



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização parcial das enzimas envolvidas no
metabolismo de frutanos em raízes tuberosas de
Ichthyothere terminalis (Spreng.) Blake**

JULIANA MACÊDO SILVESTRE

**GOIÂNIA-GO
2015**

JULIANA MACÊDO SILVESTRE

**Caracterização parcial das enzimas envolvidas no
metabolismo de frutanos em raízes tuberosas de
Ichthyothere terminalis (Spreng.) Blake**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA-GO

2015

JULIANA MACÊDO SILVESTRE

**Caracterização parcial das enzimas envolvidas no
metabolismo de frutanos em raízes tuberosas de
Ichthyothere terminalis(Spreng.) Blake**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (presidente da banca)
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro
Universidade Estadual de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

Dedicatória

Dedico esse trabalho a Deus e a sociedade.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, a minha família, a todos os meus professores, amigos e colegas que apoiaram o desenvolvimento desse trabalho. A Universidade Federal de Goiás, a CAPES, ao meu orientador professor Dr. Cirano José Ulhoa, a Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes, a Dra. Vanessa Oliveira Leitão e ao Rafael Vitor Carneiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	7
1.1 O Cerrado	7
1.2 Família Asteraceae.....	8
1.3 Estrutura e função dos frutanos	9
1.4 Enzimas do metabolismo de frutanos	13
2 . Objetivos.....	16
2.1 Objetivos específicos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1 Área de coleta	17
3.2 Extração de proteínas e enzimas.....	17
3.3 Dosagem de proteínas totais.....	18
3.4 Atividade enzimática	18
3.5 Efeito do tempo na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV.....	19
3.6 Efeito do pH na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV.....	19
3.7 Efeito da temperatura na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV	19
4. Resultados e discussão	20
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	27
ANEXO.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIOGEL P6DG - Bio-Gel P *polyacrylamide gels*

CCD - cromatografia em camada delgada

DNS - ácido dinitrosalicílico

DP – desvio padrão

EB1 – extrato bruto 1

EB2 – extrato bruto 2

EC - *Enzyme Commission Numbers*

1-FEH – frutano exohidrolase

FFT – frutano: frutossiltransferase

FOS – fruto-oligossacarídeos

HPAEC/PAD - cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico

HPLC - *High-performance liquid chromatography*

INV – invertase

PESD - Parque Estadual da Serra Dourada

PVPP- Polivinilpolipirrolidona

1-SST – sacarose:sacarose:sacarose frutossiltransferase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: <i>Ichthyothere terminalis</i> (Spreng.) Blake e seu sistema subterrâneo. a) Aspecto geral da planta (foto: Silvestre). b) Inflorescência (foto: Silvestre). c) Planta com raízes tuberosas (seta) (Abdalla, 2012). d) Raiz principal (MR), porção caulinar (st) e raiz lateral (LR) (Almeida,2013).	9
Figura 2: Diferentes tipos de frutanos baseados nos isômeros do monofrutosil-sacarose (1-cestose, 6-cestose e neocestose). Diferem pelo tipo de ligação entre as unidades de frutose e a ramificação. a) Inulina, b) neo-série da inulina, c) levano e d) levano misto (Almeida,2013).....	12
Figura 3: Poços de microplaca contendo teste DNS em duplicatas. EB1: extrato enzimático de raízes tuberosas de <i>I. terminalis</i> congeladas 6h após coleta. EB2: extrato enzimático de raízes tuberosas de <i>I. terminalis</i> congeladas em campo. Controle: 10µL água deionizada, 190 µL reagente DNS; 10µL extrato enzimático(EB1 ou EB2),190 µL reagente DNS. Incubação: 5min 95°C leitura 550nm em leitora de placas Elisa Biotek El x 800.	22
Figura 4: Modelo de teste DNS em microplaca com extratos enzimáticos de <i>I. terminalis</i>	23
Tabela 1: Teor de proteínas totais em extratos de raízes tuberosas de <i>I. terminalis</i>	20
Tabela 2: Teor de açúcares redutores em extratos de raízes tuberosas de <i>I. terminalis</i>	21
Tabela 3: Comparação da atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV obtidas de raízes tuberosas de <i>I. terminalis</i>	23
Tabela 4: Efeito do tempo(h) na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.	25
Tabela 5: Efeito do pH na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.	25
Tabela 6: Efeito da temperatura(°C) na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.	26

RESUMO

O Cerrado é um bioma que ocupa cerca de 25% do território brasileiro. A sazonalidade climática, períodos quente-úmido e frio-seco, é uma das características mais marcantes do Cerrado. A redução pluviométrica diminui a disponibilidade de água nas camadas superficiais do solo e eleva a demanda evaporativa do ar levando a formação de serrapilheira que coopera na ciclagem de nutrientes do solo. Outro fator importante no Cerrado é a ocorrência de queimadas que influenciam na dispersão, floração, rebrota e diversidade de certas espécies de plantas. A relação entre sazonalidade climática, baixa fertilidade dos solos e ocorrência natural de queimadas tem moldado estratégias vegetativas e reprodutivas das plantas do bioma Cerrado. *Ichthyothere terminalis*(Spreng.) Blake, espécie da família Asteraceae ocorrente no Cerrado, acumula grandes quantidades de frutanos em seus órgãos subterrâneos como carboidratos de reserva. Os frutanos são polímeros de frutose sintetizados pelas enzimas 1-SST (sacarose: sacarose frutossiltransferase) e FFT (frutano:frutano frutossiltransferase) e despolimerizados pela 1-FEH (frutano exohidrolase) e invertase. O presente trabalho objetivou estudar o efeito do tempo de congelamento na produção das enzimas 1-SST, 1-FEH e Invertase em *I. terminalis*. Além disso, a caracterização parcial destas enzimas foi realizada. As amostras coletadas foram congeladas imediatamente após a coleta (EB2) ou após 6 horas de transporte até o laboratório (EB1). A análise da quantidade de proteína extraída mostrou que EB1 apresentou maior quantidade de proteínas ($97,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparada com EB2 ($11,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O método de extração foi eficiente, pois houve uma redução significativa em açúcares redutores e a atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e Invertase foram detectadas, principalmente no EB1. As enzimas 1-SST e Invertase apresentaram um pH ótimo entre pH 6 e 7, ao passo que a enzima 1-FEH teve um espectro maior variando de pH 5 a 7. As três enzimas apresentaram uma temperatura ótima na faixa de 40 a 50 (°C). Este trabalho representa um passo importante para o entendimento do papel destas enzimas no metabolismo de frutanos em *I. terminalis*.

Palavras-chave: caracterização parcial, 1-SST, 1-FEH, invertase, *Ichthyothere terminalis*, extrato, raízes tuberosas, frutanos.

ABSTRACT

The Cerrado is a biome that occupies about 25% of Brazilian territory. The seasonality, hot-humid and cold-dry periods, is one of the most striking features of the Cerrado. Reduced rainfall reduces the availability of water in the surface layers of the soil and increases the evaporative demand of air leading to the formation of litter cooperating in cycling soil nutrients. Another important factor in the Cerrado is the occurrence of fires that influence the dispersion, bloom, sprouting and diversity of certain species of plants. The relationship between seasonality, low fertility of soils and naturally occurring fires has shaped vegetative and reproductive strategies of plants from the Cerrado biome. *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake Asteraceae species occurring in the Cerrado, accumulates large amounts of fructans in the underground organs as reserve carbohydrates. Fructans are fructose polymers which are synthesized by the enzymes 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) and FFT (fructan: fructan fructosyltransferase) and depolymerized by 1-FEH (exohidrolase fructan) and invertase. This study investigated the effect of freezing in the production of the enzymes 1-SST, 1-FEH and Invertase in *I. terminalis*. The partial characterization of these enzymes was performed. The samples were frozen immediately after collection (EB2) or after 6 hours of transport to the laboratory (EB1). The highest amount of protein was found in EB1 (97.81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) as compared to EB2 (11,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The results showed that the extraction method was efficient, since there was a significant reduction in reducing sugars and the activity of enzymes 1-SST, 1-FEH and Invertase were detected, mainly in the EB1. Enzymes 1-SST and Invertase showed a pH optimum between pH 6 and 7, while the 1-FEH enzyme had a greater spectrum ranging from pH 5 to 7. The three enzymes had an optimum temperature in the range 40 to 50 ($^{\circ}\text{C}$). This work represents an important step towards understanding the role of these enzymes in the fructan metabolism in *I. terminalis*.

