

ATIVIDADE LPAásica EM SEMENTES DE FEIJÃO DE CORDA 
sinensis (L) Savi cv. seridõ.

ANTÔNIO UCHOA DE ALBUQUERQUE

Trabalho realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, sob a orientação da professora Iracema Lima Ainouz.

Fortaleza - CE
fevereiro, 1977

[REDACTED]

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

[REDACTED]

Antônio Uchoa de Albuquerque

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

[REDACTED]

Iracema Lima Ainouz

[REDACTED]

Data

[REDACTED]

José Xavier Filho

[REDACTED]

Data

[REDACTED]

Renato de Azevedo Moreira

[REDACTED]

Data

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por intermédio de bolsa de Pós-graduação ao autor.

Organização dos Estados Americanos (OEA), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (projeto BR-07-CB-A Bioquímica e Fisiologia da Germinação, 1974-1975).

Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, uso de equipamento de seu Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, durante fases deste trabalho.

A meus pais,
irmãos e Izadora

AGRADECIMENTOS

O autor agradece

À Professora Iracema Lima Ainouz, Chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, pela sua valiosa orientação e estímulo permanente, na execução desta dissertação.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Dr. José Xavier Filho e Dr. Renato de Azevedo Moreira, pelas valiosas sugestões apresentadas durante a execução do presente trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), nas pessoas do Magnífico Reitor, Prof. Manuel Machado Ramalho de Azevedo e do Chefe do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Naturais (CCEN), sem cuja valiosa colaboração não teria sido possível concretizar este trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química do CCEN da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pelo incentivo e cooperação.

Finalmente, o Autor agradece, de modo todo especial, aos seus queridos pais e irmãos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização do presente trabalho.

INDICE GERAL

	Página
SUMÁRIO	ix
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	8
A. MATERIAL	8
B. MÉTODOS	8
B.1. Condições de germinação	8
B.2. Preparação do extrato	9
B.3. Preparação do substrato	10
B.4. Determinação de proteína	10
B.5. Condições de ensaios	10
B.5.1. Concentrações do substrato e do extrato	10
B.5.2. Efeito do pH	11
B.5.3. Efeito da temperatura e do tem- po de reação	11
B.5.4. Determinação da atividade LPA _{asi} ca em sementes germinantes	12
B.6. Unidade de atividade	12
B.7. Termoestabilidade	12
B.8. Fracionamento com sulfato de amônio	13
B.9. Filtração em gel	13
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
IV. CONCLUSÕES	32
V. BIBLIOGRAFIA	34

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

Página

Fig. 1.	Peso fresco de cotilédones de feijão de cor da <u>Vigna sinensis</u> (L) Savi cv. seridõ durante a germinação	16
Fig. 2.	Teor de proteína extraída de cotilédones de sementes de feijão de corda <u>Vigna sinensis</u> (L) Savi cv. seridõ durante a germinação	18
Fig. 3.	Efeito de concentração do substrato sobre a atividade LPAásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi cv. seridõ)	19
Fig. 4.	Efeito da concentração da enzima presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi cv. seridõ) na velocidade de reação	21
Fig. 5.	Efeito do pH sobre a atividade LPAásica presente em extrato do cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda <u>Vigna sinensis</u> (L) Savi cv. seridõ	22

- Fig. 6. Efeito da temperatura sobre a atividade LPAásica presente em extrato de cotilêdones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ 24
- Fig. 7. Termoestabilidade da atividade LPAásica presente em extrato de cotilêdones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ 25
- Fig. 8. Atividade LPAásica presente em extrato de cotilêdones de sementes germinantes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ 27
- Fig. 9. Atividade LPAásica específica em extrato de cotilêdones de sementes germinantes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ 29
- TABELA 1- Fracionamento do extrato bruto de cotilêdones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis(L) Savi cv. seridõ por precipitação com sulfato de amônio 30
- Fig. 10. Cromatografia em Sephadex-G100 de extrato de cotilêdones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ 31

SUMÁRIO

Cotilédones de sementes de Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ foram usados para determinação da atividade exopeptidásica, empregando-se como substrato L-leucina-p-nitroanilida (LPA).

Foram determinadas as condições ótimas de ensaio de atividade, tais como, concentração do substrato ($3 \times 10^{-4} M$) concentração de enzima (extrato bruto diluído 1:100), temperatura ($40^{\circ}C$), pH (7,0) e tempo (10 min.). A termoestabilidade da atividade enzimática foi determinada, usando-se as temperaturas de 30° , 40° e $50^{\circ}C$. A atividade é resistente ao aquecimento por 40 minutos a $30^{\circ}C$. O aquecimento por 10 minutos a $50^{\circ}C$ é suficiente para reduzir a atividade a 46% da atividade inicial.

Uma vez determinadas as condições ótimas de ensaio, foi estudada a variação de atividade LPAásica durante a germinação. Verificou-se que há um decréscimo da atividade por cotilédone no decorrer da germinação, enquanto a atividade específica não apresentou grandes variações.

O fracionamento do extrato de cotilédones de sementes quiescentes foi feito, empregando-se sulfato de amônio sólido, e a atividade parece concentrar-se na fração que precipita ao nível de 50% de saturação.

A filtração do extrato bruto em SEPHADEX - G100 mostrou que a atividade LPAásica está distribuída em duas

frações: uma com peso molecular maior que aparece no volume de exclusão da coluna e uma maior de peso molecular 67.920 daltons que encerra cerca de 70% da atividade inicial aplicada na coluna.

INTRODUÇÃO

As proteínas presentes nas sementes podem ser de dois tipos: proteínas metabólicas, compreendendo as enzimas e as proteínas estruturais, que estão relacionadas com as atividades normais da célula, inclusive a síntese das proteínas de reserva que constituem o segundo tipo (Miller, 1975).

É fato conhecido que as sementes de Leguminosas contêm grande quantidade de proteínas de reserva que se caracterizam pelo seu desaparecimento durante a germinação. Tais proteínas de reserva estão localizadas em estruturas subcelulares definidas, denominadas corpos protéicos, presentes nos cotilédones (Varner & Schidlovsky; 1963; Ashton, 1976). Admite-se que durante a germinação há uma mobilização das proteínas de reserva, presentes nos tecidos de armazenamento, para o eixo embrionário e que as enzimas proteolíticas desempenham um papel central nas primeiras etapas que ocorrem no processo germinativo. Assim sendo, os corpos protéicos, as proteínas de reserva e as enzimas proteolíticas são considerados os três principais componentes envolvidos na mobilização das reservas protéicas da semente. O controle das enzimas proteolíticas, a resultante mobilização das proteínas de reserva e as mudanças que ocorrem nos corpos protéicos durante a germinação constituem um problema longe de ser esclarecido.

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas

em endopeptidases e exopeptidases (Bergmann, 1942). As endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas internas de polipeptídios enquanto as exopeptidases atacam ligações peptídicas terminais. As exopeptidases, por sua vez, podem hidrolisar ligações peptídicas vizinhas ao grupamento carboxílico terminal da molécula (carboxipeptidases) ou liberar resíduos de aminoácidos da posição amínica terminal (aminopeptidases). Algumas destas peptidases terminais hidrolisam moléculas relativamente pequenas, enquanto outras podem hidrolisar moléculas grandes. Além de endopeptidases, carboxipeptidases e aminopeptidases, têm sido evidenciadas em sementes peptidases que hidrolisam somente dipeptídios e tripeptídios (Ashton, 1976).

A maioria das sementes contém mais de uma endopeptidase. Embora muitas delas estejam sem dúvida envolvidas com a degradação das proteínas de reserva, outras podem ter diferentes papéis. Algumas endopeptidases têm sido encontradas associadas aos corpos protéicos; outras parecem ser enzimas solúveis do citoplasma e poucas referências têm sido feitas quanto à associação das citadas enzimas com membranas (Ashton, 1976).

As exopeptidases têm sido encontradas em órgãos de armazenamento de proteínas e em órgãos que não possuem proteínas de reserva. Assim sendo, elas podem estar mais envolvidas no "turnover" de proteínas do que na hidrólise de proteínas de reserva. No presente estado de conhecimento, uma

distinção precisa ainda não pode ser feita (Ashton, 1976).

