

SUBSTRATOS ENDÓGENOS NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA  
EM COTILÉDONES DE Vigna unguiculata (L) Walp. cv. seridô.

ANA LÚCIA PONTE FREITAS

---

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1982

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

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Ana Lúcia Ponte Freitas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16-07-82

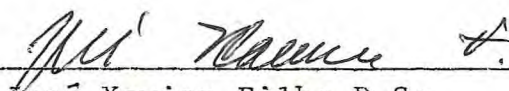
---

Iracema Lima Airouz  
Orientador da Dissertação

---

Renato de Azevedo Moreira, D.Sc.

---

  
José Xavier Filho, D.Sc.

À memória de minha Mãe

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor e de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (Projeto de Pesquisas em Sementes).



## AGRADECIMENTOS

À professora Iracema Lima Ainouz, pela orientação e estímulo permanente durante a execução deste trabalho.

Aos professores Renato de Azevedo Moreira e José Xavier Filho, pelas importantes sugestões e discussões apresentadas durante a realização desta dissertação.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular responsáveis pelo ambiente de colaboração necessário ao bom desenvolvimento de qualquer trabalho científico.

Finalmente, agradeço de modo especial a meu esposo e filhos que com compreensão e renúncia contribuíram para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	x
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u> .....	xi
<u>RESUMO</u> .....	xii
<u>ABSTRACT</u> .....	xiii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
2 - <u>MATERIAIS</u> .....	7
2.1 - <u>Material Vegetal</u> .....	7
2.2 - <u>Reagentes</u> .....	7
3 - <u>MÉTODOS</u> .....	8
3.1 - <u>Extração e Diazotização das Proteínas usa-</u> <u>das como Substrato</u> .....	8
3.1.1 - <u>Preparação da Farinha</u> .....	8
3.1.2 - <u>Preparação do Extrato</u> .....	8
3.1.3 - <u>Diazotização das Albuminas e Globulinas</u> ...	9
3.1.4 - <u>Preparação das Soluções usadas como Subs-</u> <u>trato</u> .....	10
3.2 - <u>Condições de Germinação</u> .....	10
3.3 - <u>Preparação dos Extratos de Cotilédones Quies-</u> <u>centes e Germinantes usados como Fonte de</u> <u>Enzima</u> .....	11
3.4 - <u>Determinação de Proteína</u> .....	11
3.5 - <u>Determinação das Atividades Azoalbuminásica</u> <u>e Azoglobulinásica</u> .....	12
3.5.1 - <u>Concentrações dos Substratos e dos Extratos.</u>	12
3.5.2 - <u>Efeito do pH</u> .....	13
3.5.3 - <u>Efeito da Temperatura e do Tempo de Reação.</u>	13

3.6	- <u>Unidade de Atividade</u> .....	13
3.7	- <u>Fracionamento das Proteínas por Diálise e Precipitação com Sulfato de Amônio</u> .....	14
3.8	- <u>Fração 0/75 do Extrato de Cotelédones de Sementes Germinadas por 3 Dias</u> .....	14
3.8.1	- <u>Estabilidade Térmica</u> .....	15
3.8.2	- <u>Fracionamento por Filtração em Gel de Sephadex G-100</u> .....	15
3.9	- <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u> ....	16
3.10	- <u>Determinação das Atividades BAPA-ásica e LPA-ásica</u> .....	17
4	- <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	18
4.1	- <u>Condições de Ensaio</u> .....	18
4.2	- <u>Atividade Azoalbuminásica e Azoglobulinásica durante a Germinação</u> .....	25
4.3	- <u>Purificação da Fração com Atividades Azoalbuminásica e Azoglobulinásica</u> .....	32
4.4	- <u>Termoestabilidade da Fração 0/75</u> .....	35
4.5	- <u>Filtração da Fração 0/75 em Sephadex G-100</u> .....	42
4.6	- <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u> ....	42
5	- <u>CONCLUSÕES</u> .....	48
6	- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	50
7	- <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u> .....	53



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Efeito da concentração do substrato sobre as atividades azoA e azoG em cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	20
2	Efeito da concentração da enzima sobre as atividades azoA e azoG de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	21
3	Efeito do pH sobre as atividades azoA e azoG de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	22
4	Efeito do tempo de reação sobre as atividades azoA e azoG de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	23
5	Efeito da temperatura de reação sobre as atividades azoA e azoG em cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.	24
6	Peso fresco, peso seco e teor de proteína extraída de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó durante a germinação .....	28