Keywords: partial characterization, 1-SST, 1-FEH, invertase, *ichthyothere terminalis*, extract, tuberous roots, fructans.

1. Introdução

1.1 O Cerrado

O Cerrado é um bioma que possui relações ecológicas e fisionômicas com savanas da América tropical e de continentes como a África e Austrália (Ribeiro e Walter, 1998). O bioma ocupa cerca de 25% do território brasileiro com uma área de aproximadamente 200 milhões de ha distribuídos principalmente na Região Centro-Oeste e nas regiões Sul, Sudeste, Norte e Nordeste (Câmara, 1993). Devido ao fato do Cerrado possuir altas taxas de espécies endêmicas, que encontram-se sob forte pressão antrópica, tem sido uma das regiões prioritárias para a preservação da biodiversidade (Myers et al., 2000). A sazonalidade climática é uma das características mais marcantes do Cerrado, os períodos quente-úmido e frio-seco são bastante definidos (Borlaug, 2002, Eiten, 1977; Ribeiro et al., 1981, Sarmiento, 1984). Outro fator importante é a ocorrência de queimadas, principalmente no período seco, que influenciam na dispersão, floração, rebrota e diversidade de certas espécies nessas condições (Miranda et al., 2002).

A redução pluviométrica diminui a disponibilidade de água nas camadas superficiais do solo e eleva a demanda evaporativa do ar, levando em certos casos, à perda da folhagem e à morte da parte aérea de certas espécies no período seco. A serrapilheira produzida nesse período é fonte e coopera na ciclagem de nutrientes no Cerrado, cujos solos são oligotróficos. A biomassa acumulada na serrapilheira serve como combustível para a ocorrência de queimadas que promovem a mineralização e disponibilização de nutrientes para a vegetação (Silvério e Lenza, 2010). Esta relação entre sazonalidade climática, baixa fertilidade dos solos e ocorrência natural de queimadas, tem moldado nos últimos milhares de anos as diferentes estratégias vegetativas e reprodutivas das plantas do bioma Cerrado (Oliveira, 2008). Tais estratégias podem ser evidenciadas através da análise de estudos de diferentes naturezas, dentre eles estão os bioquímicos e moleculares.

Considerando a importância deste bioma estudos de plantas do cerrado brasileiro ampliam o conhecimento fisiológico e bioquímico das espécies existentes e podem também indicar o potencial como novas fontes produtoras de substâncias de interesse econômico.

1.2 Família Asteraceae

No Brasil, a família Asteraceae está representada por 271 gêneros e 1.966 espécies, abrangendo os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal (Nakajima et al., 2010). A maioria dos representantes dessa família são plantas herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e raramente arbóreas (Abdalla, 2012). Existe uma grande diversidade de sistemas subterrâneos identificados em Asteraceae, tais como rizomas, raízes tuberosas, xilopódios, raízes tuberosas, raízes gemíferas e sóbols (Vilhalva et al., 2011).

Dentre os representantes da família Asteraceae, *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) S. F. Blake é uma espécie pertencente à tribo Millerieae (Baldwin, 2009), encontrada em regiões de Cerrado como o rupestre do Parque Estadual da Serra Dourada (GO), sendo de distribuição ampla no local (Abdalla, 2012). Sua ocorrência também abrange os domínios fitogeográficos da Amazônia e Caatinga, sendo encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro Oeste do Brasil (Nakajima e Mondin, 2012).

A espécie *Ichthyothere terminalis* é uma planta herbácea medindo até 80 cm de altura, apresenta raízes tuberosas com um eixo longo orientado verticalmente em relação à superfície do solo, localizando-se nas camadas superficiais e com aproximadamente 20 cm de comprimento; com diâmetro variado e emissão de raízes laterais espessadas (Abdalla, 2012) (Figura 1). Análises anatômicas dos sistemas subterrâneos evidenciam sua natureza mista, sendo constituídos predominantemente por raiz tuberosa e estrutura caulinar na região proximal (Abdalla, 2012). Esferocristais de inulina são abundantes na região mediana das raízes tuberosas e na região mais espessa da raiz lateral (Abdalla, 2012). Nos órgãos subterrâneos da espécie *Ichthyothere terminalis*, ocorrem frutanos, sendo este um dos fatores atribuídos à abundância desta família nesse bioma (Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993).



Figura 1: *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake e seu sistema subterrâneo. a) Aspecto geral da planta (foto: Silvestre). b) Inflorescência (foto: Silvestre). c) Planta com raízes tuberosas (seta) (Abdalla, 2012). d) Raiz principal (MR), porção caulinar (st) e raiz lateral (LR) (Almeida, 2013).

1.3 Estrutura e função dos frutanos

Os frutanos pertencem a uma classe de carboidratos vegetais conhecidos a mais de 200 anos e, depois do amido e da sacarose, são os de maior ocorrência entre os vegetais superiores (Koch, 2004). Aproximadamente 15% das angiospermas contêm frutanos, principalmente em ordens consideradas derivadas, como Poales e Asterales (Hendry, 1993). Dentre as monocotiledôneas que

acumulam frutanos encontram-se principalmente as Poaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Iridaceae e Agavaceae e entre as dicotiledôneas, os frutanos são encontrados em espécies de Campanulaceae, Lobeliaceae, Stylidiaceae e em aproximadamente 25000 espécies de Asteraceae. Estes carboidratos podem também ser encontrados em briófitas, algas, fungos e bactérias (Hendry e Wallace, 1993)

Os frutanos são acumulados em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, raízes tuberosas, tubérculos e bulbos. Entretanto, em uma mesma planta esses polímeros podem ser encontrados em todos os órgãos. Geralmente, os teores são baixos nas folhas e especialmente elevados nas raízes, bulbos, tubérculos, rizomas e, algumas vezes, em frutos verdes (Meier e Reid, 1982). Nas células destas plantas, os frutanos e as enzimas envolvidas em seu metabolismo são encontrados principalmente nos vacúolos (Frehner et al., 1984).

A presença de frutanos em Asteraceae já foi documentada para a flora tropical e subtropical do cerrado brasileiro (Figueiredo-Ribeiro et al., 1986 e Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993). O acúmulo de frutanos em Asteraceae ocorre quase sempre em grandes concentrações, contudo em algumas espécies do cerrado o armazenamento pode ocorrer mesmo em pequenas concentrações (Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Além da função de reserva, estes carboidratos podem ter outras funções tais como melhorar a tolerância ao frio (Kawakami et al., 2008), regulação osmótica em condições de acesso limitado à água (Garcia et al., 2011) e proteção das membranas celulares em condições de deficiência hídrica (Hincha et al., 2007). As espécies perenes do cerrado utilizaram dessa estratégia adaptativa para suportar as mudanças no ciclo de vida e sobreviver durante os períodos de condições ambientais adversas (Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Frutanos são oligo e polissacarídeos não redutores, baseados na unidade de frutose, que ocorrem como principal carboidrato de reserva em algumas Angiospermas (Hendry, 1993). Os frutanos são sintetizados e armazenados quando o suprimento de compostos de carbono foto-assimilados excede a demanda (Pollock, 1986). Os frutanos, como carboidrato de reserva, sustentam as fases de maior demanda energética das plantas, como brotação e reprodução (Mellado-Mojica e Lopez, 2012). Além disso, podem ser essenciais para o reestabelecimento

das plantas após estação desfavorável ou após distúrbios drásticos na vegetação como danos na parte aérea ou ocorrência de fogo (Oliveira et al., 2012).

O tamanho das moléculas de frutanos sintetizadas pelas plantas pode sofrer influencia das condições ambientais e do ciclo fenológico, pois estes fatores interferem no acúmulo ou na utilização dos frutanos (Pollock e Chatterton, 1987). Em *Vernonia herbacea* foi observado que as concentrações e o tamanho médio das moléculas de frutanos variaram nas diferentes fases do seu ciclo fenológico (Carvalho e Dietrich 1993).

Os frutanos podem ser classificados em três séries principais, de acordo com os diferentes padrões de ligação e com o trissacarídeo que dá origem à série. São eles a 1-cestose ou 1-cestotriose (1-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-1,2-fru), o trissacarídeo mais amplamente distribuído entre as espécies que acumulam frutanos, com o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 1 da frutose da sacarose; a 6-cestose, que apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose, formando o α -glu-1,2- β -fru-6,2-fru; e a neocestose ou 6-G-cestotriose (6-Gfrutosilsacarose), que apresenta dois resíduos de frutose ligados à glucose (β -fru-2,6- α -glu-1,2-fru) (Carvalho e Figueiredo-Ribeiro, 2001).