As enzimas proteolíticas encontradas nos tecidos de sementes e de plantas em desenvolvimento se têm mostrado muito complexas: algumas parecem ser específicas de determinados tecidos, enquanto outras são encontradas em vários tecidos; alguns tipos de enzimas proteolíticas estão envolvidas no desdobramento das proteínas de reserva encerradas nos corpos proteicos, enquanto outros funcionam aparentemente no "turnover" de proteínas celulares nas platinhas em crescimento; os níveis de algumas estão sob o controle de hormônios, enquanto os níveis de outras aparentemente não respondem a essas substâncias (Ryan, 1973).

As enzimas proteolíticas encontradas nas diversas sementes estudadas parecem possuir mecanismos de controle diversos. Alguns mecanismos de controle têm sido sugeridos: controle hormonal de síntese "de novo", inibidores endógenos, zimógenos, compartimentalização, pH e especificidade do substrato. Enquanto a maioria dos estudos de controle têm sido realizados envolvendo endopeptidases, pouco tem sido feito com relação às exopeptidases (Ashton, 1976). Os dados encontrados na literatura com relação ao exopeptidases em sementes de Leguminosas são poucos numerosos (Dechary, 1970; Ryan, 1973; Ashton, 1976).

Beevers & Splittstoesser (1967) e Beevers (1968), estudando a degradação de proteína em cotilédones de sementes germinantes de Pisum sativum, verificaram que há inicialmente uma alta atividade peptidásica que decresce com o tempo de

germinação e uma baixa atividade proteolítica que aumenta no decorrer da germinação. Para determinação da atividade proteolítica foi usada caseína como substrato e os peptídios sintéticos usados para determinação da atividade peptidásica foram L-leucina-p-nitroanilida (LPA) e α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA). Os autores sugerem que as peptidases devem estar associadas à utilização das proteínas de reserva, enquanto as enzimas caseinolíticas devem estar ligadas à degradação das proteínas associadas ao crescimento e desenvolvimento. Eles acham também que a presença de atividade peptidásica nos tecidos axiais desprovidos de proteínas de reserva indica que as enzimas não devem estar somente associadas à degradação das globulinas (proteínas de reserva).

Elleman (1974) detectou a presença de três peptidases em sementes de Pisum sativum var. Green feast: uma específica para prolina (iminopeptidase) e duas outras consideradas aminopeptidases verdadeiras, uma vez que elas requeriam a presença de um grupamento amínico livre. A adição da actinomicina D (inibidor da síntese de RNA) e cicloheximida (inibidor de síntese protéica) não alterou o desenvolvimento da atividade das enzimas encontradas durante a germinação. Ele conclui que essas enzimas estão presentes nas sementes na forma ativa e o aumento da atividade das mesmas enzimas durante a germinação não é resultante de uma síntese de novo.

Caldwell & Sparrow (1976) purificaram duas peptidohidrolases de sementes de Pisum sativum var. Green feast

usando benzoil-DL-arginina como substrato. Eles relatam que as enzimas são aparentemente idênticas e não são capazes de hidrolisar substratos comuns para proteases, mas hidrolisam pequenos peptídios encerrando aminoácidos básicos em posição carboxílica terminal. Os autores concluem que a função de tais enzimas no metabolismo da planta é ainda obscura.

Cameron & Mazeli (1971) purificaram e determinaram as propriedades da aracaína, enzima presente em sementes de Arachis hypogaea L. e anteriormente estudada por Irving & Fontaine (1945), usando como substratos benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (pH 8,1) e ester etílico de benzoil-L-arginina (pH 7,5). A enzima foi capaz de hidrolisar um grande número de di- e tripeptídios, porém foi incapaz de hidrolisar L-leu-cil-L-tirosina. Eles sugerem que a enzima não é do tipo trip-sina como considerada por Irving & Fontaine (1945) e sim uma peptídio-hidrolase.

Mikola (1976) estudou as atividades peptidásicas em extratos brutos de cotilédones de sementes quiescentes e germinantes de amendoim (Arachis hypogaea L.) e também em extra-tos brutos de folhas em desenvolvimento e totalmente diferen-ciadas. Ao lado de duas carboxipeptidases, ele encontrou pep-tidases agindo sobre LEU-TIR em pH 8,6 e sobre ALA-GLI em pH 7,8 apresentando altas atividades nos cotilédones quiescente que permaneciam constantes durante a germinação. Foram também estudadas naftilamidases capazes de hidrolisar β -naftilamidas de fenilalanina, leucina a arginina em pH 7,2, também altamen

te ativas em sementes quiescentes. Ele concluiu que as peptidases e as naftilamidases podem funcionar na mobilização das proteínas de reserva de cotilédones de sementes de amendoim durante a germinação e que as carboxipeptidases não parecem desempenhar papel importante nesse processo.

Ouichi & Hiramatsuda (1956), investigando a atividade de peptidásica em sementes de Phaseolus vulgaris, determinaram o pH ótimo para hidrólise de alanil-glicina e glicil-glicina (pH 7,7), leucil-glicina (pH 8,4-8,8) e glicil-L-leucina (pH 8,0).

Chrispeel & Boulter (1975), estudando o controle do metabolismo das proteínas de reserva em cotilédones de sementes germinantes de Phaseolus vulgaris (Vigna radiata L.), determinou a atividade de endopeptidases, carboxipeptidase e leucina-aminopeptidase. Eles observaram que há um acréscimo da atividade leucina-aminopeptidásica nos cotilédones de sementes germinantes e sugere que a enzima não deve desempenhar papel importante no metabolismo das proteínas de reserva. Eles usaram L-leucina-p-nitroanilida (LPA) como substrato em pH 6,7. Em outro trabalho, Harris & Chrispeels (1975) mostraram que a atividade leucina-aminopeptidásica, encontrada em sementes de Phaseolus vulgaris, está totalmente contida no citoplasma. Os mesmos autores fazem referência ao declínio gradual da atividade aminopeptidásica durante a germinação de Vigna unguiculata, usando LPA como substrato (Harris, Chrispeels & Boulter, 1975).

Shemataite (1962), trabalhando com Vigna sinensis

encontrou atividades enzimáticas máximas em pH 7,6, usando com substratos glicil-DL-leucina e benzoil-glicinamida.

Pode-se verificar pela literatura (Ryan, 1973; Millerd, 1975; Ashton, 1976) que os autores são unânimes em afirmar que o número de dados disponíveis sobre as enzimas proteolíticas em sementes é ainda insuficiente, apesar da importância atribuída às mesmas no processo germinativo.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer as condições ótimas de ensaios da atividade LPAásica detectada em cotilédones de sementes de Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ, verificar o comportamento da atividade durante a germinação e fazer uma purificação parcial da enzima para estudos posteriores.

II. - MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

No presente trabalho, foram usadas sementes de feijão de corda (Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ), provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curu, Pentecostes, Ceará, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

L-Leucina-p-nitroanilida (lot. 9125), substrato cromogênico obtido da Sigma Chemical Co., Sto. Louis, E.U.A.

Albumina sérica Bovina, 2 x cristalizada (lot. 9887), obtido da Nutritional Biochemical Corporation E.U.A.

Sephadex G - 100, obtida de Pharmacia Fine Chemical Uppsala, Suécia.

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

B. MÉTODOS

B.1 CONDIÇÕES DE GERMINAÇÃO

Sementes de Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ foram postas a germinar em papel de filtro segundo Prisco & O'Leary (1970).

As sementes selecionadas para a germinação foram deixadas por 10 a 15 minutos em solução hipoclorito de sódio, encerrando 5,2% de cloro ativo (Q-Boa, Indústrias Químicas, Anhembi S/A, São Paulo, SP) e em seguida lavadas vá

rias vezes com água destilada, a fim de retirar o cloro residual. Após esse tratamento, as sementes foram semeadas entre duas folhas de papel (Mata Borrão Filtro, 80 g/m², Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP), medindo 30cm x 30cm, umedecidas com 30ml de água destilada. Foram feitos rolos que continham 10 sementes em cada um e a seguir, colocadas em "bechers" de 500ml encerrando 20ml de água destilada. Os "bechers", contendo cada um 5 rolos, foram colocados dentro de cubas de vidro mantidas sob luz difusa e a temperatura de 25 ± 1°C. As germinações foram conduzidas até 8 dias.

