma espécie coletada durante a dissertação de mestrado e que continuou sendo investigada durante o doutorado, confirmam a presença de um xiloglucano. Continuando a investigação dos oligossacarídeos presentes nessa espécie, o pó das frondes de *Adiantum raddianum*, também foi levado para análise em Maldi-Tof.



**Figura 66:** Porcentagem dos oligossacarídeos provenientes da digestão com celulase de folhas estéreis de *Adiantum raddianum*.

Foi efetuado um teste com o objetivo de comparar os dados obtidos com a técnica de Maldi-tof e metilação, utilizando a espécie *Adiantum raddianum*. Para isto, folhas estéreis de *A. raddianum* foram submetidas ao mesmo tratamento utilizado as 67 espécies utilizadas neste estudo, ou seja extração inicial dos açúcares solúveis seguido de hidrólise com celulase e subsequente análise por Maldi-Tof. De acordo com os resultados encontrados nestas análises, observamos que foi possível detectar a presença de apenas um oligossacarídeo de xiloglucano, XXXG. Esse resultado corrobora, de certa maneira, os resultados encontrados com a análise de ligação, onde foram encontrados resíduos dos açúcares xilose e glucose, os mesmos açúcares encontrados na composição desse oligossacarídeo, encontrado na análise por Maldi-Tof. Como a enzima utilizada nessa metodologia foi a celulase de *Trichoderma*, não foi possível detectar a presença de oligossacarídeos de mananos, pois os padrões ainda não são conhecidos.

No entanto, a análise estrutural do xiloglucano da mesma espécie revelou características compatíveis com a existência de outros oligossacarídeos além do XXXG. Nas

análises por metilação, carboidratos que diagnosticam a presença de xiloglucano fucosilado (4-glc, 4,6-glc, t-xil, 2-xil, t-gal e t-fuc), ao utilizar a celulase de *Trichoderma* para hidrolisar a parede celular intacta, apenas XXXG foi obtido.

Estes dados mostram que o uso da celulase diretamente sobre a parede celular, que ainda preserva, pelo menos em parte, a sua arquitetura original, não revela a estrutura fina do xiloglucano na parede, mas somente as partes da molécula que são acessíveis à enzima. É possível que a interação entre os diferentes polissacarídeos que formam o compósito original da parede tenha interferido na ação da celulase, o que não acontece quando se faz o fracionamento com álcali e se separam as frações da parede. A comparação entre os padrões de oligossacarídeos obtidos por procedimentos diferentes, como metilação e HPAEC-PAD, gera compostos completamente diferentes.

Esses dados sugerem que a interação com outros polissacarídeos, o que é maior na parede intacta, parece ser importante na manutenção do acesso ao xiloglucano na parede celular das samambaias e licófitas. Porém, a presença de maiores ou menores teores de manose (de mananos) e glucose e xilose (xiloglucanos) não parece se correlacionar com o padrão de hidrólise de materiais obtidos por métodos.

Algumas espécies não apresentaram oligossacarídeos de xiloglucano, pelo menos aqueles mais comumente encontrados em dicotiledôneas, ou seja, pertencentes à família XXXG. Um dos resultados que chamou atenção durante as análises de Maldi-tof foi a ausência de atividade da XEG (Xiloglucano-endo-glucanase), uma enzima específica para a digestão de xiloglucano (Pauly *et al.* 1999). Mesmo após várias tentativas e adaptações na metodologia, a XEG continuava sem atividade e não foi possível observar oligossacarídeos de xiloglucano utilizando essa enzima. Após a digestão com celulase de *Trichoderma*, uma enzima menos específica para xiloglucano, e que é capaz de atacar outros polissacarídeos como os mananos (McCleary, 1986, Macarrón *et al.* 1996), foi possível observar oligossacarídeos de xiloglucano que parecem pertencer à família XXXG.

Uma possível explicação para a ausência de atividade de XEG e presença de atividade de celulase é que como a última é menos específica ela pode ter hidrolisado alguma outra hemicelulose presente na parede celular dessas plantas (mananos? beta-glucanos?) e que quando em interação com o xiloglucano impedem o ataque pela XEG. Para avançar nesses estudos e produzir evidências em favor ou contra esta hipótese, será necessário realizar estudos que enfoquem as outras hemiceluloses através do uso de mananases e liquenase (que ataca o beta-glucano).

Observando-se os espectros gerados pelo Maldi-Tof, notamos que todas as espécies analisadas apresentam picos que não puderam ser identificados e que apresentaram massa molecular menor do que os oligossacarídeos da família XXXG.

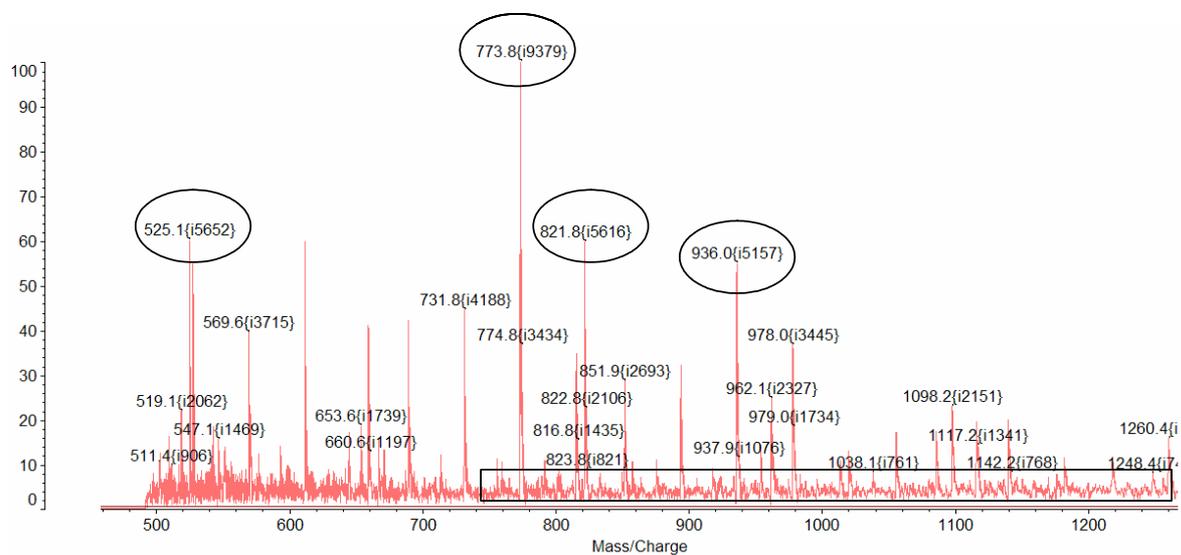


Figura 67: Espectro de Maldi-Tof de *Lygodium venustum*. Picos destacados com círculo não puderam ser identificados, quadro destaca a região em que foram encontrados os oligossacarídeos de xiloglucano.

O espectro mostrado na Figura 67 é de *Lygodium venustum*, uma das espécies coletadas em Matozinhos, MG. Alguns dos picos destacados com um círculo são oligossacarídeos que não puderam ser identificados, pois o Maldi-tof utilizado não possuía biblioteca para outros oligossacarídeos como os mananos, por exemplo. Porém, alguns picos correspondentes a xiloglucanos podem ser identificados  $m/z$  773=XL,  $m/z$  660=LG e estão presentes quando xiloglucanos de reserva são hidrolisados com celulase, como por exemplo  $m/z$  = 821 e 936, que são provavelmente LG acetilado e XLX respectivamente (Tiné et al. 2006).