Cinco classes estruturais de frutanos foram identificadas (Pollock et al., 1996): frutano do tipo inulina, baseado no trissacarídeo 1-cestose, com ligações do tipo β -2,1, entre os resíduos de frutose e grau de polimerização médio de aproximadamente 35, encontrado principalmente em Asterales; frutano do tipo levano, baseado no trissacarídeo 6-cestose, com ligações do tipo β -2,6 entre os resíduos de frutose e grau de polimerização médio de 250, encontrado em Poales; frutanos com ligações mistas e ramificados, com glucose na extremidade da cadeia, como na molécula de bifurcose, também encontrados em Poales; frutanos baseados em neocestose, com ligações β -2,1 entre os resíduos de frutose, encontrado em Liliales; e frutanos baseados em neocestose, com ligações β -2,6 entre os resíduos de frutose, encontrados em alguns membros de Poales (Figura 2).

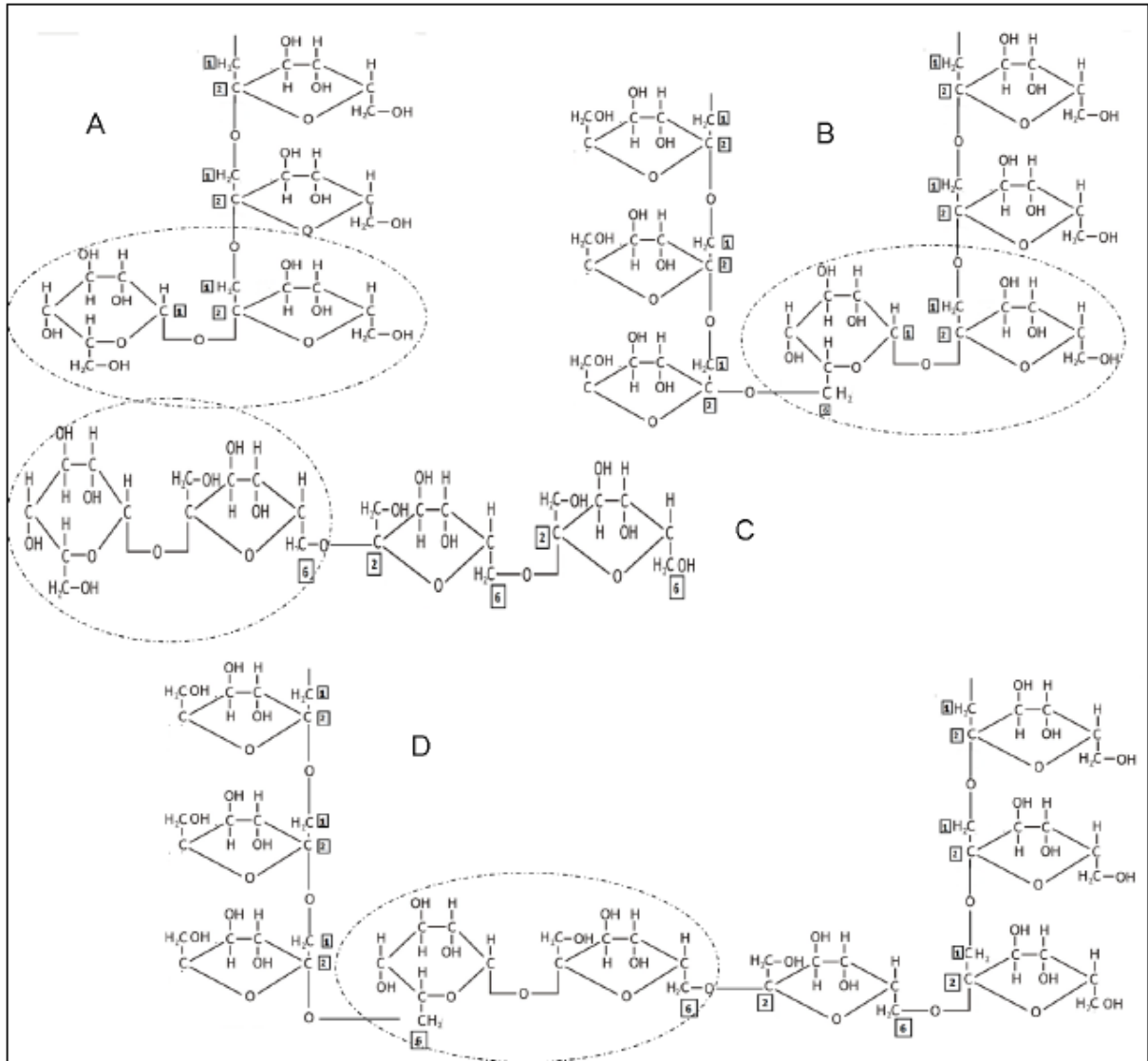


Figura 2: Diferentes tipos de frutanos baseados nos isômeros do monofrutosil-sacarose (1-cestose, 6-cestose e neocestose). Diferem pelo tipo de ligação entre as unidades de frutose e a ramificação. a) Inulina, b) neo-série da inulina, c) levano e d) levano misto (Almeida,2013).

Devido a suas estruturas e propriedades os frutanos apresentam grande importância econômica, pois possuem propriedades semelhantes às fibras dietéticas e podem ser benéficas à saúde (Tomomatsu, 1994). Por exemplo, a frutose livre, produzida a partir da hidrólise de frutanos, possui papel de adoçante não calórico e dietético. Os fruto-oligossacarídeos (FOS), promovem inúmeros benefícios à saúde humana, pois não são digeridos pelo organismo humano, sendo considerados alimentos funcionais (Carvalho e Figueiredo-Ribeiro, 2001). Estes compostos sofrem processo de fermentação no intestino pelas bifidobactérias e os ácidos graxos de cadeias curtas, liberados durante a fermentação por estas bactérias, são absorvidos pelo intestino, entram na circulação sanguínea, diminuem a glicemia e o conteúdo

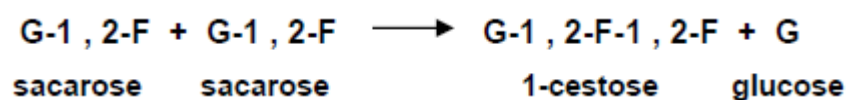
de triglicérides e o colesterol (Incoll e Bonnet, 1996). Os FOS podem também estimular a absorção de cálcio e atuar no controle da osteoporose, e na absorção de magnésio e ferro no cólon (Coussement e Franck, 1998). Dados da literatura mostram que os FOS podem também atuar na prevenção do câncer de cólon (Iizuka et al., 2000). Na forma de inulina não hidrolisada, os frutanos vêm sendo empregados pela indústria alimentícia como aditivo, pois possuem um gosto suave e a alta solubilidade quando aquecidos (Dyssel e Hoffem, 1995).

Em comparação com a sacarose, a frutose é duas vezes mais doce, é menos cariogênica, possui maior solubilidade em água e menor viscosidade. Além disso, níveis baixos desse açúcar podem ser metabolizados sem a necessidade de insulina, o que a torna um adoçante alternativo para diabéticos (Blakely et al., 1995).

1.4 Enzimas do metabolismo de frutanos

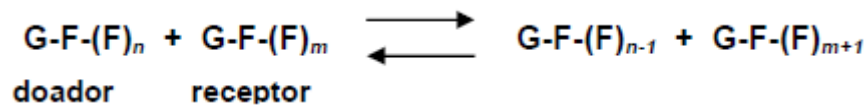
Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose por ação de duas ou mais enzimas denominadas frutossiltransferases (Edelman e Jefford, 1968). Os perfis de frutanos encontrados em grupos diferentes de plantas refletem a diversidade estrutural destes carboidratos e resulta da ação de múltiplas enzimas (Edelman e Jefford, 1968). O aumento nas atividades das enzimas de síntese foi demonstrado em plantas sob diferentes condições ambientais como: anóxia, baixas temperaturas alta concentração de CO₂, iluminação contínua das folhas, alta irradiância, exposição a seca e fotoperíodos curtos (Albrecht et al., 1993; Jeong e Housley, 1990; Chatterton e Harrison, 2003; Oliveira, 2007; Penson e Cairns, 1994; Cairns et al., 2000; De Roover et al., 2000; Legnani e Miller, 2001).