B.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para preparação dos extratos de sementes quiescentes e germinantes foram usados somente cotilédones e desprezadas as películas e eixos. As extrações foram feitas, triturando-se os cotilédones em almofariz com cloreto de sódio 0.1 M em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7.0, mantendo-se sempre a proporção de 1g de cotilédone para 10ml de solução extratora. O homogenato foi centrifugado durante 20 minutos a 7.500 x g (centrífuga Internacional, mod. HR-1-International Equipment Co., Boston), o precipitado resultante foi desprezado e o sobrenadante (extrato bruto) foi usado para as determinações de proteína e para os ensaios de ativade enzimática.

Todas as etapas de extração foram conduzidas a temperatura de 4°C.

B.3 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO

Os ensaios de atividade peptidásica foram realizados, usando-se como substrato L-Leucina-p-nitroanilida (LPA) (Erlanger, 1961 e Beevers, 1968).

Inicialmente, a solução estoque (5×10^{-4} M) do substrato foi preparada, dissolvendo-se 12.56 mg de LPA em 1ml de dimetilsulfóxido e a solução levada a 100ml com cloreto de sódio 0,1 M em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0.

B.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

As concentrações de proteínas nos extratos brutos foram determinadas pelo método do micro-biureto (Goa, 1953), usando-se como padrão albumina sérica bovina. A absorvância em 280nm foi usada nas medidas de concentração de proteína nos efluentes das colunas cromatográficas.

B.5 CONDIÇÕES DE ENSAIO

O extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes foi usado no estabelecimento das condições ótimas de ensaio de atividade LPAásica a ser determinada no extrato bruto de cotilédones de sementes germinantes.

B.5.1 CONCENTRAÇÕES DO SUBSTRATO E DO EXTRATO

As concentrações de substrato e de extrato a serem empregados nos ensaios foram determinadas, usando-se uma mistura de reação encerrando 5,0ml da solução de LPA nas concentrações de 1×10^{-4} M a 5×10^{-4} M e 0,1 ml do extrato di

diluído 10, 5 e 2,5 vezes. A mistura foi incubada por 10 minutos, a 40°C e a reação parada com 1,0ml de ácido acético 30% (p/v). Após 10 minutos de repouso a temperatura ambiente (28°C), o conteúdo dos tubos foi usado para medida de absorvância em 410nm (Espectrofotômetro SPEKOL mod. ZV).

Para determinação do "controle", o extrato e o substrato foram incubados separadamente e após decorridos 10 minutos foram adicionados ao substrato 1,0ml de ácido acético e 0,1 ml do extrato. Assim sendo, o aumento de absorvância em virtude da atividade autodigestiva do extrato foi eliminado.

B.5.2 EFEITO DO pH

Para determinação do pH ótimo de atividade foram preparadas soluções de LPA na concentração de $3 \times 10^{-4}M$ em tampão citrato de sódio 0,2 M no intervalo de pH de 4,0 a 6,0. Tampão fosfato de sódio 0,02 M foi usado no intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas, isto é, 10 minutos, a 40°C.

B.5.3 EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE REAÇÃO

Os ensaios de atividade LPAásica foram realizados nas temperaturas de 30°, 40° e 50° e nos intervalos de tempo de 5, 10, 15 e 20 minutos. Nestes ensaios foram usadas alíquotas de 5,0ml do substrato na concentração de $3 \times 10^{-4}M$ em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 contendo NaCl 0,1 M e 0,1 ml do extrato diluído 10 vezes.

B.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LPAásica EM SEMENTES GERMINANTES

A atividade LPAásica foi determinada em extratos de cotilédones de sementes germinantes, usando-se as seguintes condições: 0,1ml de extrato convenientemente diluído mais 5,0ml de LPA 3×10^{-4} M em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 com NaCl 0,1 M foram incubados por 10 minutos a 40°C. A reação foi parada com 1,0ml de ácido acético a 30% (p/v) e o produto corado formado foi determinado pela medida de absorbância em 410nm. Em todas as experiências foram usados ensaios "controle" como descrito no item B.5.1.

B.6 UNIDADE DA ATIVIDADE

A atividade LPAásica no presente trabalho estã expressa em unidades óticas encontradas pela medida de absorbância em 410nm. Os valores grafados foram corrigidos para o volume de reação após adição de ácido acético 30% (6,1 ml).

A atividade específica está expressa em unidades óticas (A_{410nm}) por miligrama de proteína.

B.7 TERMOESTABILIDADE

No estudo da estabilidade térmica, as amostras do extrato bruto de sementes quiescentes foram submetidas a aquecimento prévio por 10, 20, 30 e 40 minutos nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C. Após aquecimento, alíquotas de extrato foram usadas nos ensaios de atividade peptidásica nas

condições previamente estabelecidas; 40°C, 10 minutos, 0,1 ml do extrato bruto diluído 10 vezes e 5,0ml da solução de LPA $3 \times 10^{-4}M$ em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0.

B.8 FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

O extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes foi usado para fracionamento com sulfato de amônio. A precipitação foi feita, usando-se sulfato de amônio sólido de modo a resultar as concentrações de 0-50, 0-75 e 0-100% de saturação. Após um tempo de contato de 3 horas, a mistura foi submetida à centrifugação por 30 minutos, 7.500xg a 28°C. O precipitado foi redissolvido em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 que continha cloreto de sódio 0,1 M e dialisado contra o mesmo tampão. O conteúdo do saco de diálise foi usado para determinação de proteína e ensaios de atividade de peptidásica.

B.9 FILTRAÇÃO EM GEL

O extrato bruto usado foi preparado a partir de 98 cotilédones de sementes quiescentes (10,5g), triturados com 30ml da solução tampão nas mesmas condições descritas no item B.2. Amostras do extrato bruto foram submetidas à cromatografia em coluna de SEPHADEX-G100. Foi usada uma coluna de 2,5 x 45cm, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 com cloreto de sódio 0,1 M e um fluxo de 25 ml/h. Foram aplicadas na coluna amostras de 3,0ml encerrando 293mg de proteína e feita a eluição com o mesmo tampão. Aliquotas de 4,0ml

foram coletadas e usadas para determinação da absorbância em 280nm (Espectrofotômetro BECKMAN DU) e ensaios de atividade LPAásica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinados os valores de peso fresco de cotilédones de sementes de feijão de corda (Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ) no período de oito dias de germinação. Os resultados apresentados na figura 1 mostram que houve um aumento de peso fresco, a partir do início da germinação até o terceiro dia, quando então passou a decrescer atingindo no oitavo dia um peso correspondente a 85,5% daquele apresentado pela semente quiescente. Os valores grafados representam a média de cinco determinações.

O aumento de peso fresco apresentado nos primeiros dias de germinação, também encontrado por outros autores (Oota et. al., 1953; Ching, 1972), tem sido explicado como sendo em virtude da absorção de água pela semente acompanhado pelo intumescimento dos corpos protéicos. Este intumescimento provavelmente é resultante da hidrólise do material de reserva (lipídios, carboidratos e proteínas) provocando um aumento de pressão osmótica que por sua vez permite aos corpos protéicos maior absorção de água (Chrispeel, 1975; Harris, 1975; Millerd, 1975).

O decréscimo de peso fresco, a partir do terceiro dia, está relacionado com a mobilização do material de reserva para outras partes da planta em desenvolvimento, como sugerido por outros autores.