Na análise dos dados obtidos com os diversos experimentos realizados, em quatro espécies particularmente, foi possível confrontar os resultados e observar as correlações. São elas: *Lygodium venustum* (Matozinhos, MG), *Lophosoria quadripinnata* (São Paulo, SP), *Thelypteris opposita* (Bauru, SP) e *Trichomanes rigidum* (Magé, RJ), sendo que cada uma de um local de coleta diferente.

*Lygodium venustum* apresentou uma quantidade significativa de manose na análise de monossacarídeos feita em HPAEC-PAD, na fração NaOH 8M, (38,51%) e quando essa espécie foi analisada em Maldi-tof, foi possível identificar apenas um oligossacarídeo de xiloglucano (XLFG + Ac). *Lophosoria quadripinnata* apresentou 29,46% de manose na fração 4M e 41,70% de manose na fração 8M, na análise de Maldi-tof apresentou apenas um

oligossacarídeo de xiloglucano (XXFG). Nessas duas espécies as evidências sugerem a presença de um tipo de manano como principal hemicelulose da parede celular e apesar da presença de um oligossacarídeo de xiloglucano, o fato de ter sido possível observar apenas um membro da família XXXG é um forte indício de uma presença menos relevante de um xiloglucano na parede celular dessas plantas.

Já em *Thelypteris opposita* a porcentagem de manose na fração 4M foi de 18,60%, apesar de não ser tão elevada como as anteriores, ainda assim é mais elevada que o padrão comparativo (jatobá). Na fração 8M essa porcentagem aumentou para 27,14, e na análise de Maldi-tof não foram detectados oligossacarídeos de xiloglucano, assim como em *Trichomanes rigidum*, porém nessa espécie a porcentagem de manose na fração 4M foi bastante elevada (39,83%), e na fração 8M foi menor porém ainda significativa (18,56%). Essas duas últimas espécies possuem fortes indícios de que a principal hemicelulose da parede celular é um manano.

Não se pode descartar a hipótese de que os xiloglucanos em espécies em que coexistem com mananos, o acesso da celulase ao xiloglucano seja restrito. Uma evidência de que isto pode ocorrer é a comparação entre os resultados obtidos com *Adiantum raddianum* pelos métodos de fracionamento e Maldi-tof, mencionados e discutidos acima.

Uma conclusão que se pode tirar até aqui é que a metodologia de espectrometria de Maldi-tof combinada com o ataque enzimático direto (sem fracionamento) à parede celular, permite apenas uma visão parcial da estrutura dos polímeros da parede, notadamente o xiloglucano.

Com isto, o que se avalia quando se examinam dados como os que serão discutidos a seguir sobre um grande número de espécies submetidas à hidrólise enzimática seguida de análise espectrométrica por Maldi-tof, são características mais relacionadas à arquitetura da parede e da relação entre os polímeros hemicelulósicos. Não se deve deduzir, neste caso, a estrutura de polímeros com estes dados.

#### Análises por regiões de origem da coleta:

Como as coletas de plantas foram efetuadas em diferentes regiões, pode-se efetuar uma comparação do que foi encontrado em termos de estrutura fina dos xiloglucanos, conforme a coleta realizada. A figura abaixo mostra os pontos aproximados onde tais coletas foram realizadas.

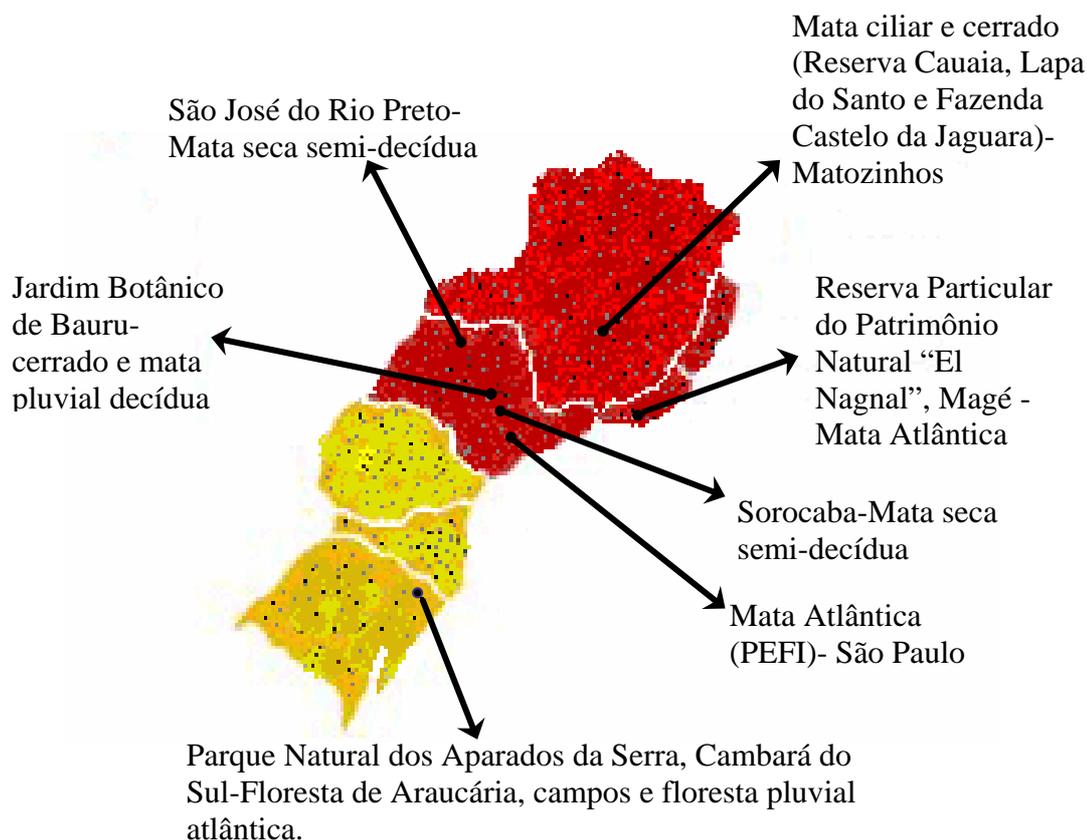


Figura 68: Locais das coletas realizadas.

Analisando as coletas separadamente (ver figuras 6 a 65), nota-se que na coleta feita no PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga), uma espécie, *Lomagramma guianensis* da família Dryopteridaceae, não apresentou oligossacarídeos de xiloglucano. Nenhuma espécie dessa coleta apresentou todos os oligossacarídeos de xiloglucano e a maioria delas possui os oligossacarídeos que possuem pesos moleculares menores, como XXG, GXXG, XXXG e XXLG. Os oligossacarídeos fucosilados e acetilados como XXFG+Ac e XLFG+Ac foram os menos encontrados nessas espécies.

Na coleta feita em Bauru, três espécies tiveram em comum a ausência de oligossacarídeos de xiloglucano, *Serpocaulon latipes*, *Thelypteris opposita* e *Doryopteris concolor*, porém essas espécies pertencem a famílias diferentes, não atestando qualquer tendência devida a um agrupamento taxonômico. A maioria dos oligossacarídeos encontrados na análise por Maldi-Tof nessas plantas, também foi de menor peso molecular, mas entre elas, o oligossacarídeo XLFG+Ac foi mais encontrado, quando comparado com a coleta realizada no PEFI.

As plantas coletadas em Matozinhos, MG, estavam distribuídas em quatro famílias. Da família Lygodiaceae, *Lygodium venustum* apresentou apenas um oligo (XLFG+Ac).