A síntese de frutanos a partir da sacarose envolve a participação das enzimas sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-1-SST – EC 2.4.1.99) e a frutano frutossiltransferase (1-FFT – EC 2.4.1.100). A enzima 1-1-SST catalisa a formação de 1-cestose, trissacarídeo da série homóloga, de forma irreversível, a partir de duas moléculas de sacarose com a liberação de glicose, conforme mostrado abaixo:



A segunda enzima, frutano:frutano frutossiltransferase (1-FFT – EC 2.4.1.100), catalisa a transferência reversível da unidade frutossil de uma molécula de frutano para outra molécula de frutano, ou para a sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis. Diferenças na afinidade da 1-FFT pelo substrato doador e receptor resultam em um padrão diferente de polímeros de inulina (Vergauwen et al., 2003).

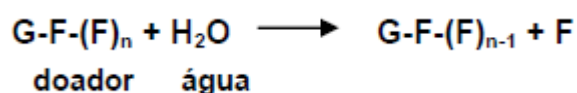
A FFT catalisa de forma reversível a transferência de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora, conforme mostrado a seguir:



onde n representa o número de resíduos de frutose extra-sacarose da molécula doadora e pode ser qualquer número de 1 (trissacarídeo) a cerca de 35; m significa o número desses resíduos da molécula receptora que pode ser qualquer número de zero (0) (sacarose) a cerca de 35.

Além da 1-1-SST e da 1-FFT, duas enzimas que atuam na biossíntese de outras formas estruturais de frutanos foram isoladas (Vijn e Smeekens, 1999): sacarose:frutano 6 frutossiltransferase (6-SFT) e frutano: frutano 6G frutossil transferase (6GFFT).

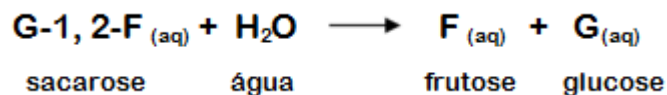
A despolimerização dos frutanos se dá pela remoção seqüencial de resíduos terminais de frutose através da reação catalisada pela enzima β -frutofuranosidase, conhecida como frutano-exohidrolase (1-FEH - EC 3.2.1.153). Segundo Edelman e Jefford (1968) a degradação de frutanos a frutose ocorre pela remoção sequencial das unidades terminais de frutose pela ação da frutano-exohidrolase (1-FEH EC 3.2.1.153). A despolimerização dos frutanos por 1-FEH está representada a seguir:



Em diversas espécies vegetais, a síntese de carboidratos ocorre nas folhas e posteriormente são mobilizados para outros órgãos das plantas na forma de sacarose, que irá suprir o metabolismo e desenvolvimento vegetal e/ou para o

acúmulo na forma de sacarose ou amido (Roitsch e González, 2004). O mecanismo de acúmulo ativo de sacarose é dependente da maturidade dos tecidos, isto é, há diferença entre tecidos maduros e imaturos devido, principalmente, à concentração de invertases e a necessidade de crescimento (Koch, 2004). As enzimas do metabolismo de frutanos estão intimamente relacionadas com as invertases (EC 3.2.1.26).

O metabolismo de partição e acúmulo de sacarose é vital em todas as fases do ciclo de vida vegetal e sua utilização como fonte de energia e de carbono requer sua hidrólise. As invertases quebram a sacarose em glicose e frutose disponibilizando para as células carbono e energia para o processo de respiração, bem como energia para a síntese de numerosos compostos. As invertases podem, ainda, estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distâncias por criar o gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, revelando função fundamental na partição dos fotossintetizados entre armazenamento e crescimento (Koch, 2004). Segue abaixo, modelo de atuação da invertase.



Ichthyothere terminalis, espécie abundante das formações rochosas nas regiões campestres da reserva biológica Prof. José Ângelo Rizzo, acumula grandes quantidades de frutanos em seus órgãos subterrâneos (Almeida, 2013). Os autores demonstraram que esta planta é capaz de armazenar grande quantidade de frutanos do tipo inulina e que a frutose polimerizada é liberada e consumida para sustentar as fases de alta demanda energética, como brotação e floração. Entretanto, nenhum trabalho foi ainda desenvolvido para avaliar a produção das enzimas frutano:frutano frutossiltransferase (1-FFT), sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-1-SST), frutano-exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) em raízes tuberosas de *Ichthyothere terminalis*. Sendo assim, a caracterização parcial das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos de *Ichthyothere terminalis* poderá contribuir para estudos relacionados ao mecanismo de sobrevivência, preservação e aplicação biotecnológica desta espécie.

2 . Objetivos

Este trabalho teve como objetivo fazer uma caracterização parcial das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos das raízes tuberosas de *Ichthyothere terminalis*.

2.1 Objetivos específicos

Caracterização parcial das enzimas sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-1-SST), frutano-exohidrolase (1-FHE) e invertase (INV) por DNS.

3. Materiais e Métodos

3.1 Área de coleta

A coleta foi realizada em uma área de cerrado rupestre na Reserva Biológica da Universidade Federal de Goiás “Prof. José Ângelo Rizzo”, situado no Parque Estadual da Serra Dourada (PESD), localizado nos Municípios de Mossâmedes, Goiás e Buriti de Goiás. A altitude da Serra Dourada varia de 726 m a 900 m, as coordenadas geográficas variam de 16°06’02” - 16°03’52” S e 50°10’59” – 50°10’12” W.

A área de estudo apresenta clima sazonal com uma estação seca compreendida entre os meses de maio e outubro e uma estação chuvosa, entre novembro e abril.

3.2 Extração de proteínas e enzimas

As raízes tuberosas de espécimes de *Ichthyothere terminalis* em fase de floração foram retirados do solo e lavados em água corrente para remoção dos resíduos de solo. As amostras foram congeladas imediatamente no campo após a coleta (EB2) ou no laboratório após 6 h de coleta (EB1) pela utilização de nitrogênio líquido. Estas amostras foram mantidas a -80°C, até a extração de proteínas.

A extração de proteínas e determinação das atividades enzimáticas foram realizadas conforme descrito por Asega e Carvalho (2004) com algumas modificações. Os raízes tuberosas foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em tampão de extração citrato–fosfato (McIlvaine), 50 mM, pH 5.5, 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, sendo a mistura mantida em repouso por 1 hora em câmara fria. Após centrifugação a 11000 rpm por 15 min a 5°C, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio para atingir 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora. Após centrifugação por 20 min a 13500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão de extração.

O extrato foi dessalinizado utilizando colunas de Bio Gel P-6 DG e posteriormente utilizado para determinação de proteínas e atividade das enzimas sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutanos-exohidrolase (FHE) e invertase (INV). Todos os procedimentos durante a metodologia de extração foram realizados a temperatura de 5 °C.

3.3 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteína do extrato enzimático foi determinada utilizando o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA-Sigma) como padrão.

3.4 Atividade enzimática

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando a metodologia do microensaio. A mistura de ensaio continha: 20µL de extrato enzimático de raízes tuberosas de *Ichthyothere terminalis*, 30µL de tampão citrato fosfato 50mM pH5.0, 50µL de solução substrato. As atividades de 1-FEH, 1-SST e INV foram identificadas pela liberação de açúcares redutores utilizando reagente DNS e leitura em leitora Elisa Biotek El x 800 utilizando comprimento de onda de 550 nm. Ainda para 1-SST foi utilizado Kit Analisa glicose-PP para dosagem de glicose.

Os extratos foram incubados a 37 °C com substratos preparados em água deionizada pH7.0 nas concentrações finais de 0,4M sacarose (Sigma®) para a atividade de 1-SST, 0,1M sacarose (Sigma®) para a atividade de invertase e 1% de inulina de *Helianthus tuberosus* (Sigma®) para a atividade de 1-FEH. Os tempos de incubação foram variados para as atividades da 1-SST, invertase e 1-FEH. Uma unidade enzimática (U) de 1-FEH, 1-SST e INV foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1µmol.ml⁻¹ de açúcares redutores por minuto de reação.

3.5 Efeito do tempo na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV

O extrato enzimático de raízes tuberosas *I. terminalis* foi incubado a 37°C em pH 5.0 nos tempos de 1:30h, 3h, 4h e 6h.

3.6 Efeito do pH na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV

O extrato enzimático das raízes tuberosas *I. terminalis* foi incubado durante 4h a 37°C numa faixa de pH de 4.0 a 9.0. As soluções tamponantes utilizadas foram citrato-fosfato 50mM pH4.0 a 6.0 e Tris-HCl 50mM pH 7.0 a 9.0.