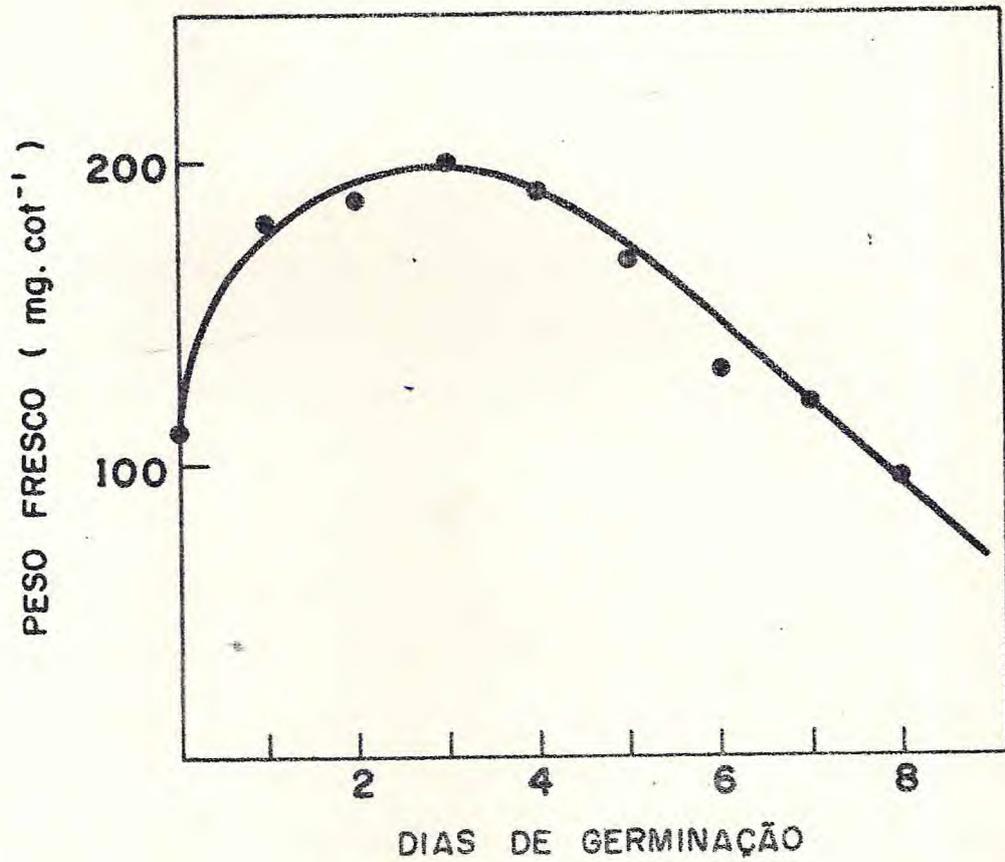


Fig. 1. Peso fresco de cotilédones de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ durante a germinação.

As quantidades de proteínas cotiledonárias extraídas nas condições empregadas no presente trabalho estão representadas na figura 2 e expressas em mg de proteína por cotilédone. Observa-se um decréscimo no teor de proteína a partir do terceiro dia de germinação. No oitavo dia de germinação, o teor de proteína alcança 33% daquele encontrado na semente quiescente.

O decréscimo contínuo na quantidade de proteína está concordante com os resultados encontrados por Oota (1953), Beevers (1968) e Yomo (1973), quando do estudo de sementes germinantes de Vigna sesquipedalis, Pisum sativum e Phaseolus vulgaris, respectivamente.

Os resultados obtidos com Vigna sinensis podem reforçar a hipótese de que durante a germinação há uma hidrólise das proteínas de reserva, em possíveis compostos de menores pesos moleculares, que são translocados dos órgãos de reserva para as zonas de crescimento.

A figura 3 mostra os resultados obtidos no estudo do efeito de diferentes concentrações de substrato na velocidade de catálise enzimática em extratos de cotilédones de sementes de feijão. O meio de reação continha 0,1 ml de extrato bruto de sementes quiescentes e 5,0ml do substrato (LPA) em concentrações variando de $1 \times 10^{-4}M$ até $5 \times 10^{-4}M$. Os valores de densidade ótica grafados correspondem aos valores 2,5 (a), 5 (b) e 10 (c) vezes, encerrando 1,08, 0,54 e 0,27mg de proteína, respectivamente.

O estudo teve por finalidade determinar a concen

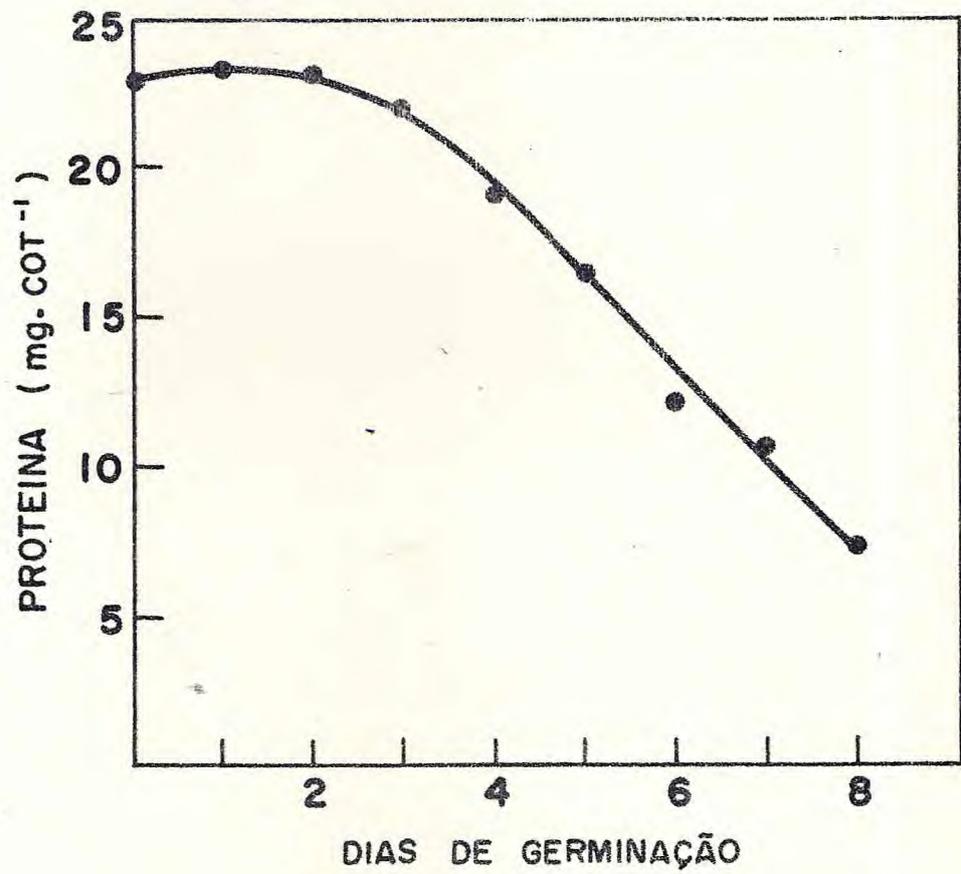


Fig. 2. Teor de proteína extraída de cotilédones de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ durante a germinação.

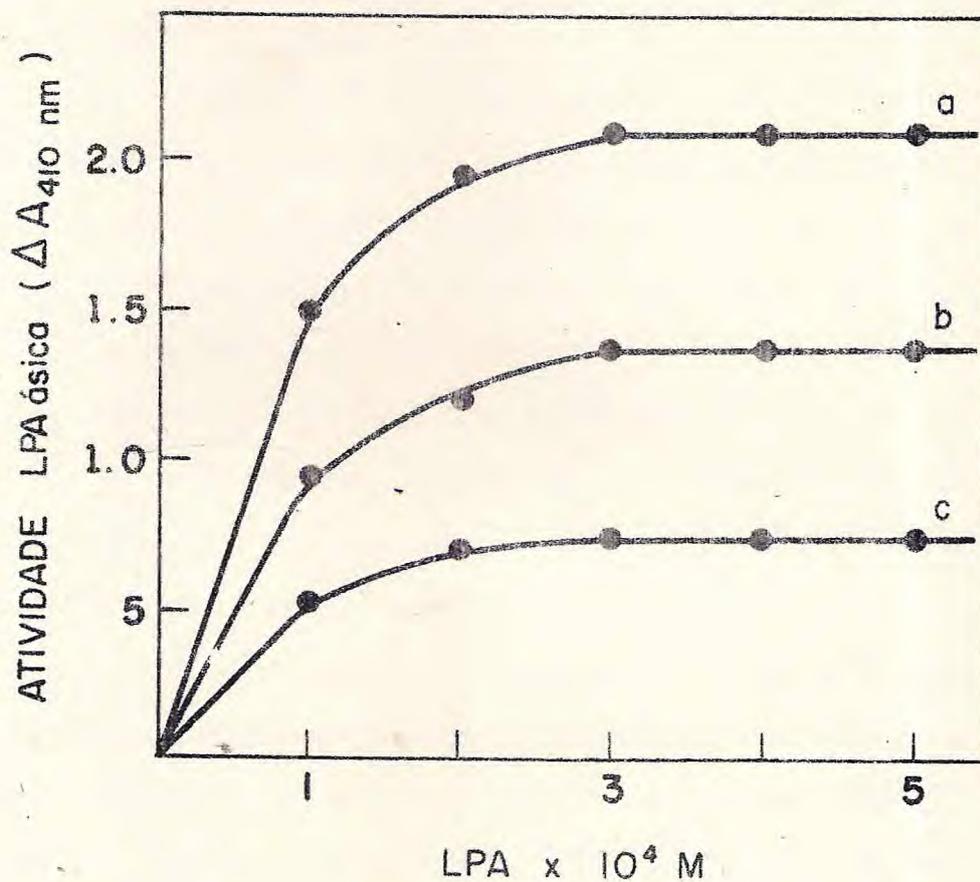


Fig. 3. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de LPAásica presente em extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ - Extratos diluídos 2,5x(a), 5x(b) e 10x(c).

tração molar mínima do substrato que apresentasse um bom rendimento durante os ensaios. Pode-se verificar que a concentração de $3 \times 10^{-4}M$ de LPA é suficiente para saturar a enzima nas condições empregadas.