*Macrothelypteris torresiana* não apresentou oligossacarídeos de xiloglucano. *Pecluma plumula* apresentou seis oligossacarídeos de xiloglucano, sendo que nenhum deles eram acetilados. *Adiantum deflexens*, *Adiantopsis chlorophylla*, *Pteris vittata*, *Pteris denticulata* e *Hemionitis tomentosa*, todas da família Pteridaceae, não apresentaram nenhuma similaridade na distribuição dos oligossacarídeos de xiloglucano, *Adiantum deflexens* e *Adiantopsis chlorophylla* apresentaram três oligos de xiloglucano, porém não eram os mesmo, *Pteris denticulata* foi a espécie que apresentou o maior número de oligossacarídeos de xiloglucano, seguida de *Hemionitis tomentosa*, enquanto *Pteris denticulata* apresentou apenas um fragmento compatível com a presença de oligossacarídeo de xiloglucano (XXXG).

Na coleta realizada em Magé RJ, uma reserva de Mata Atlântica, como a reserva do PEFI, foram coletadas plantas de oito famílias diferentes, Anemiaceae, Aspleniaceae, Dryopteridaceae, Hymenophyllaceae, Pteridaceae, Polypodiaceae, Selaginellaceae e Tectariaceae. *Acrostichum danaeifolium* da família Pteridaceae, apresentou quatro oligossacarídeos de xiloglucano, *Serpocaulon meniscifolium*, da família Polypodiaceae, apresentou seis oligossacarídeos de xiloglucano, *Elaphoglossum iguapense*, *Bolbitis serratifolia* e *Olfersia cervina*, todas da família Dryopteridaceae, não tiveram similaridade entre os oligossacarídeos encontrados, dos dez analisados, apenas três eram comuns às três espécies, XXG, GXXG e XLFG. *Hymenophyllum polyanthos* e *Trichomanes rigidum*, ambas da família Hymenophyllaceae, apresentaram resultados completamente diferentes, *Trichomanes rigidum*, não apresentou oligossacarídeos de xiloglucano enquanto *Hymenophyllum polyanthos*, tem seis oligossacarídeos de xiloglucano. *Selaginella valida* e *Selaginella decomposita*, da família Selaginellaceae, tiveram seis oligossacarídeos em comum, XXG, GXXG, XXXG, XXLG, XXLG+Ac e XXFG.

As plantas coletadas no Rio Grande do Sul pertencem a famílias diferentes. Mesmo assim é possível observar uma similaridade entre elas, ou seja, as três apresentaram oligossacarídeos de menor peso molecular.

As últimas plantas analisadas foram coletadas na região de São José do Rio Preto e uma delas (*Alsophila setosa*) foi coletada na região de Sorocaba. *Adiantum abscissum* e *Adiantopsis radiata*, ambas da família Pteridaceae não apresentaram similaridade entre os oligossacarídeos observados, elas possuíam apenas XXG em comum, sendo que esse oligossacarídeo foi o mais encontrado em todas as espécies analisadas.

Esta análise por origem mostrou que não houve tendências claras de agrupamentos relacionados à região geográfica onde estas espécies ocorrem ou em agrupamentos taxonômicos como famílias.

Estes dados confirmaram aqueles obtidos por Silva et al. (submetido – Anexo 3) de que não parece haver uma correlação entre a composição da parede celular e a taxonomia de samambaias e licófitas.

Além de tais tendências não serem observadas em relação à composição geral da parede celular, observou-se, mais especificamente, que a estrutura fina do xiloglucano também não reflete os agrupamentos taxonômicos atualmente aceitos para samambaias e licófitas (Pryer et al. 2001).

Para compreender melhor como as 67 espécies estudadas se agrupam de acordo com a estrutura fina de seus xiloglucanos, foi efetuado um estudo usando o pacote estatístico R para obter os coeficientes de Jaccard. Um dendrograma foi produzido em que houve agrupamentos de acordo com a similaridade estrutural dos xiloglucanos (Figura 69).

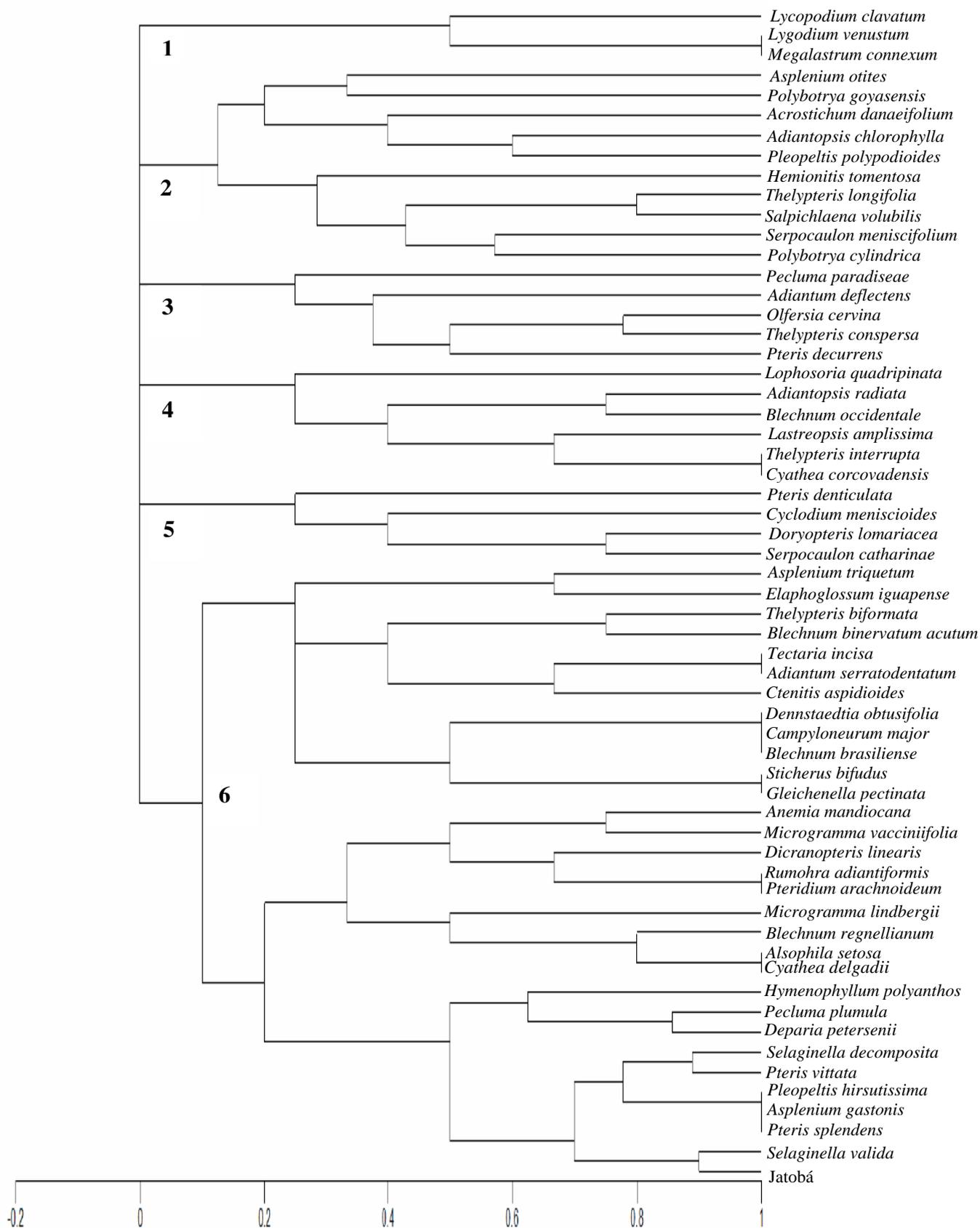


Figura 69: Dendograma obtido a partir dos resultados das análises de Maldi-tof, utilizando o pacote estatístico R project, os números indicados referem-se aos grupos formados. Os resultados desta análise revelaram a presença de seis grupos:

Grupo 1: formado por *Lycopodium clavatum*, *Lygodium venustum*, *Megalastrum connexum*;

Grupo 2: formado por *Asplenium otites*, *Polybotrya goyazensis*, *Acrostichum danaeifolium*, *Adiantopsis chlorophylla*, *Pleopeltis polypodioides*, *Hemionitis tomentosa*, *Thelypteris longifolia*, *Salpichlaena volubilis*, *Serpocaulon meniscifolium*, *Polybotrya cylindrica*;

Grupo 3: formado por *Pecluma paradiseae*, *Adiantum deflectens*, *Olfersia cervina*, *Thelypteris conspersa*, *Pteris decurrens*;

Grupo 4: formado por *Lophosoria quadripinnata*, *Adiantum raddianum*, *Blechnum occidentale*, *Lastreopsis amplissima*, *Thelypteris interrupta*, *Cyathea corcovadensis*;

Grupo 5: formado por *Pteris denticulata*, *Cyclodium meniscioides*, *Doryopteris lomariacea*, *Serpocaulon catharinae*;

Grupo 6: o maior grupo formado por: *Asplenium triquetum*, *Elaphoglossum iguapense*, *Thelypteris biformata*, *Blechnum binervatum* subsp. *acutum*, *Tectaria incisa*, *Adiantum serratodentatum*, *Ctenitis aspidioides*, *Dennstaedtia obtusifolia*, *Adiantopsis radiata*, *Campyloneurum major*, *Blechnum brasiliense*, *Sticherus bifidus*, *Gleichenella pectinata*, *Anemia mandioccana*, *Microgramma vacciniifolia*, *Dicranopteris linearis*, *Rumohra adiantiformis*, *Pteridium arachnoideum*, *Microgramma lindbergii*, *Blechnum regnellianum*, *Alsophila setosa*, *Cyathea delgadii*, *Hymenophyllum polyanthos*, *Pecluma plumula*, *Deparia petersenii*, *Selaginella decomposita*, *Pteris vittata*, *Pleopeltis hirsutissima*, *Asplenium gastonis*, *Pteris splendens*, *Selaginella valida* além do Jatobá (*Hymenaea courbaril*), utilizado como padrão. As espécies que não apresentaram oligossacarídeos não entraram nessa análise de agrupamento, nessa análise foi levada em consideração a semelhança entre as espécies utilizando os oligossacarídeos de xiloglucano obtidos com a análise de Maldi-tof.

Para facilitar a visualização dos diferentes tipos de oligossacarídeos que geraram os agrupamentos, foi construída uma tabela com todos os dados e à direita foram adicionados os detalhes relacionados aos grupos taxonômicos, bioma e porte das espécies.

A seguir (tabela 12) os resultados são mostrados em uma tabela que reúne todos os dados obtidos com a análise feita em Maldi-Tof. As diferentes coletas foram destacadas em cores diferentes.

Tabela 12- Dados obtidos com a análise dos oligossacarídeos de xiloglucano em MALDI-TOF das 68 espécies . As diferentes cores representam as diferentes coletas.

Espécies	Oligos de xiloglucano									
	XXG	GXXG	XXXG	XXLG	XXLG+Ac	XXFG	XLLG	XXFG+Ac	XLFG	XLFG+Ac
1- <i>Gleichenella pectinata</i>	91,2%	-	-	-	8,7%	-	-	-	-	-
2- <i>Sticherus bifidus</i>	79,4%	-	-	-	-	-	-	-	-	20,5%
3- <i>Serpocaulon catharinae</i>	14,5%	-	19,7%	50,0%	-	-	-	-	15,7%	-
4- <i>Cyathea delgadii</i>	59,4%	12,7%	10,9%	16,8%	-	-	-	-	-	-
5- <i>Blechnum brasiliense</i>	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6- <i>Cyathea corcovadensis</i>	23,7%	-	-	-	-	26,2%	-	-	-	-
7- <i>Lomagramma guianensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8- <i>Lophosoria quadripinnata</i>	-	-	-	-	-	50,0%	-	-	-	-
9- <i>Pteris decurrens</i>	-	44,3%	-	17,3%	14,2%	24,1%	-	-	-	-
10- <i>Polybotrya cylindrical</i>	10,7%	14,0%	14,8%	26,1%	-	-	23,8%	-	10,3%	-
11- <i>Deparia petersenii</i>	22,3%	31,7%	17,4%	11,0%	-	5,9%	7,6%	3,8%	-	-
12- <i>Pteris splendens</i>	33,2%	37,0%	10,0%	7,9%	6,8%	-	3,0%	-	-	1,8%
13- <i>Megalastrum connexum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0%
14- <i>Ctenitis aspidioides</i>	72,1%	-	-	-	-	-	-	-	17,6%	10,1%
15- <i>Campyloneurum major</i>	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16- <i>Asplenium gastonis</i>	28,0%	32,2%	9,2%	7,9%	7,2%	-	7,9%	7,2%	-	-
17- <i>Lastreopsis amplissima</i>	14,7%	22,6%	-	-	-	62,5%	-	-	-	-
18- <i>Blechnum binervatum subsp acutum</i>	67,2%	19,4%	-	-	5,8%	-	-	-	-	7,4%
19- <i>Blechnum occidentale</i>	41,1%	-	-	-	-	50,0%	-	-	-	8,9%
20- <i>Pteridium arachnoideum</i>	27,9%	-	22,0%	-	-	-	-	-	-	-
21- <i>Microgramma vacciniifolia</i>	43,4%	33,3%	11,5%	-	11,6%	-	-	-	-	-
22- <i>Pleopeltis hirsitissima</i>	41,7%	32,0%	14,7%	3,6%	2,8%	-	2,8%	-	-	2,1%
23- <i>Salpichlaena volubilis</i>	-	7,3%	-	-	-	-	-	45,4%	35,7%	11,3%
24- <i>Serpocaulon latipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25- <i>Pleopeltis polypodioides</i>	51,1%	-	17,0%	-	-	10,10%	-	12,18%	9,54	-
26- <i>Thelypteris interrupta</i>	73,7%	-	-	-	-	26,24	-	-	-	-
27- <i>Thelypteris conspersa</i>	-	15,8%	34,1%	10,3%	2,2%	10,19%	-	8,05%	10,70%	8,56%
28- <i>Thelypteris opposita</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29- <i>Polybotrya goyazensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0%	-
30- <i>Microgramma lindibergii</i>	28,8%	29,8%	23,4%	-	-	-	-	9,3%	-	8,5%
31- <i>Adiantum serratodentatum</i>	24,8%	-	-	-	-	-	-	-	-	75,1%
32- <i>Pecluma paradiseae</i>	-	50,0%	-	-	50,0%	-	-	-	-	-
33- <i>Cyclodium meniscioides</i>	-	-	24,1%	50,0%	-	-	-	-	-	25,8%
34- <i>Thelypteris biformata</i>	21,7%	56,7%	-	-	-	-	-	-	-	21,4%