3.7 Efeito da temperatura na atividade de 1-SST, 1-FEH e INV

O efeito da temperatura foi verificado sob uma variação de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C em pH 5.0.

4. Resultados e discussão

A presença de frutanos em Asteraceae foi amplamente descrita para a flora de regiões temperadas, que apresenta padrão sazonal de crescimento (Pollard e Amuti, 1981) e para uma área subtropical do cerrado brasileiro, onde as plantas estão sujeitas a períodos de intensa seca no inverno (Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro, 1993; Carvalho et al., 2007). Recentemente, Almeida e colaboradores (2013) demonstraram que *Ichthyothere terminalis*, uma Asteraceae, acumula grandes quantidades de frutanos em seus órgãos subterrâneos em que há variação no grau de polimerização nas diferentes fases do desenvolvimento. Entretanto, nenhum trabalho foi ainda desenvolvido para avaliar a produção das enzimas sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-1-SST), frutano-exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) nesta espécie.

Amostras de raízes tuberosas de *I. terminalis* foram coletadas e as enzimas extraídas conforme metodologia proposta por Asega e Carvalho (2004). O congelamento das amostras 6 horas após a coleta (EB1), resultou em aumento no teor de proteínas quando comparado às amostras congeladas imediatamente após a coleta (EB2)(Tabela 1). Podemos observar que a metodologia utilizada foi eficiente para extrair proteínas das duas amostras (Tabela 1). Entretanto, o extrato de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas após 6h de coleta do solo (EB1), apresentou maior quantidade de proteínas ($97,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quanto comparada com EB2 ($11,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes dados sugerem que ocorreu um aumento significativo na síntese ou liberação de proteínas das amostras EB1, dentre elas as enzimas responsáveis pelo metabolismo de frutanos, decorrente da remoção da planta do solo e posterior transporte até o laboratório.

Tabela 1: Teor de proteínas totais em extratos de raízes tuberosas de *I. terminalis*.

EXTRATO	PROTEÍNAS TOTAIS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
EB1	$97,81 \pm 13,6$
EB2	$11,90 \pm 0,58$

EB1: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas 6h após coleta; EB2: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas em campo; Os dados representam a média \pm DP

Durante o processo de preparação do extrato enzimático duas precipitações com sulfato de amônio (uma de 20 % e outra de 80%) foram utilizadas, seguido de uma dessalinização utilizando colunas de Bio Gel P-6 DG. Foi então nosso interesse avaliar a concentração de açúcar redutor das amostras após essas etapas. Esta avaliação faz-se necessária devido ao fato de que na dosagem da atividade enzimática de 1-FEH, 1-SST e invertase, os produtos liberados são também açúcares redutores (glicose e frutose). A tabela 2 representa a quantidade de açúcares redutores em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ dos extratos enzimáticos de raízes tuberosas de *I. terminalis* após o teste DNS.

Tabela 2: Teor de açúcares redutores em extratos de raízes tuberosas de *I. terminalis*.

AÇÚCARES REDUTORES ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)		
Extrato	Antes da precipitação de proteínas	Após precipitação de proteínas e gel filtração
EB1	35,38 \pm 0,11	10,30 \pm 0,10
EB2	>41,02 \pm 0,00	10,21 \pm 0,30

EB1: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas 6h após coleta; EB2: extrato enzimático raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas em campo; Os dados representam a média \pm DP

As dosagens de açúcares redutores para EB1 e EB2 antes da precipitação apresentaram 35,38 $\mu\text{moles.mL}^{-1}$ e 41,02 $\mu\text{moles.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados indicaram que as raízes de plantas (EB1) apresentaram uma quantidade menor de açúcares redutores em relação à quantidade existente nas raízes congeladas em campo logo após a remoção da planta do solo (EB2).

A presença de açúcares redutores pode ser evidenciada e quantificada pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) que baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (Figura 3). Portanto, a quantidade de açúcares redutores é proporcional a quantidade do composto avermelhado que absorve um comprimento de 550nm (Maldonade et al, 2013).

Os extratos enzimáticos EB1 e EB2 foram submetidos a precipitação protéica com sulfato de amônio $\{\text{NH}_4(\text{SO}_4) 20\text{-}80\%$ para concentrar proteínas em solução e reduzir a concentração de outras moléculas não protéicas como açúcares

reduzidos e frutanos. Em seguida, o excesso de sais, principalmente sulfato de amônio, foi removido por gel filtração em Bio gel P-6 DG. A filtração em biogel é uma forma de dessalinização rápida (15min) e permite obtenção de um filtrado mais concentrado. Após essas etapas os extratos enzimáticos também foram submetidos a dosagem pelo método DNS: EB1 apresentou $10,30 \mu\text{moles.mL}^{-1}$ de açúcares redutores e EB2, $10,21 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ demonstrando uma diminuição significativa de açúcares redutores no extrato enzimático após a precipitação protéica e filtração (Tabela 2).

Os extratos EB1 e EB2 apresentaram coloração vermelha escura antes da precipitação de proteínas e, após a precipitação, cor laranja. O grupo controle apresentou coloração amarelada (Figura 3). Os círculos são os poços das microplacas contendo extratos e reagente DNS: grupo teste EB1 e EB2, grupo controle água e reagente.







	TESTE DNS		
	EB1	EB2	CONTROLE
Antes da precipitação de proteínas			
Após precipitação de proteínas e gel filtração			

Figura 3: poços de microplaca contendo teste DNS em duplicatas. EB1: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas 6h após coleta. EB2: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas em campo. Controle: 10 μL água deionizada, 190 μL reagente DNS; 10 μL extrato enzimático (EB1 ou EB2), 190 μL reagente DNS. Incubação: 5min 95°C leitura 550nm em leitora de placas Elisa Biotek El x 800.

Estes dados demonstraram que após as etapas de precipitação de proteínas e gelfiltração as amostras estão com pouca quantidade de açúcar redutor e que não havia a necessidade de utilizar outra metodologia de remoção de açúcares redutores, como por exemplo uma diálise contra o tampão de ensaio da enzima.

Durante a execução deste trabalho a técnica de dosagem enzimática de 1-FEH, 1-SST e Invertase utilizando micro-ensaio foi desenvolvida. Para a dosagem de enzimas foram utilizadas placas de Elisa com um volume total de 200 μL sendo 20 μL de extrato enzimático de *I. terminalis*, 30 μL de tampão citrato-fosfato ou tris-HCl, 50 μL de substrato e após o tempo de incubação 100 μL de reagente de DNS. Esta metodologia facilita muito a rotina, pois podemos fazer a dosagem de até 96

amostras em uma mesma placa (Figura 4). Além disso, diminui os custos do ensaio, pois a quantidade de substrato usado é muito menor que os ensaios convencionais.

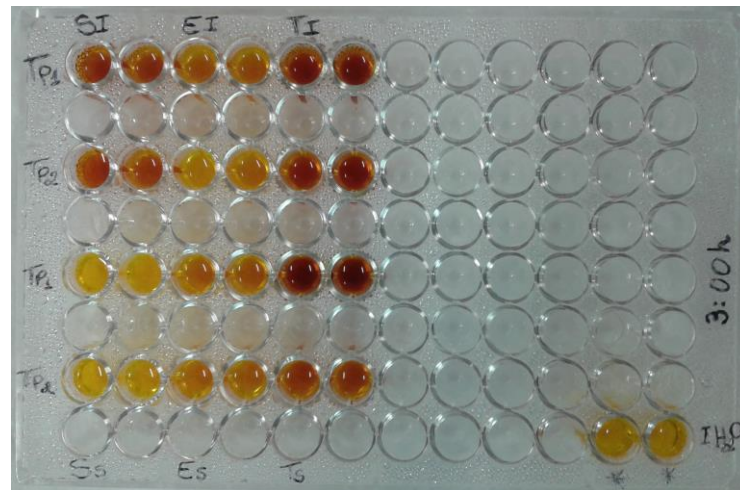


Figura 4: Modelo de teste DNS em microplaca com extratos enzimáticos de *I. terminalis*.

As atividades enzimáticas de 1-1-SST, 1-1-FEH e Invertase dos extratos EB1 e EB2 estão representadas na Tabela 3. A maior atividade enzimática foi encontrada nos extratos congelados no laboratório após 6 horas de coleta (EB1).

Tabela 3: Comparação da atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV obtidas de raízes tuberosas de *I. terminalis*.