Foram feitas determinações, a fim de verificar a linearidade da velocidade enzimática em função de crescentes quantidades de enzimas adicionadas. Neste caso foi usado um volume total de reação de 5,0ml encerrando 4,0ml de LPA $3 \times 10^{-4}M$ e as concentrações crescentes da enzima foram obtidas pela adição de tampão fosfato e alíquotas de 0,2 a 0,1 ml do extrato de cotilédones de sementes quiescentes diluído dez vezes, de modo a resultar um volume de 1,0 ml de extrato. As amostras encerravam 0,54 a 2,70mg de proteína.

Os resultados apresentados na figura 4 mostram que a atividade LPAásica aumenta linearmente em função de quantidades crescentes de extrato bruto nos limites usados.

O efeito do pH na atividade LPAásica detectada foi estudado, usando-se na preparação do substrato tampões com diferentes valores de pH. O meio de reação encerrava 5,0ml de LPA $3 \times 10^{-4}M$ em soluções cujo pH variava de 4,0 a 8,0 e 0,1ml de extrato bruto diluído 10 vezes.

A figura 5 mostra os resultados obtidos quando do emprego de tampão citrato 0,2 M variando de pH 4,0 a 6,0 e tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,0 a 8,0.

O substrato em tampão fosfato pH 7,0 foi escolhido para as determinações posteriores e está em concordância com

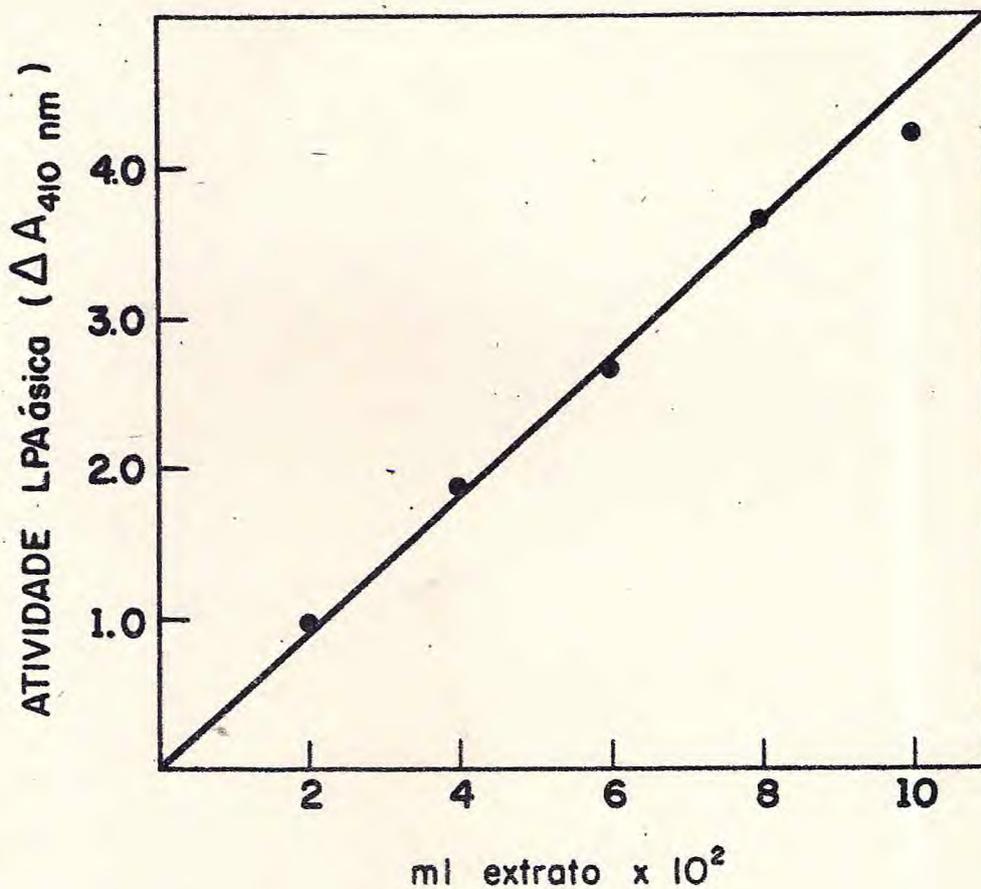


Fig. 4. Efeito da concentração da enzima presente em extra-
tos de cotilédones de sementes quiescentes de fei-
jão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ na
velocidade de reação.

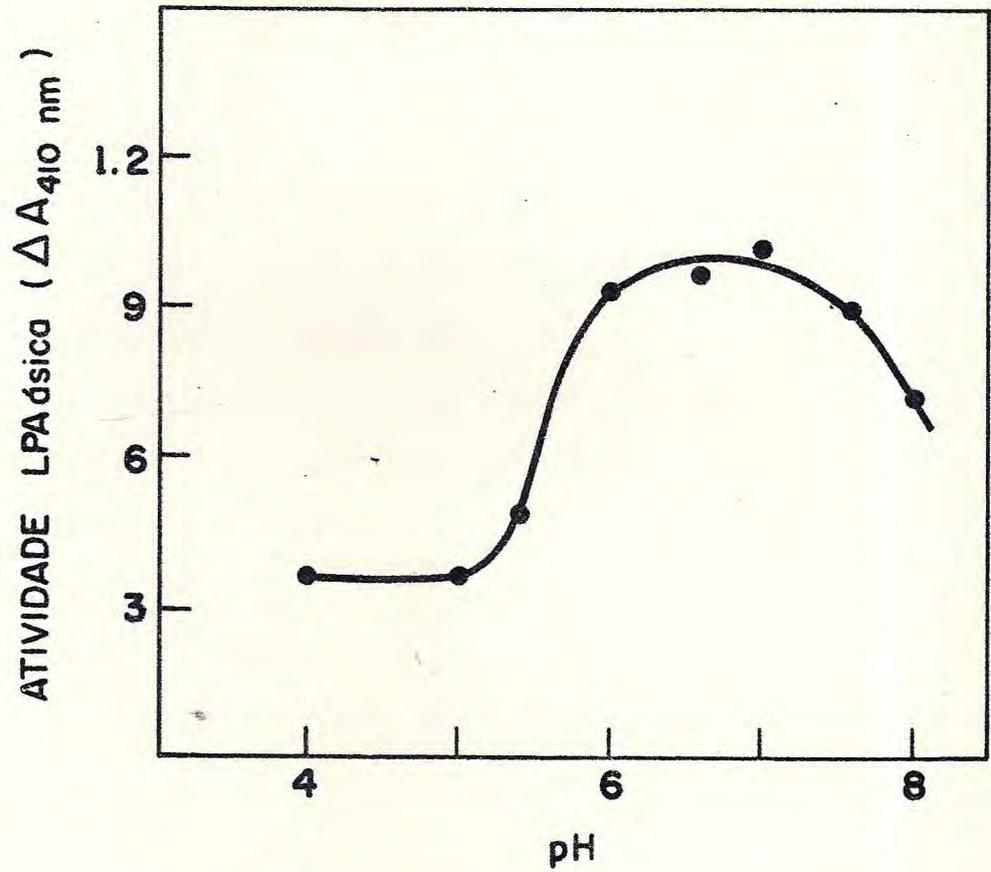


Fig. 5. Efeito do pH sobre a atividade LPAásica presente em extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ.

a escolha feita por outros autores (Beever, 1968; Chrispeel, 1975).