Espécies	XXG	GXXG	XXXG	XXLG	XXLG+Ac	XXFG	XLLG	XXFG+Ac	XLFG	XLFG+Ac
35- <i>Thelypteris longifolia</i>	8,9%	15,2%	-	-	-	-	-	30,9%	31,5%	13,2%
36- <i>Doryopteris lomariacea</i>	-	-	21,2%	-	15,8%	-	-	-	12,9%	-
37- <i>Blechnum imperiale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38- <i>Blechnum regnellianum</i>	32,5%	26,5%	8,9%	12,9%	-	-	-	18,9%	-	-
39- <i>Doryopteris concolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40- <i>Lygodium venustum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0%
41- <i>Macrothelypteris torresiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42- <i>Adiantum deflectens</i>	-	-	-	25,3%	24,6%	-	-	50,0%	-	-
43- <i>Adiantopsis chlorophylla</i>	29,3%	-	-	-	-	-	-	9,8%	10,7%	-
44- <i>Pteris vittata</i>	23,2%	19,6%	23,3%	15,3%	4,8%	-	7,9%	-	3,0%	2,6%
45- <i>Pteris denticulate</i>	-	-	50,0%	-	-	-	-	-	-	-
46- <i>Hemionitis tomentosa</i>	-	-	-	-	22,6%	30,8%	-	-	24,2%	22,2%
47- <i>Pecluma plumula</i>	21,2%	22,3%	13,7%	10,3%	-	22,7%	9,5%	-	-	-
48- <i>Acrostichum danaeifolium</i>	-	-	15,0%	-	-	-	16,3%	33,7%	34,8%	-
49- <i>Serpocaulon meniscifolium</i>	13,5%	25,9%	-	-	18,9%	17,4%	-	12,2%	11,7%	-
50- <i>Elaphoglossum iguapense</i>	32,0%	57,6%	-	-	-	-	-	-	10,3%	-
51- <i>Bobbitis serratifolia</i>	12,3%	17,8%	12,4%	-	-	12,9%	-	-	32,1%	12,1%
52- <i>Olfersia cervina</i>	6,6%	7,4%	-	6,7%	26,6%	30,9%	-	7,4%	7,1%	6,9%
53- <i>Anemia mandiocana</i>	81,0%	-	10,7%	-	8,2%	-	-	-	-	-
54- <i>Tectaria incise</i>	93,3%	-	-	-	-	-	-	-	-	6,6%
55- <i>Hymenophyllum polyanthus</i>	4,6%	-	33,0%	23,5%	15,7%	12,6%	10,3%	-	-	-
56- <i>Trichomanes rigidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57- <i>Selaginella valida</i>	6,5%	19,2%	34,2%	16,7%	5,5%	8,2%	2,3%	4,6%	-	2,4%
58- <i>Selaginella decomposita</i>	5,5%	7,1%	63,9%	8,0%	3,5%	7,3%	-	-	4,4%	-
59- <i>Asplenium triquetum</i>	29,5%	20,4%	-	-	-	-	-	-	-	-
60- <i>Dicranopteris linearis</i>	55,8%	33,0%	11,1%	-	-	-	-	-	-	-
61- <i>Lycopodium clavatum</i>	-	24,8%	-	-	-	-	-	-	-	25,2%
62- <i>Rumohra adiantiformis</i>	74,8%	-	25,1%	-	-	-	-	-	-	-
63- <i>Alsophila setosa</i>	15,4%	48,6%	11,0%	24,8%	-	-	-	-	-	-
64- <i>Dennstaedtia obtusifolia</i>	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65- <i>Adiantum abscissum</i>	30,5%	34,7%	24,1%	-	5,3%	-	5,2%	-	-	-
66- <i>Adiantopsis radiata</i>	21,5%	-	-	-	-	15,5%	-	50,0%	-	12,8%
67- <i>Asplenium otites</i>	-	24,5%	50,0%	-	-	-	-	-	25,5%	-

Legenda: As diferentes cores representam as diferentes coletas.

Para poder visualizar possíveis correlações entre as características das paredes celulares das 67 espécies estudadas neste trabalho, foi construída a Tabela 13 em que se pode visualizar ao mesmo tempo os oligossacarídeos detectados a partir da ação da celulase seguida de espectrometria de massas e outros dados relacionados às características das espécies. Além disso, a seqüência das espécies foi arranjada na mesma ordem de formação dos grupos que têm similaridade (Figura 69). Foram adicionados dados sobre a taxonomia, habitat, hábito e ainda as proporções dos monossacarídeos manose e glucose nas frações 4M e 8M de NaOH obtidas por fracionamento completo.

Em uma primeira análise, não se pode ver relações claras entre os diferentes parâmetros adicionados à tabela e os padrões de oligossacarídeos de xiloglucanos obtidos. O que mais chama a atenção é o fato de que não há qualquer correlação entre estes padrões e a taxonomia de samambaias e licófitas. No caso do hábito, pouco pode ser dito, pois a grande maioria das espécies coletadas têm hábito herbáceo. Já no caso do bioma de origem, parece haver uma certa tendência para que grupos contendo maiores teores de XXFG+Ac, XLFG, XLFG+AC, ou seja, xiloglucanos mais fucosilados, ocorram no cerrado. Por outro lado, os xiloglucanos menos fucosilados, que apresentaram XXG, GXXG e XXLG, mostraram uma tendência a ocorrer em espécies provenientes de ambiente de mata.

Inserir tabelona do excel que vai ser tabela 13

## Discussão Geral e Conclusões:

### **Mananos e xiloglucanos nas paredes celulares de samambaias e licófitas:**

Em um trabalho anterior (Silva, 2005), foi levantada a hipótese de que na parede celular de folhas de samambaias e licófitas, um grupo se apresenta com uma grande quantidade de manano. Tal observação realça o fato de que paredes com mananos, que são normalmente encontrados em tecidos de reserva (Buckeridge et al. 2000b), ocorrem também em paredes celulares de samambaias, denotando um padrão único para paredes celulares primárias de folhas de plantas.

No presente trabalho, após a coleta de 67 espécies de samambaias e licófitas nativas brasileiras, 17 delas foram analisadas por fracionamento da parede celular com concentrações crescentes de NaOH. As proporções de monossacarídeos foram obtidas por análise por HPAEC-PAD e os resultados confirmaram observações anteriores de que a composição das paredes em samambaias e licófitas não corrobora a filogenia ou tem um relacionamento com a taxonomia dos grupos estudados (Silva et al. – Anexo 3).

Para compreender melhor a estrutura dos polissacarídeos de samambaias, tecidos de folhas estéreis da espécie *Adiantum raddianum* foram submetidas a fracionamento da parede e as frações foram analisadas por metilação. Os resultados confirmaram a presença de estruturas químicas similares às espermatófitas, com pectinas compostas de ácido galacturônico com ramificações neutras com galactanos altamente ramificados. Estes galactanos, porém, apresentam ligações predominantemente no carbono 2, o que é distinto do que tem sido encontrado para pectinas de eudicotiledôneas, os quais são geralmente do tipo 4- e 3,6- ligados.

No caso das hemiceluloses houve predomínio de alditóis acetatos metilados compatíveis com a existência de beta-1,4-mananos e xiloglucanos com estrutura bastante ortodoxa no que se refere às ligações glicosídicas. Apesar de beta-glucanos já terem sido encontrados em espécies de *Equisetum* (Fry et al. 2008), no caso de *A. raddianum* não há beta-glucanos, uma vez que não foi detectada a presença de 3-glc.