EXTRATO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)		
	1-SST	1-FEH	INV
EB1	15,44 \pm 0,05	5,58 \pm 0,02	11,95 \pm 0,12
EB2	2,26 \pm 0,01	5,04 \pm 0,05	1,65 \pm 0,01

EB1: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas 6h após coleta; EB2: extrato enzimático de raízes tuberosas de *I. terminalis* congeladas em campo; 1-SST: sacarose frutossiltransferase; 1-FEH: frutano-exohidrolase; INV: invertase; Tempo de reação 3h, 37°C, pH5,0; Os dados representam a média \pm DP

A enzima 1-SST apresentou maior atividade em EB1 com um valor de aproximadamente 6,8 vezes superior a EB2. A enzima 1-SST catalisa a formação de 1-cestose, trissacarídeo da série homóloga, de forma irreversível, a partir de duas moléculas de sacarose com a liberação de glicose. No ensaio enzimático foi detectado a presença de açúcar redutor sugerindo que houve síntese de 1-cetose. Entretanto, estes resultados precisam ser confirmados por técnicas de cromatografia

de troca aniônica de alta resolução dos fruto-oligossacarídeos (HPAEC/ PAD) ou cromatografia em camada delgada (CCD), conforme sugerido por Asega et al., 2004.

A Invertase, enzima responsável pela quebra da sacarose em glicose e frutose, apresentou atividade elevada, também no EB1, com uma atividade de aproximadamente 7,2 maior do que no EB2 (Tabela 3). Esta alta atividade de invertase no EB1, sugere que houve um “pool” de sacarose para suprir a demanda energética da planta durante o tempo de transporte até o laboratório. Alguns autores mostraram em plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação pela excisão da parte aérea, que a atividade de invertase antecede o da 1-FEH e sugerem que a invertase hidrolisaria a sacarose disponível nos raízes tuberosas antes de ocorrer degradação dos frutanos pela 1-FEH (Asega e Carvalho, 2004). Entretanto, neste trabalho não podemos sugerir que o mesmo acontece em *I. terminalis*, pois seria necessário fazer uma cinética de tempo de congelamento e dosagem de 1-FEH e invertase.

A 1-FEH, enzima responsável pela despolimerização das cadeias de frutanos, apresentou atividade mais baixa nos dois extratos analisados. Entretanto, os resultados encontrados foram muito próximos (Tabela 3). A degradação de frutanos à frutose e finalmente sacarose ocorre pela remoção sequencial das unidades terminais de frutose pela ação da frutano exohidrolase (1-FEH EC 3.2.1.153). Dois tipos principais de 1-FEHs podem ser distinguidos, dependendo do tipo de ligação que esta hidrolisa: a 1- frutano exohidrolase (1-1-FEH) que atua sobre ligações β -(2,1) e a 6-frutano exohidrolase (6-1-FEH EC 3.2.1.154) que atua sobre ligações β -(2,6) (Edelman e Jefford 1968). Uma 1-FEH que hidrolisa ambas as ligações β -(2,1) e β -(2,6) foi purificada de *H. vulgare* (Henson e Livingston 1998) enquanto 1-FEHs que hidrolisam preferencialmente ligações β -(2,6) foram purificadas de *A. sativa* (Henson e Livingston 1996) e de *T. aestivum* (Kawakami et al., 2005). Van den Ende et al (2001) verificaram que duas isoformas de 1-FEH (1-FEH I e 1-FEHII) de *C. intybus* são induzidas sob condições diferentes; a 1-FEH I é induzida em plantas submetidas à temperatura baixa e a 1-FEH II é induzida tanto em plantas desfolhadas, induzidas à brotação, como em plantas submetidas à temperatura baixa. Entretanto, neste trabalho não foi possível caracterizar o tipo de 1-FEH presente em *I. terminalis*. Futuros experimentos de purificação, caracterização e análise de produtos de hidrolise da 1-FEH de *I. terminalis* identificada neste trabalho, precisam ser realizados.

Considerando que foram encontradas atividades de 1-FEH, 1-SST e invertase em *I. terminalis* se faz interessante realizar a purificação e a caracterização desse grupo de enzimas para avaliar seu potencial na síntese e degradação de frutanos. Os frutanos são de grande interesse econômico para as indústrias alimentícia e farmacêutica. Para tanto, fizemos a caracterização parcial da 1-SST, 1-FEH e invertase do extrato EB1 onde encontramos a maior atividade das enzimas. Os dados são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

A Tabela 4 representa o efeito do tempo na ação enzimática do extrato de raízes tuberosas de *I. terminalis*. Os valores das atividades estão em $\mu\text{moles.mL}^{-1}$. Podemos observar que o aumento do tempo de reação leva a uma maior produção de açúcar redutor.

Tabela 4: Efeito do tempo(h) na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)			
	1:30h	3h	4h	6h
1-SST	3,70 \pm 0,10	10,85 \pm 0,06	17,48 \pm 0,06	14,20 \pm 0,06
1-FEH	4,74 \pm 0,06	4,96 \pm 0,04	5,43 \pm 0,05	8,15 \pm 0,06
INV	3,20 \pm 0,05	8,58 \pm 0,04	13,60 \pm 0,06	11,12 \pm 0,04

1-SST: sacarose frutossiltransferase; 1-FEH: frutano-exohidrolase; INV: invertase; Temperatura 37°C, pH5,0; Os dados representam a média \pm DP

A enzima 1-SST apresentou maior atividade após 4h de incubação; 1-FEH após 6h e Invertase após 4h. O conhecimento do melhor tempo de atividade de uma enzima auxilia na determinação de suas características e no delineamento de posteriores ensaios enzimáticos.

A Tabela 5 representa as atividades enzimáticas testadas num gradiente de pH de 4.0 a 9.0.

Tabela 5: Efeito do pH na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)					
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
1-SST	8,12 \pm 0,03	15,44 \pm 0,05	17,54 \pm 0,05	17,67 \pm 0,07	14,07 \pm 0,03	6,16 \pm 0,01
1-FEH	4,81 \pm 0,04	5,58 \pm 0,02	5,50 \pm 0,06	5,47 \pm 0,02	5,19 \pm 0,01	4,52 \pm 0,04
INV	6,43 \pm 0,16	11,95 \pm 0,12	13,66 \pm 0,98	12,68 \pm 0,07	11,02 \pm 0,08	5,00 \pm 0,20

1-SST: sacarose frutossiltransferase; 1-FEH: frutano-exohidrolase; INV: invertase; Tempo de reação 3h, 37°C com variação de Ph; Os dados representam a média \pm DP

As enzimas 1-SST e Invertase apresentaram um pH ótimo entre pH 6 e 7, ao passo que a enzima 1-FEH teve um espectro maior variando de pH 5 a 7. A determinação do pH ótimo de uma enzima é um passo fundamental para a montagem dos protocolos de purificação e escolha das cromatografias a serem usadas.

A Tabela 6 apresenta o efeito da temperatura, em graus Celsius, nas atividades enzimáticas durante incubação de 3h em pH5.0. As três enzimas apresentaram uma temperatura ótima na faixa de 40 a 50 (°C).

Tabela 6: Efeito da temperatura(°C) na atividade das enzimas 1-SST, 1-FEH e INV em extrato EB1.

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)			
	30°C	40°C	50°C	60°C
1-SST	11,53 \pm 0,04	23,22 \pm 0,11	20,32 \pm 0,12	11,58 \pm 0,05
1-FEH	5,96 \pm 0,01	6,63 \pm 0,04	7,25 \pm 0,03	5,43 \pm 0,09
INV	9,15 \pm 0,08	17,92 \pm 0,03	15,74 \pm 0,05	9,18 \pm 0,03

1-SST: sacarose frutossiltransferase; 1-FEH: frutano-exohidrolase; INV: invertase; Tempo de reação 3h, pH5,0; Os dados representam a média \pm DP

A 40°C as enzimas 1-SST e Invertase apresentaram maior atividade ao passo que a enzima 1-FEH teve melhor atividade a 50°C. O conhecimento da melhor temperatura de atividade de uma enzima também auxilia na determinação de suas características e no delineamento de posteriores ensaios enzimáticos.