Após determinação das quantidades de substrato e enzima (extrato bruto) a serem utilizados nos ensaios de atividade LPAásica, bem como o pH, foram feitos ensaios para verificar o efeito da temperatura. A figura 6 mostra que a temperatura de 40°C e o tempo de 10 minutos já usados por Beever (1968) e Erlanger (1961) era uma condição que poderia ser mantida nos ensaios subsequentes.

Tendo em vista os resultados até aqui apresentados, foram escolhidas as seguintes condições de ensaio: temperatura, 40°C; tempo, 10 minutos; pH 7,0; concentração do substrato no volume final de reação $3 \times 10^{-4}M$; extrato bruto de sementes germinantes diluído convenientemente de modo a resultar um valor de densidade ótica dentro dos limites de linearidade apresentados na figura 4; concentração de ácido acético no volume final, 5%.

Antes de ser determinada a atividade LPAásica durante a germinação, foi verificada a estabilidade da atividade enzimática quando extrato bruto era submetido ao aquecimento.

A figura 7 mostra os resultados obtidos quando o extrato bruto foi aquecido a 30°, 40° e 50°C, por 10, 20, 30 e 40 minutos e a atividade LPAásica determinada nas condições já estabelecidas. Pode-se verificar que a atividade LPAásica é resistente ao aquecimento a 30°C até 40 minutos. O extrato

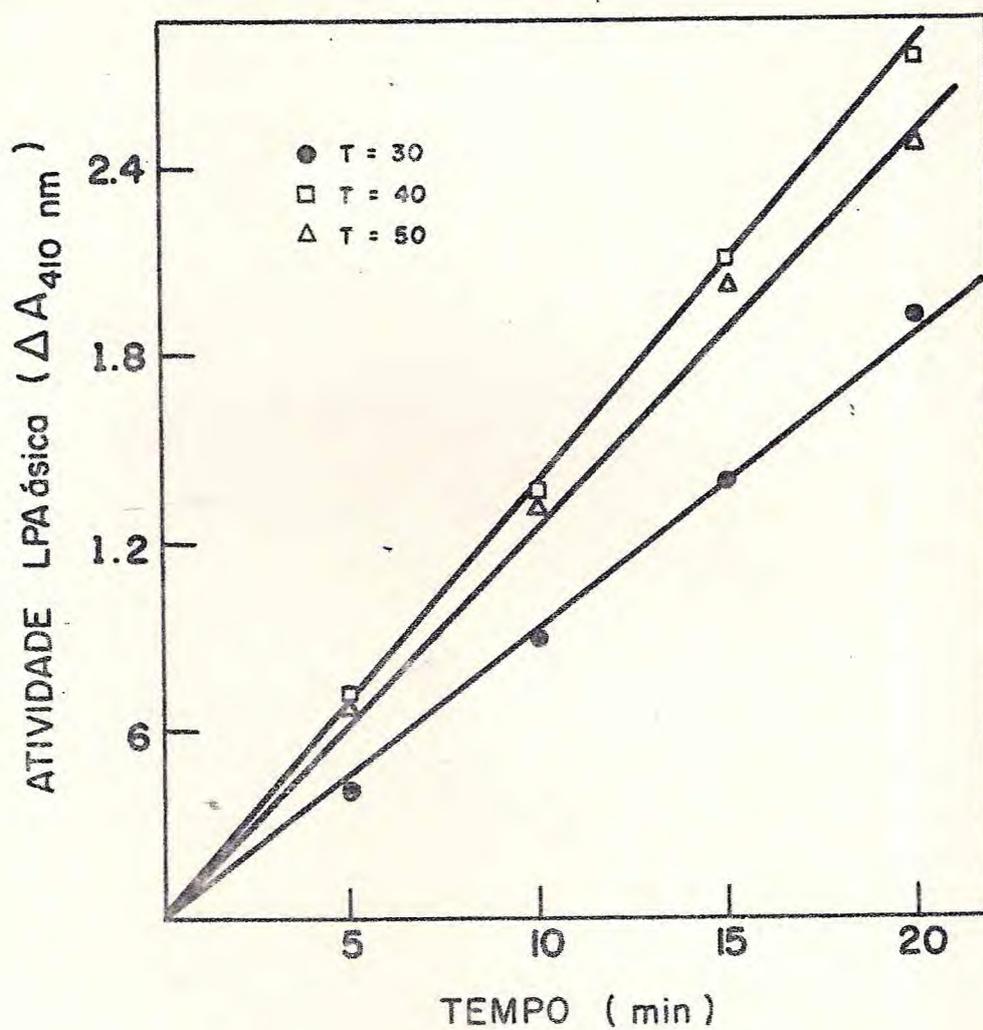


Fig. 6. Efeito da temperatura sobre a atividade LPAásica presente em extratos de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ.

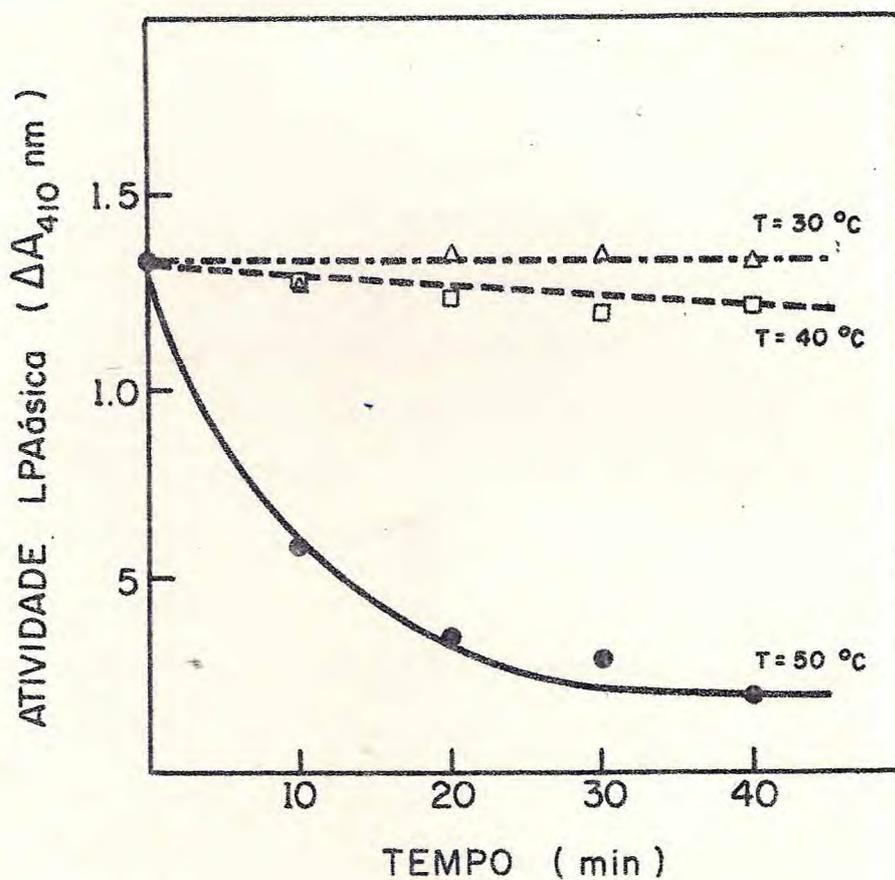


Fig. 7. Termoestabilidade da atividade LPAásica presente em extrato de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L) Savi cv. Seridô.

quando aquecido a 40°C apresenta um ligeiro decréscimo da atividade enzimática. Quando o extrato bruto é aquecido a 50°C, o tempo de 10 minutos é suficiente para reduzir a atividade LPAásica presente a 46% daquela apresentada inicialmente. O aquecimento por 40 minutos a 50° é suficiente para reduzir a atividade a 15% da atividade inicial.

Os dados aqui obtidos reforçam aqueles apresentados na figura 6. Quando o ensaio de atividade é realizado a 50°C não há o aumento de atividade esperado.