De fato, muitas das samambaias analisadas têm apresentado quantidades significativas de mananos (acima de 30%), como foi encontrado em *Adiantum raddianum*, uma espécie estudada anteriormente (Silva et al. Submetido – Anexo 3), e que continuou sendo investigada neste trabalho. Foram efetuados alguns experimentos com esta espécie que parecem confirmar a presença atípica de mananos em paredes celulares de algumas samambaias. Também foi levado em consideração o padrão comparativo utilizado até o momento, a leguminosa

*Hymenaea courbaril*, (jatobá), uma espécie que tem uma parede celular tipo I e que foi amplamente estudada. Nela a quantidade de manano encontrada, em média, no fracionamento feito com NaOH 4M é de aproximadamente 9%.

O foco principal deste trabalho foi nas hemiceluloses, moléculas que têm sido utilizadas para caracterizar as paredes celulares como tipo I ou II (Carpita & Gibeaut, 1993). No caso de *Adiantum raddianum*, bem como de diversas outras espécies (ver tabela 9) observou-se proporções relativamente altas de manose, um padrão que diferenciou dois grupos distintos (H1 e H2, Silva et al. Submetido – Anexo 3). Mananos e xiloglucanos parecem se alternar conforme a espécie, já que nas frações 4M das 17 espécies estudadas no presente trabalho o teor de manose é inversamente proporcional ao teor de glucose.

Por outro lado, não foi possível observar qualquer tendência que correlacione a presença ou ausência de monossacarídeos na parede celular com a filogenia ou com a classificação das espécies em diferentes grupos taxonômicos. Com isto, este trabalho estende as análises e corrobora a hipótese, levantada anteriormente por Silva et al. (submetido – Anexo 3), de que a composição da parede celular não se mostra adequada para a utilização em filogenia. Por outro lado, nossos dados sugerem que as paredes celulares de várias espécies de samambaias e licófitas são únicas, uma vez que apresentam proporções relativamente altas de mananos. As que chamaram maior atenção, com proporções em torno de 30%, vêm confirmando a hipótese de que as paredes celulares de algumas espécies de samambaias possuam uma parede diferenciada do que se conhece até o momento. Considerando a classificação proposta por Carpita & Gibeaut em 1993, que dividiram as paredes em Tipo I e II com base na presença de xiloglucanos e arabinosilanos/beta-glucanos respectivamente, as samambaias e licófitas parecem possuir muitas espécies com parede do Tipo I, com xiloglucano como principal componente e um outro grupo, denominado H2 por Silva et al. (Anexo 3), que contém um terceiro tipo de parede (Tipo III), cuja principal hemicelulose não seria nem um xiloglucano, nem um  $\beta$ -glucano, mas sim um manano. Existem poucos trabalhos que tratam da parede celular de samambaias e licófitas, porém existem alguns trabalhos que apontam para mudanças na composição das paredes celulares dessas plantas, relacionadas com a evolução e diversificação das plantas (Popper *et al.* 2008; Fry *et al.* 2008).

Como as samambaias atuais derivam de um grupo bastante antigo, a existência de múltiplos grupos com paredes celulares ora contendo xiloglucano, ora xiloglucano e mananos e ora beta-glucanos (Fry *et al.* 2008) sugere que a formação e manutenção da parede celular nos vegetais possa funcionar de uma forma modular, sendo que as espécies teriam o potencial para sintetizar todas as hemiceluloses conhecidas (mananos, xiloglucanos, arabinosilanos, beta-glucanos e etc), mas que o controle de qual polímero será colocado em que posição na

parede e no tecido depende mais de controles relacionados ao metabolismo vegetal e finalmente aos padrões de expressão dos genes ligados ao metabolismo da parede celular.

A ocorrência de mananos na parede primária é intrigante. Estes polímeros, quando menos ramificados, normalmente conferem dureza à parede e têm sido vistos como componentes importantes em tecidos onde a rigidez é importante, como no caule em desenvolvimento de araucária (Bocchichio, 2003) e em sementes de várias espécies de mono e eudicotiledôneas (Buckeridge et al. 2000a).

No caso das folhas de samambaias e licófitas, observamos que ao tentar hidrolisar as paredes diretamente com XEG (xiloglucano-endo-glucosidase), uma enzima altamente específica para xiloglucanos (Pauly et al. 1999), não houve ataque da enzima, ainda que outros substratos, como paredes de folhas de arábido e jatobá (ambas eudicotiledôneas) tenham sido hidrolisados por esta enzima. Por outro lado, a hidrólise com celulase de *Trichoderma* sp. produziu oligossacarídeos cujas massas puderam ser identificadas como de compostos provenientes do xiloglucano, mostrando que esta hemicelulose está presente em paredes de samambaias e licófitas, mas que o acesso da enzima aos polímeros é restrito. No caso de *A. raddianum* e várias outras espécies, ficou nítido que os monossacarídeos produzidos a partir de hemicelulose obtida por fracionamento alcalino ou por hidrólise direta da parede rendem monossacarídeos que podem constituir oligossacarídeos bem diferentes, o que sugere que o acesso ao xiloglucano poderia ser limitado pela presença de manano na parede celular.

Pode-se especular que a combinação dos dois polímeros, gerando restrição à hidrólise, constitui uma ferramenta extremamente útil como mecanismo de defesa ao ataque de patógenos que utilizam a hidrólise da parede para obter acesso ao tecido vegetal. Uma predição desta hipótese é que as espécies que possuem mananos na parede celular apresentariam maior resistência ao ataque de patógenos. Porém, para comprovar ou não esta hipótese ainda serão necessários muitos estudos sobre a fisiologia da parede celular de samambaias e licófitas.

### **Análises por agrupamentos utilizando xiloglucanos:**

Com a análise desses resultados obtidos com o Maldi-tof, além dos dados obtidos com o fracionamento de parede celular e análise dos monossacarídeos resultantes, para 67 espécies de samambaias e licófitas, já é possível afirmar com maior embasamento que esse grupo possui uma parede celular diferente.

Confrontando os resultados da análise de monossacarídeos por HPAEC-PAD com os resultados obtidos com Maldi-tof, por mais que não tenha sido possível fazer ambas análises para todas as espécies, pode-se afirmar que todas elas possuem uma mistura de hemiceluloses na parede celular. Com a análise de monossacarídeos observou-se que algumas espécies apresentavam uma quantidade bastante significativa de manose, e outras apresentavam quantidades menores, porém, todas elas apresentaram alguma manose. Outras espécies apresentaram quantidades mais significativas de xilose e galactose, monossacarídeos que constituem o xiloglucano, mas nem todas as espécies que apresentaram proporções elevadas de xilose e galactose têm fucose em suas composições. Esta última é um monossacarídeo constituinte do xiloglucano de parede primária, mas sabe-se que alguns xiloglucanos não apresentam fucose, mesmo em paredes primárias (Braccini *et al.* 1995).

Nas samambaias e licófitas, embora essas proporções variassem de acordo com a espécie, todas apresentaram manose, galactose e xilose, um forte indício de que há uma mistura de hemiceluloses na parede celular dessas plantas. Outros dados que corroboram essa hipótese são os obtidos com Maldi-tof que, como foi explicado nos resultados, apresentaram uma baixa proporção de oligossacarídeos de xiloglucano.

Esses dados indicam fortemente que existe um tipo de manano nas paredes celulares das samambaias e licófitas estudadas. Um trabalho realizado em 2000 com galactoglucomanos, afirma que essas hemiceluloses são componentes estruturais abundantes em paredes secundárias de gimnospermas e angiospermas, porém também têm sido encontradas em musgos e samambaias (Capek *et al.* 2000).