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu pela primeira vez a caracterização parcial das enzimas 1-SST, 1-FEH e Invertase extraídas de raízes tuberosas de *I. terminalis*. Outros trabalhos como Portes e Carvalho (2006), Souza (2008), Asega e Carvalho (2004), Itaya et al., (1999), Itaya et al., (2002), Itaya et al., (2007), Van den Ende e Van Laere, (1995) e Koops e Jonker (1996) utilizaram técnicas de HPLCH, PAEC/PAD ou Somogy(1945) para detectar a atividades dessas enzimas nos extratos vegetais (ANEXO). Entretanto, novos trabalhos devem ser feitos para que possamos desenvolver um método de purificação e caracterização destas enzimas para que no futuro possamos descrever melhor o papel das no metabolismo de *I. terminalis*.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDALLA, D.F.2012. Morfoanatomia e fitoquímica de órgãos vegetativos de *Apopyrus warmingii* (Baker) G.L. Nesom e *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) S.F. Blake (Asteraceae): Estratégias adaptativas ao cerrado rupestre. M. SC. Dissertação. Departamento de Biologia, área de concentração: Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás.

ALBRECHT, G.. KAMMERER, S.. PRAZNIK, W.. WIEDENROTH, E.M. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following re-aeration. *New Phytologist*, v.123, p. 471-476, 1993.

ALMEIDA L.V. Variação anual no conteúdo de frutanos em órgãos subterrâneos de *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake (Asteraceae – Millerieae Goiânia. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Goiás. 2013.

ASEGA, A.F.. CARVALHO M.A.M. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.313-319. 2004.

BLAKELY, S.T., MISLO, B.L., BASI, N.S. e PAINTER, R.H. 1995. Dietary fructose alters the insulin-like effects of dietary vanadate in adipocytes from rats. *Nutrition Research* 15: 25-35.

BONNETT, G.D. e SIMPSON, R.J. 1993. Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.

BORLAUG, N.E. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA.

BALDWIN, B.G. Heliantheae alliance in FUNK, V.A., SUSANNA, A. STVESSY, T.F e BAYER, R. J. compositae 2009 International association for Plant Taxonomy, Vienna. P689-712.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgam quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, p. 248-254, 1976.

CAIRNS, A.J., POLLOCK,C.J., GALLAGHER, J.A., HARRISON, J. 2000. Fructans: Synthesis and Regulation. In: R.C. Leegood, T.D. Sharkey e S. von Caemmerer (eds.). Photosynthesis: Physiology and Metabolism, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.301-320.

CÂMARA, I. P. Conservação dos Cerrados. In: MONTEIRO, S.. CAZ, L. (Eds.) Cerrado: vastos espaços. Rio de Janeiro: Alumbramento/Livroarte, p. 45-49, 1993.

CARVALHO M.A.M., DIETRICH S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. New Phytol. 123: 735-740.

CARVALHO, M.A.M., ASEGA, A.F. e FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2007. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. In: Benkeblia, N. e Shiomi, N. Recent Advances in Fructooligosacharides Research. Research Signpost, pp.69-91.

CARVALHO, M.A.M.. FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.M.. SAURA-CALIXTO, F.. WITTIG DE PENNA, E.. MENEZES, E.W. (Ed.). Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTEDXI.6, São Paulo: Editora Varela, 2001, p.77-90.

CHATTERTON, N. J., HARRISON, P. A. 2003. Fructans in crested wheatgrass leaves. Journal of Plant Physiology 160: 843-849.

CHATTERTON, N.J.. HARRISON, P.A.. BENNETT, J.H.. THORNLEY, W.R. Fructan, starch and sucrose concentration in crested wheat grass and redtop as affected by temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.25, p.617-623, 1987.

COUSSEMENT, P.. FRANCK, A. New food application for inulin. *Agro-food-industry Hi-Tech*, v.9, p. 26–28, 1998.

DE ROOVER, J.. VAN LAERE, A.. VAN DEN ENDE, W. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*) L. *Physiologia Plantarum*, v.106, p.158-163, 2000.

DIAS-TAGLIACOZZO, G.M., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., CARVALHO, M.A.M., DIETRICH, S.M.C.1999. Fructan variation in the rizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby influenced by temperature. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 267-273.

DYSSELER P., HOFFEM, D. 1995. Inulin, an alternative dietary fibre. Properties and quantitative analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49 Suppl 3:S145-52.

EITEN, G. 1977. Delimitação do conceito de Cerrado. *Arquivos do Jardim Botânico, Rio de Janeiro* 21: 125-134.

EDELMAN, J., JEFFORD, T.G. 1968. The mechanism of fructose metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., DIETRICH, S.M.C., CHU, E.P., CARVALHO, M.A.M., VIEIRA, C.C., GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica*, v.9, p.159-166, 1986.

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

GARCIA, P.M.A., ASEGA, A.F., SILVA E.A., ARVALHO, M.A.M. 2011. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiol. Bioch.* 49: 664–670. doi:10.1016/j.plaphy.2011.03.014.

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

HENDRY, G.A.F., WALLACE, R.K. 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: M. Suzuki e N. J. Chartterton (eds.) *Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, pp.119-139.

HENSON, C.A., LIVINGSTON, D.P. 1998. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 715-720.

HENSON, C.A., LIVINGSTON, D.P. Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes b-2,6-fructans. *Plant Physiology*, v.110, p. 639-644, 1996.

HINCHA D.K., LIVINGSTON, D.P., PREMAKUMAR. R., ZUTHER. E., OBEL, N., CACELA, C., HEYER, A.G. (2007) Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochim. Biophys. Acta* 1611–1619.

IIZUKA, M., MINAMIURA, N., OGURA, T. Utilization of fructan. In: OHNISHI, M. (Ed.). *Glycoenzymes*, Tokio: Japan Scientific Societies Press, 2000. p.241-258.

INCOLL, L.D., BONNET, G.D. Fructan in the compositae – a short review. In: CALIGARI, P.D.S., HIND, D.J.N. (Ed.). *Compositae: biology e utilization*, Kew:Proceedings of the International Compositae Conference, 1996. v.2, p. 401-413.

ITAYA, N.M, FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., BUCKERIDGE M.S. Syntesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Vigueira discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:435-442. 1999.

ITAYA, N.M., ASEGA, A.F. CARVALHO, M.A.M., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C.L. Hydrolase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteraceae species. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:647-656. 2007.

ITAYA, N.M., CARVALHO, M.A.M., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C.L. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia plantarum* 116:451-459.2002.

JEONG, B., HOUSLEY, T.L. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. *Plant Physiology*, v.93, p. 902-906, 1990.

KAWAKAMI A, SATO Y, AND YOSHIDA M 2008. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J. Exp. Bot.* **59**: 793–802. doi:10.1093/jxb/erm367.

KAWAKAMI, A., YOSHIDA M., VAN DEN ENDE W. 2005. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6e1-1-FEH from wheat (*Triticum aestivum*) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.

KOCH K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7:235–246.

KOOPS, A.J.. JONKER, H.H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* “Colombia”: II Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferases and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology*, v.110, p. 1167–1175, 1996.

LEGNANI G, MILLER WB. Short photoperiods induce fructan accumulation and tuberous root development in *Dahlia* seedlings.N. *Phytologist*. 2001.Mar:149(3): 449–454.

MALDONADE I R., CARVALHO P. G. B., FERREIRA N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS Comunicado Técnico 85ISSN 1414.9850 Março, 2013.

MEIER H . AND REID JSG 1982 Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. in *Encyclopedia of Plant Physiology - Plant Carbohydrates* (eds) FA Loewus and W Tanner (Berlin: Springer-Verlag) pp 418–471.

MELLADO-MOJICA E, AND LÓPEZ MG 2012. Fructan Metabolism in Agave tequilana Weber Blue Variety along Its Developmental Cycle in the Field. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11704–11713.

MIRANDA, H.S., BUSTAMANTE, M. e MIRANDA, A.C. The fire factor. *In* The cerrados of Brazil (P.S. Oliveira e R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York, p.51-68. 2002.

MYERS, N.. MITTERMEIER, R. A.. MITTERMEIER, C. G.. FONSECA, G. A.. KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 824–853. 2000.

NAKAJIMA J, AND MONDIN CA 2012. *Ichthyothere* In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB016146> [acesso em 02 de março de 2012].

NAKAJIMA, J., LOEUILLE, B., HEIDEN, G., DEMATTEIS, M., HATTORI, E.K.O., MAGENTA, M., RITTER, M.R., MONDIN, C.A., ROQUE, N., FERREIRA, S.C., TELES, A.M., BORGES, R.A.X., MONGE, M., BRINGEL JR., J.B. A., OLIVEIRA, C.T., SOARES, P.N., ALMEIDA, G., SCHNEIDER, A., SANCHO, G., SAAVEDRA, M.M., LIRO, R.M., SOUZA-BUTURI, F.O., PEREIRA, A.C.M., MORAES, M.D. 2010. Asteraceae *in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível no site: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000055>.