A variação da atividade LPAásica, presente em extratos de cotilédones de sementes quiescentes, foi determinada durante a germinação. A variação da atividade total é apresentada na figura 8 quando os resultados obtidos são expressos em unidades de atividade por cotilédones. Verifica-se que a atividade total sofre ligeiro aumento nos dois primeiros dias, quando começa a decrescer, alcançando no 3º dia o mesmo valor encontrado para sementes quiescentes, e no 8º dia somente 25,5% da atividade inicial está presente. O decréscimo no teor de LPAase, durante a germinação, aqui encontrado, está em concordância com os dados apresentados para sementes germinantes de *Pisum sativum* (Beevers, 1968) e de *Phaseolus aureus* Roxb (Chrispeels e Boulter, 1975). Harris, Chrispeels e Boulter (1975) fazem referência ao decréscimo da atividade aminopeptidásica em sementes germinantes de *Vigna unguiculata*, até o 5º dia de germinação, usando LPA como substrato, porém as condições de ensaio não foram descritas.

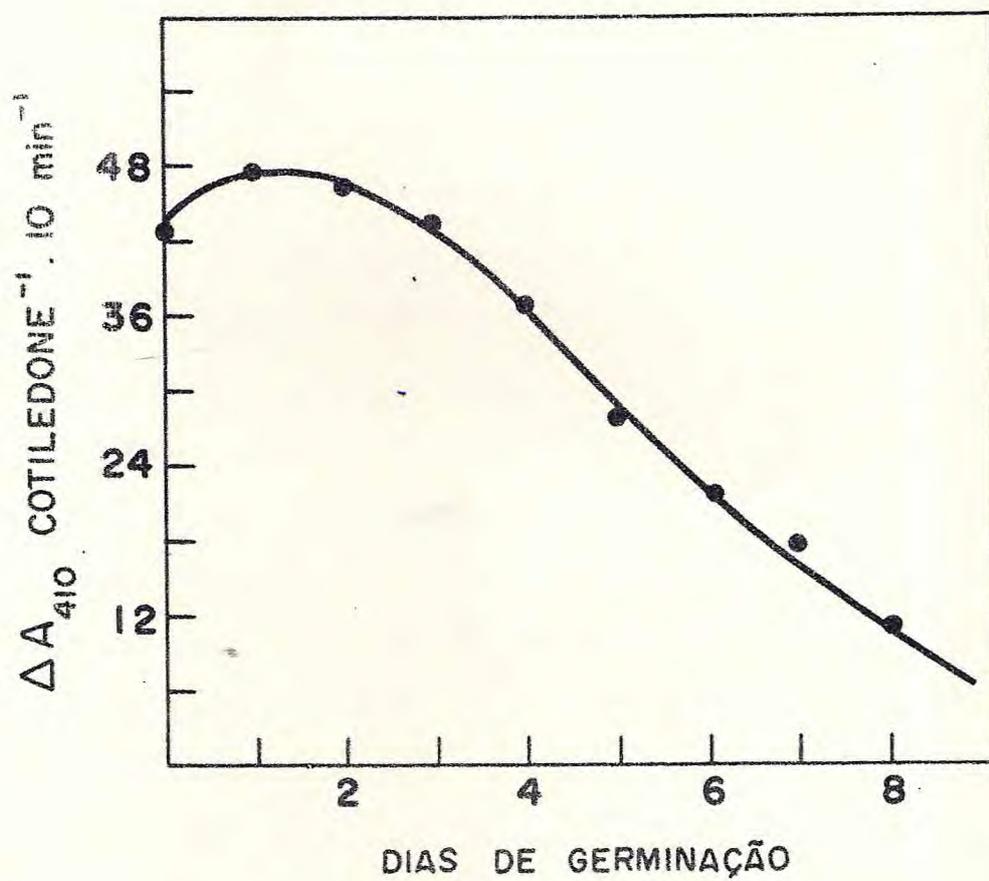


Fig. 8. Atividade LPAásica em extrato de cotilédones de sementes germinantes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L) Savi cv. seridõ.

O decréscimo na atividade LPAásica por cotilédone acompanha o decréscimo do teor de proteínas cotiledonárias extraídas, resultando uma atividade específica aproximadamente constante. A figura 9 mostra o gráfico obtido quando a atividade é expressa em ~~unidades~~ unidades de atividade por mg de proteína em 10 minutos.

O extrato bruto foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio, com o objetivo de se obter uma fração com atividade específica mais alta.

Pode-se verificar pelos resultados apresentados na tabela 1 que a fração precipitada entre 0-50% de saturação com sulfato de amônio encerra maior atividade.

A figura 10 apresenta os resultados da filtração do extrato bruto em SEPHADEX - G100. Verifica-se a presença de duas frações, uma com peso molecular elevado (eluído no volume de exclusão) e outra de peso molecular menor, encerrando cerca de 70% da atividade inicial.

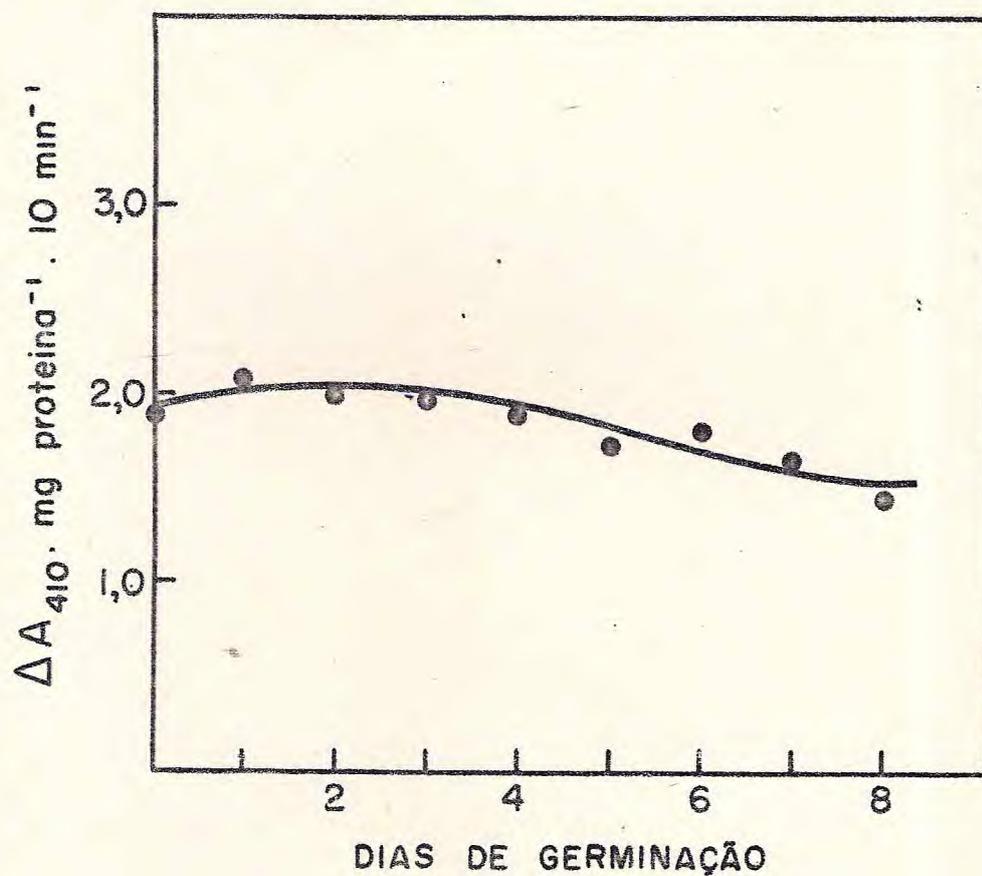


Fig. 9. Atividade LPAásica específica em extrato de cotilédones de sementes germinantes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ.

TABELA 1 - Fracionamento do extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes por precipitação com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	VOLUME	PROTEÍNA TOTAL	ATIVIDADE TOTAL	ATIVIDADE ESPECÍFICA	RECUPERAÇÃO	PURIFICAÇÃO
	ml	mg	UO _{410nm}	UO _{410nm} /mg P	%	
Ext. Inic.	20	569,0	523,0	0,9	100	-
0-50%	20	198,4	402,5	2,0	77	2,2 x
0-75%	20	261,3	438,7	1,7	84	1,8 x
0-100%	20	364,8	400,0	1,1	75	1,2 x

Os dados referem-se a 20ml do extrato bruto preparado na proporção de 1g de cotilédone para 10ml de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 que continha NaCl 0,1 M.