Finalmente, observando-se a análise de agrupamento, que utilizou os resultados obtidos com a análise de Maldi-Tof, que analisou apenas os oligossacarídeos de xiloglucano, constatou-se que esses dados não referendam a filogenia proposta por Pryer *et al.* (2001) e Smith *et al.* (2006), uma vez que os agrupamentos gerados pela análise de monossacarídeos formam grupos de táxons distintos daqueles resultantes nessas análises filogenéticas.

Uma das justificativas para esse fato é que os oligossacarídeos de xiloglucano talvez não sejam bons marcadores taxonômicos, nos níveis hierárquicos de classe, ordem e família. Mas talvez possam ser utilizados em níveis hierárquicos superiores, para separar samambaias e licófitas dos demais grupos de plantas vasculares, uma vez que a presença dos mananos em grandes quantidades na parede de samambaias seja algo realmente distintivo para o grupo.

Abaixo se pode observar a classificação recente para as samambaias atuais, um trabalho realizado por Smith *et al.* (2006). Neste trabalho foi dada maior ênfase às famílias de samambaias e a classificação foi feita utilizando-se dados morfológicos além de dados

moleculares de seqüenciamentos gênicos dos cloroplastos e do núcleo. Com essa nova classificação foram reconhecidas quatro classes, onze ordens e trinta e sete famílias.

Comparando-se o dendrograma obtido com os dados de oligossacarídeos (Figura 69) com a classificação proposta para as samambaias atuais (figura 70), foi possível constatar que os dados utilizados não corroboram a filogenia.

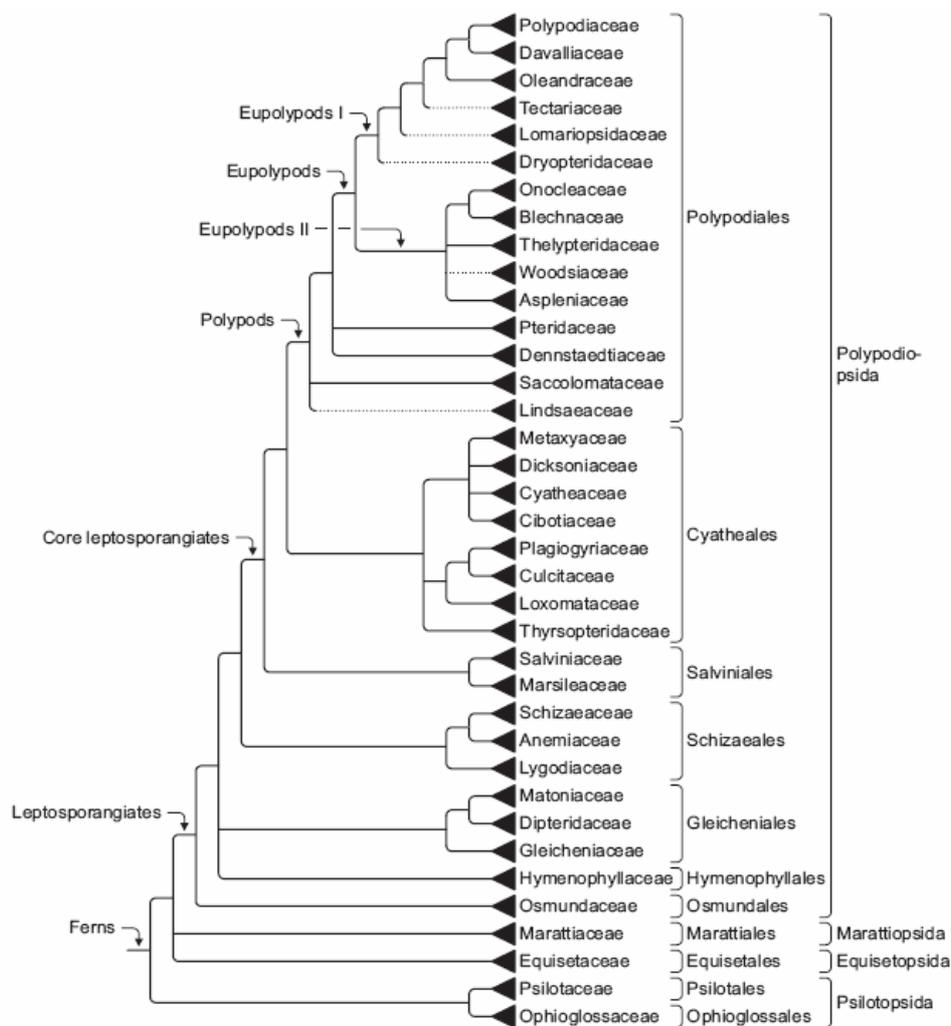


Figura 70: Filogenia das samambaias atuais, com ênfase para famílias, ordens e classes (copiado de Smith *et al.* 2006).

Na tabela 13, os dados foram agrupados de acordo com a ordem dada pelo dendrograma obtido com as análises de Maldi-Tof (figura 69), para melhor visualização dos oligossacarídeos presentes em cada espécie. A coluna “Família” mostra que a presença dos oligossacarídeos é aleatória e não referenda a filogenia neste nível hierárquico. Um dos motivos pelos quais os oligossacarídeos de xiloglucano não terem corroborado a filogenia atual do grupo pode estar relacionado à possibilidade desse caráter ter evoluído

independentemente diversas vezes nos diferentes grupos, aparecendo em grupos basais e tornando a aparecer em grupos derivados (Crayn *et al.* 2004). Essa hipótese ainda está sob investigação e o estudo da evolução dos polissacarídeos de parede celular ainda precisa ser mais aprofundado.

O significado funcional e evolutivo de tais descobertas ainda não é claro e levanta uma série de questões importantes a serem investigadas que, ao serem respondidas, auxiliarão substancialmente a compreensão dos padrões evolutivos das paredes celulares nas plantas vasculares. Como os mananos e suas variações moleculares estão normalmente envolvidos com fatores relacionados à resistência mecânica dos tecidos ou com o controle das relações hídricas, estas serão pistas importantes para investigações futuras com espécies de samambaias.

## Referências Bibliográficas:

- Acebes, J.L., Moral, R. & Zarra, I.** 1993. Purification and structure of xyloglucan in pine hypocotyls. *Phytochemistry* 33: 1343-1345.
- Aldington, S. & Fry, S.C.** 1993. Oligosaccharins. *Advances in Botanical Research*. Elsevier, London, 101p.
- Bailey, R.W.** 1971 Polysaccharides in the Leguminosae Pp.503-541. In *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (J.B.Harborne D.Boulte B.L.Turner eds). Academic Press, New York.
- Bohicchio, R.** 2003. Aspectos estruturais, interações e dinâmica de crescimento da parede celular de caules de gimnospermas nativas. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Braccini, I., Hervé du Penhoat, C., Michon, V., Goldberg, R., Clochard, M., Jarvis, M.C., Huang, Z-H. Gage, D.A.** 1995. Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharids using cellulase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydrate Research* 276: 167-181.
- Bremner, I & Wilkie, K.C.B.** 1971. The hemicellulose of Bracken. II. A galactoglucomannan. *Carbohydrate Research* 20: 193-203.
- Brett, C.T. & Waldron, K.W.** 1996. *Physiology and Biochemistry of plant cell walls*, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall, London.
- Buckeridge M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1990. Galactomannan from Brazilian legume 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* 86:145-151.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R., Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.C.** 1995. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochemistry* 38: 871-875.
- Buckeridge, M.S. Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. & Vieira, C.J.** 1997. A new family of xyloglucan oligosaccharides from cotyledons of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydrate Research* 303:233-237.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Santos, H.P. & Lima, D.U.** 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12(edição especial): 137-162.
- Buckeridge M.S., Rayon, C. , Urbanowicz, B. , Tiné, M.A.S 1 , & Carpita, N.C.** 2004. Mixed linkage (1-3),(1-4)-beta-D-glucans of grasses *Cereal Chemistry* 81: 115-127.