OLIVEIRA VF, SILVA EA, ZAIDAN LBP, AND CARVALHO MAM 2012. Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker. *Plant Biol.* 15: 1-11. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00654.

OLIVEIRA, P. E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de Cerrado. *In* Cerrado: ambiente e flora. (S. M. Sano e S.P. Almeida, eds.). EMBRAPA - Cerrados, Planaltina, p.169-188. 2008.

OLIVEIRA, V.F. 2007. Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no crescimento, na alocação de biomassa e no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

PENSON, S.P.. CAIRNS, A.J. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of the novo synthesis in vivo and in vitro. *New Phytologist*, v.128, p. 395-402, 1994.

POLLARD, C.J.. AMUTI, K.S. Fructose oligosaccharides, possible markers of phylogenetic relationships among dicotyledonous plant families. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.9, p.69-78, 1981.

POLLOCK, C. J.. CAIRNS, A.J.. SIMS, I.M.. HOUSLEY, T.L. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In*: ZAMSKI, E.. SHAFFER, A.A. (Eds) Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source – Sink Relationships, New York: A.A. Marcel Dekker Inc, 1996, p. 97-113.

POLLOCK, C.J. Fructan and metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist*, v.104, p. 1–24, 1986.

POLLOCK, C.J.. CHATTERTON, N.J. Fructan. *In*: PREISS, J. (Ed.). *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. New York: Academic Press, 1988. v.14, p. 109-140.

PORTES M.T., CARVALHO M.A.M. 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Sci*. 170: 624-633. doi:10.1016/j.plantsci.2005.10.017.

ROITSCH T, GONZÁLEZ MC. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends Plant Sci. 2004 Dec.9(12):606-13.

RIBEIRO, J.F., S.M. SANO e J.A. da SILVA. 1981. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. pp. 124-133 In: Anais do XXXII Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil, Teresina, Brasil.

SARMIENTO, G. The ecology of neotropical savannas. Harvard University Press, Cambridge. 1984.

SILVÉRIO, D. V.. LENZA, E. Fenologia de espécies lenhosas em um cerrado típico no Parque Municipal do Bacaba, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brasil. Biota Neotropica, v. 10, n. 3, p. 205–216, 2010.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, v.160, p. 61–63, 1945.

SOUZA, M. J. de. Distribuição espacial da atividade das enzimas de síntese e mobilização de frutanos em raízes tuberosas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby induzidas à brotação e sob temperatura baixa. São Paulo. 2008.

TERTULIANO M.F., AND FIGUEIREDO-RIBEIRO RCL 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. New Phytol. 123: 741-749.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. Food Technology october, 1994, p. 61-65.

VAN DEN ENDE W.. DE CORNINCK, B.. CLERENS, S.. VERGAUWEN, R.. VAN LAERE, A. Unexpected presence of fructan 6-exohydrolase (6-1-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-1-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). The Plant Journal, v.36, p.697-710, 2003b.

VAN DEN ENDE, W., VAN LAERE, A. Fructan Synthesizing and Degrading Activities in Chicory Roots (*Cichorium intybus* L.) during Field-growth, Storage and Forcing. J. Plant Physiol. 149:43-50. 1995.

VAN DEN ENDE, W.. MICHIELS, A.. DE ROOVER, J.. VAN LAERE, A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. The Scientific World JOURNAL, v.2, p.1281-1295, 2002.

VAN DEN ENDE, W.. MICHIELS, A.. DE ROOVER, J.. VAN LAERE, A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. The Scientific World JOURNAL, v.2, p.1281-1295, 2002.

VAN DEN ENDE, W.. MICHIELS, A.. VAN WONTERGHEM, D.. CLERENS, S.. DE ROOVER, J.. VAN LAERE, A. Defoliation induces 1-1-FEHII (fructan 1-exohydrolasell) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-1-FEHIIa and 1-FEHIIb). Mass fingerprint of the 1-1-FEHII enzymes. Plant Physiology, v.126, p.1186-1195, 2001.

VERGAUWEN R., VAN LAERE A, VAN DEN ENDE W. Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. Plant Physiol. 2003 Sep.133(1):391-401.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? Plant Physiology, v.120, p.351-359, 1999.

VILHALVA, D. A. A., CORTELAZZO, A. L., CARVALHO, M. A. M., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Histochemistry and ultrastructure of *Campuloclinium chlorolepis* (Asteraceae) tuberous roots accumulating fructan: evidences of functions other than reserve carbohydrate. Australian Journal of Botany, v. 59, p. 46-52. 2011.

ANEXO

Comparação com dados da literatura.

	ENZIMA	EXTRATO ENZIMÁTICO	MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	ATIVIDADE	ATIVIDADE ESPECÍFICA	pH ótimo	Temperatura Ótima(°C)	Ensaio (°C, pH, incubação)
Tubérculos <i>Helianthus tuberosus</i> (Asteraceae)	1-SST	bruto		135u	0,09 mg-1	-	-	35, 5.0, 3h
(Koops e Jonker, 1996)	1-SST	Purificado Q-sepharose	HPLC	39,7u	0,27 mg-1	6.5	37	
Raízes <i>Cichorium intybus</i> L. (Asteraceae)	1-SST	Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80%	HPLC	Qtde frutanos (nmoles.min-1)	-	-	30	30, 5.0, 1h
(Ende e Laere, 1995)	1-SST	Sobrenadante			-	-	-	30, 5.0, 96h
<i>Smallanthus sonchifolius</i> , <i>Vigüeira discolor</i> , <i>Vernonia herbácea</i> (Asteraceae)	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	HPAEC/PAD	Qtde frutanos (nC)	-	-	-	30, 5.0, 8h
(Itaya et al., 2007)	INV				-	-	-	30, 5.0, 8h
Raízes tuberosas e tubérculos <i>Polymia sonchifolia</i> (Asteraceae)	1-SST	Sobrenadante			-	-	-	30, -, 2h
	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	HPAEC/PAD	Qtde. frutanos (mg.min-1)	-	-	-	30, -, 6h
(Itaya et al., 2002)	INV				-	-	-	30, -, 2h
Tubérculos <i>Vigüeira discolor</i> (Asteraceae)		Sobrenadante						
(Itaya et al., 1999)	1-SST	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	HPAEC/PAD	Qtde. frutanos (mg.h-1)	-	-	-	100µL extrato, 30, 5.4, 4h
Raízes tuberosas <i>Vernonia herbácea</i>	1-SST	Sobrenadante	HPAEC/PAD		-	-	-	30, 4.5, 6h

(Asteraceae)	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)		Qtde. frutanos (<i>n</i> kat.g-1)	-	-	-	30, 4.5, 8h
(Asega e Carvalho, 2004)	INV				-	-	-	30, 4.5, 4h
	1-SST	Sobrenadante			-	-	-	30, 4.5, 1h
Raízes tuberosas <i>Vernonia herbácea</i> (Asteraceae)	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	HPAEC/PAD	Qtde frutanos (<i>n</i> C)	-	-	-	30, 4.5, 4h
(Souza, 2008)	INV				-	-	-	30, 4.5, 4h
	1-SST	Sobrenadante	HPAEC/PAD	150 µg.ml-1	-	-	-	30, -, 6h
Rizóforo <i>Vernonia herbaceae</i> (Asteraceae)	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	Somogy(1945)	200 µg.ml-1	-	-	-	30, -, 4h
(Portes e Carvalho, 2006)	INV		HPAEC/PAD	30 µg.ml-1	-	-	-	30, -, 4h
	1-SST	Sobrenadante		15,44 ±0,05 µmol.ml-1	81,71±0,03 u	7.0	40	20µL extrato , 37, 5.0, 3h
Raízes tuberosas <i>Ichthyothere terminalis</i> (Asteraceae)	1-FEH	(Precipitado NH ₄ (SO ₄) 80% e dessalinizado Biogel P-6 DG)	DNS	5,58 ±0,02 µmol.ml-1	30,45±0,03 u	5.0	50	20µL extrato, 37, 5.0, 3h
	INV			11,95 ±0,12 µmol.ml-1	62,04±0,11 u	7.0	40	20µL extrato, 37, 5.0, 3h

1-SST-sacarose sacarose frutossil transferase; 1-FEH-frutano exohidrolase; INV-invertase; HPLC- *High-performance liquid chromatography*; HPAEC/PAD- *High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled*; DNS- ácido dinitrosalicílico.