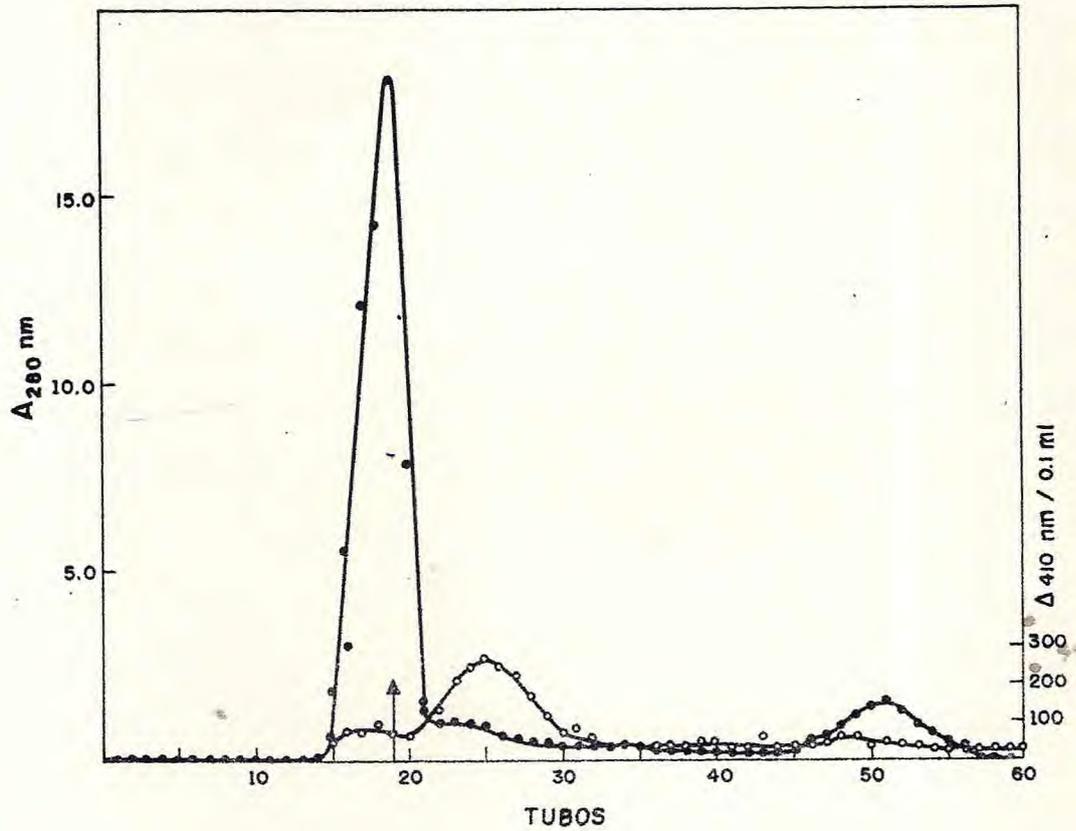


Fig. 10. Cromatografia em Sephadex G-100 de extrato de cotilédones de sementes quiescentes de feijão de corda *Vigna sinensis* (L) Savi cv. seridõ. Coluna: 2,5 x 45cm. Tampão: fosfato de sódio 0,02M, pH 7.0, com NaCl 0,1M. Fluxo: 25ml/hora. Volume das frações : 4ml/tubo.

IV. CONCLUSÕES

Pode-se concluir:

1. O extrato de sementes quiescentes e germinantes de Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ é capaz de hidrolisar o peptídeo sintético LPA (L-leucina-p-nitroanilida), indicando a presença de leucina-aminopeptidases ativas em sementes quiescentes.
2. As condições ótimas de ensaios de atividade LPAásica em sementes quiescentes são: concentração do substrato ($3 \times 10^{-4}M$), concentração da enzima (extrato bruto diluído 1:100), temperatura ($40^{\circ}C$), pH (7,0) e tempo (10 minutos).
3. A atividade LPAásica detectada em extratos de cotilédones de sementes quiescentes é resistente ao aquecimento por 40 minutos a $30^{\circ}C$.
4. A atividade LPAásica total decresce gradualmente durante a germinação atingindo no decorrer de oito dias 25,5% da atividade inicial.
5. O decréscimo da atividade LPAásica durante a germinação acompanha o decréscimo do teor de proteínas cotiledonárias, mantendo uma atividade específica aproximadamente constante.
6. A fração do extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes de Vigna sinensis (L) Savi cv. seridõ que preci

pita até 50% de saturação com sulfato de amônio encerra maior percentagem de atividade.

7. A filtração do extrato bruto de cotilédones de sementes quiescentes do feijão em SEPHADEX - G100 apresenta duas frações, uma com peso molecular elevado (eluída no volume de exclusão) e outra de peso molecular 67.920 daltons que encerra cerca de 70% da atividade inicial aplicada na coluna.

BIBLIOGRAFIA

- Ashton, F.M., 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:95-117.
- Bergman, M. 1942. Advances in Enzymol. 2:49. Citado em The Enzymes vol. 4 ed. 2. Academic Press, New York and London 1960
- Beevers, L. 1968. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). Phytochem. 7:1837-1844.
- Beevers, L. & W.E. Splittstoesser. 1968. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. J.exp.Bot. 19:698-771
- Cameron, E.C., & M. Mazelis. 1971. A Nonproteolytic "trypsin-like" enzyme. Plant Physiol. 48:278-281.
- Caldwell, J.B., & L.G.Sparrow. 1976. Partial purification and characterization of two peptide hydrolases from pea seeds. Plant Physiol. 57:795-798.
- Chrispeels, M., & D.Boulter. 1975. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of Endopeptidase. Plant Physiol. 55:1031-1037
- Ching, T.M. 1972. Metabolism of germinating seeds. In:Seed Biology, vol. II, T.T. Kozlowski, ed. Academic Press, New York pp. 103-218.

- Determann, H. & W. Michel, 1966 J. Chromatog. 25 303-313.
- Dechary, J. M., 1970. Seed proteases and protease inhibitors.
Econ. Bot. 24:113-122.
- Erlanger, B.F., Nicholas K. & William C. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95:271-78.
- Elleman, T.C. 1974. Aminopeptidases of pea. Biochem. J. 141:113-118.
- Goa, J. 1953. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid
Scand J. Clin. Lab. Invest. 5:218-222.
- Harris, N. & M.J. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. Plant. Physiol. 56:292-299.
- Harris, N.M.J. Chrispeels, and D. Boulter, 1975. J. exp. Bot. 26:544-554.
- Irving, G.W.Jr. & T.D.Fontaine. 1945. Purification and properties of arachain, a newly discovered proteolytic enzyme of the peanut. Arch. Biochem. 6:351-364
- Mikola, J. 1976. Activities of various peptidases in cotyledons of germinating peanut (Arachis hypogaea).Physiol.Plant. 36:255-258.

- Millerd, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins, Ann. Rev. Plant. Physiol. 26:53-72.
- Quichi, T. & A. Hiramtsu. 1956. Nippon Nōgei-kagaku kaishi 30:754. Citado em Dechary, J.M. 1970.
- Oota, Y., R. Fujii & S.Osawa. 1953. Changes in chemical constituents during the germination of a bean, Vigna sesquipedalis. J.Biochem (Japan). 40:649-661.
- Prisco, J.T. & J.W.O'Leary. 1970. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of Phaseolus vulgaris L. seeds. Turrialba, 20:177-184.
- Ryan, A.C. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24:173-196.
- Semetaite, L.B. 1962. Activity and quality of peptidases in seeds of Vigna sinensis and C. arborescens. Byul. Gl. Botan. Sada. 45:84-87.
- Varner, J.E. & G.Schidlovsky. 1963. Intracellular distribution of proteins in peas cotyledons. Plant Physiol. 38:139-144.
- Yomo, H. & K.Srinivasan. 1973. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol., 52:671-673.