- Buckeridge, M. S.** (2006) Implications of emergence, degeneracy and redundancy for the modeling of the plant cell wall. In: Takahisa Hayashi. (Org.). The Science and the Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function. Boca Raton: BrownWalker Press, p. 41-47.
- Buckeridge, M.S. Cavalari, A.A., Silva, G.B.** 2008. Parede Celular. In: Fisiologia Vegetal, Gilberto B. Kerbauy (Ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro Cap. 9: 165-181.
- Capek, P.; Kubachová, M.; Alföldi, J.; Bilisics, L.; Lisková, D.; Kakoniová, D.** 2000. Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. Carbohydrate Research 329: 635-645.
- 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. & Shea, E. M.** 1989. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In Biermann CJ, McGinnis CD, Analysis of Carbohydrates by GLC and MS, pp 155-216, Boca Raton, FL, CRC press.
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, A.C.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. Plant Biology 101: 3703-3708.
- Darwin, C.** 2002. Origem das Espécies. 4a. Edição. Editora Itatiaia. Belo Horizonte. MG. 381p.
- Dahlgren, R., Clifford, H.T. & Yeo, P.F.** 1985. The families of monocotyledons. Springer Verlag, Berlin.
- Fry, S.C.** 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman, New York.
- Fry, S.C. & Popper, Z.A.** 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. Annals of Botany 91: 1-12.
- Fry, S.C., Sadler, I.H. & Popper, Z.A.** 2003. 3-O-Methylrhamnose in lower plant primary cell walls. Biochemical Systematics and Ecology 32: 279-289.
- Fry S.C., York W.S., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., Joseleau J.P., Kato Y., Lorences E.P., Maclachlan G.A., McNeil M., Mort A.J., Reid J.S.G., Seitz H.U., Selvendran R.R., Voragen A.G.J., White A.R.** 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Plant Physiology 89, 1-3.

- Fry SC, Mohler KE, Nesselrode BH, Franková L.** 2008. Mixed-linkage beta-glucan : xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from Equisetum (horsetails) and charophytic algae. *Plant Journal* 55(2):240-52.
- Gibeaut, D. M. & Carpita, N. C.** 1991. Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants—Selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. *Plant Physiology* 97: 551–561.
- Gorshkova,T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gobeaut, D.M., Ibragima, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C.** 1996. Cell wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110: 712-729.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J.** 2002. *Plant systematics, a phylogenetic approach*. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts.
- Keegstra, K., Talmadge, K. Baurer, W.D. & Albersheim, P.** 1973. Structure of the plant cell walls. *Plant Physiology* 51: 188-196.
- Kerbauy, G.B.** 2008. *Fisiologia Vegetal*. 2<sup>a</sup> Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 431p.
- Macarrón, R., Acebal, C., Castellón, MP. & Claeysens, M.** 1996. Mannanase activity of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* QM9414. *Biotechnology Letters* 18(5): 599-602).
- McCleary, B. V.** 1978. Modes of action of b-mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans. *Phytochemistry* 18: 757-763.
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P. & O’Neil, M.** 2004. Occurrence of primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonano II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology* 134: 1-13.
- Mayworm, M.A., Buckeridge, M.S. & Salatino, A.** 2000. Composition of polysaccharides of seed cel walls and taxonomy of Vochysiaceae. *Phytochemistry* 55: 581-587.
- McCann, M.C., & Roberts, K.** 1991. Architecture of the primary cell wall. Pp 109-129. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form* (C. W. Lloyd, ed). Academic Press London.
- Niklas, K.J.** 1997. *The evolutionary biology of plants*. The University of Chicago Press. Chicago. 449p.
- Pauly, M., Andersen, L.N., Kauppine, S., Kofod, L.V., Yourk, W.S., Albersheim, P., Darvill, A.** 1999. A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* 9: 93-100.

- Popper, Z.A. & Fry, S.C.** 2004. Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist* 164:165-174.
- Popper, Z.A.** 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Plant Biology* 11: 286-292.
- Prado, J.** 2004a. Criptógamas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Pteridophyta: Chave para as famílias; 2. Blechnaceae. *Hoehnea* 31: 1-10.
- Prado, J.** 2004b. Criptógamas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Pteridophyta : 8. Gleicheniaceae. *Hoehnea* 31: 33-38.
- Prado, J.** 2004c. Criptógamas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Pteridophyta: 17. Pteridaceae. *Hoehnea* 31: 39-50.
- Pryer, K.M., Sheneider, H. Smith, A.R., Cranfill, R., Wolf, P. G., Hunt, J.S. & Sipes, S.D.** 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409: 618-622.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2001. *Biologia Vegetal*. 6a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 728p.
- Reid, J.S.G. & Meier, H.** 1970. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomanann in leguminous seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 62: 89-92.
- Renard, C.M.G.C., Champenois, Y. & Thibault, J.F.** 1993. Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of glasswort, *Salicornia ramosissima*. *Carbohydrate Polymers* 22: 239-245.
- Roland, J. C. and B. Vian.** 1979. The wall of the growing plant cell: Its three-dimensional organization. *International Review of Cytology* 61: 129-166.
- Schneider, H., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Cranfill, R., Magallón, S. & Lupia, R.** 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428: 553-557.
- Shiga, T.M. & Lajolo, F.M.** 2006. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) – composition and structure. *Carbohydrate Polymers*. 63: 1-12.
- Silva, G. B.** 2005. A parede celular na Filogenia e Evolução de Pteridophytae. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H. & Wolf, P.G.** 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.
- Smith, B.G., & Harris, P.J.** 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochemistry Systematics and Ecology* 27: 33-53.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R.** 1973. Numerical taxonomy- The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and company. San Francisco. 14: 115-308.

- Stebbins, G.L.** 1974. Flowering Plants. Evolution above the species level. Edward Arnold Ltd., London.
- Tiné, M.A.S., Silva, C.O., Lima, D.U., Carpita, N.C. & Buckeridge, M.S.** 2006. Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. Carbohydrate Polymers 66: 444-454.
- Tryon, R.M. & Stolze, R.G.** 1989a. Pteridophyta of Peru. Part I. 1. Ophioglossaceae-12. Cyatheaceae. Fieldiana, Botany, new series 20: 1-145.
- Tryon, R.M. & Stolze, R.G.** 1989b. Pteridophyta of Peru. Part II. 13. Pteridaceae-15. Dennstaedtiaceae. Fieldiana, Botany, new series 22: 1-128.
- Vincken, J.P., York, W.S, Beldman, G. & Voragen A.G.J.** 1997. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. Plant Physiology, 114: 9-13.

## Anexos:

Anexo 1: Tabela binária para obtenção do dendograma através do software estatístico livre R project.

Anexo 2: Tabela da proporção de monossacarídeos na fração 4M de NaOH de *Adiantum raddianum*. Os dados foram obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

<b>monossacarídeos</b>	<b><i>Adiantum raddianum</i></b>
Fucose	1,7
Ramnose	1,6
Arabinose	3,9
Galactose	10,4
Glucose	26,2
Xilose	17,4
Manose	38,8

Anexo 3: Artigo submetido, Silva *et al.*