## FIGURA

## Página

7	Atividades azoA e azoG de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó durante a germinação.	29
8	Atividade específica em extratos de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó durante a germinação, observada contra os substratos azoalbumina e azoglobulina .....	31
9	Proteína e atividades azoA e azoG nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio, do extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias..	37
10	Esquema de obtenção da fração 0/75 de extrato de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	38
11	Termoestabilidade da atividade azoA presente na fração 0/75 de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó.	40
12	Termoestabilidade da atividade azoG presente na fração 0/75 de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó.	41
13	Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 0/75 liofilizada .....	43
14	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas, nas diversas etapas de purificação; do extrato de cotilédones de sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias .....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Padronização dos hipocótilos usados para a retirada dos cotilédones .....	26
2	Atividades azoA e azoG nas frações obtidas por diálise contra água .....	34
3	Atividades azoA e azoG nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio .....	36
4	Atividade azoA nas frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-100 .....	44
5	Atividade azoG nas frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-100 .....	45

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

azoA	Atividade azoalbuminásica.
azoG	Atividade azoglobulinásica.
Fração 0/75	Fração obtida de extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias, por precipitação com sulfato de amônio de 0 a 75% de saturação.
BAPA	$\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida.
BSA	Albumina sérica bovina.
LPA	L-Leucina-p-nitroanilida.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
TCA	Ácido tricloroacético.
UA	Unidade de atividade, definida como a quantidade de enzima que produz uma absorvância de 0,001 em 440 nm por 1 ml do extrato por 30 minutos.
UA/mg	Valor em unidades de atividade de uma solução encerrando 1 mg de proteína por ml, através do qual se expressa a <u>atividade específica</u> .



## RESUMO

A atividade proteolítica em cotilédones de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô foi determinada usando-se como substrato proteínas diazotizadas de sementes quiescentes (azoalbuminas e azoglobulinas) e como fonte de enzima extrato de cotilédones de sementes quiescentes e germinantes.

As condições de ensaio empregadas foram: tempo de reação, 30 minutos; temperatura, 50°C; concentração final do substrato, 1,3%; pH 6,0 para azoalbumina e 6,9 para azoglobulina.

As atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica aumentam até o terceiro dia de germinação passando então a decrescer até o sétimo dia.

Cotilédones de sementes germinadas por três dias foram usados para purificação da fração responsável pelas atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, por precipitação com sulfato de amônio (0 a 75% de saturação) seguida de cromatografia em Sephadex G-100. A fração responsável por ambas as atividades em estudo apresentou uma purificação de cerca de 5 vezes, peso molecular de 22.000 daltons e estabilidade quando aquecida a 40°C por até 40 minutos.

Os resultados sugerem que o sistema enzimático responsável pela hidrólise das azoalbuminas e azoglobulinas é diferente daqueles responsáveis pela hidrólise de caseína, hemoglobina,  $\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida e L-Leucina-p-nitroanilida.



## ABSTRACT

Azoalbumins and azoglobulins prepared from cotyledons of mature dry seeds of Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó were used as substrates to measure the proteolytic activity during seed germination. The assays were carried out at 50°C, for 30 minutes, at pH 6.0 and pH 6.9 for azoalbumins and azoglobulins, respectively. The azoalbuminic and azoglobulinic activities increase up to the 3rd day decreasing until the 7th day after planting.

Cotyledons from seeds of 3rd day germination were used to purify an active fraction by precipitation with ammonium sulfate followed by chromatography on Sephadex G-100. The active fraction presents a molecular mass of 22.000 daltons and it is not able to hydrolyse casein, hemoglobin,  $\alpha$ -N-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide or L-Leucine-p-nitroanilide.

## 1 - INTRODUÇÃO

A compreensão dos processos envolvidos na mobilização das proteínas de reserva de sementes durante a germinação constitui um problema aberto. Apesar do número crescente de trabalhos sobre o assunto, todos são unânimes em dizer que ainda não existem dados suficientes para uma compreensão dos eventos iniciais do processo germinativo, com relação a mobilização das proteínas de reserva.

Diante dos dados existentes os corpos protéicos, as proteínas de reserva e as enzimas proteolíticas são considerados os principais componentes envolvidos na mobilização de proteínas da semente durante o período de desenvolvimento da plântula. Não se sabe seguramente se os produtos de hidrólise das proteínas são aminoácidos ou peptídios. Neste caso, outras peptidases seriam necessárias para a hidrólise desses peptídios a aminoácidos (ASHTON, 1976).

Encontramos ainda conclusões conflitantes, advindas talvez dos diferentes métodos de estudo utilizados, bem como da grande variedade de espécies empregadas. A localização, ativação ou síntese de novo das enzimas envolvidas na hidrólise das proteínas permanecem no campo das especulações.

Muitas contribuições têm sido fornecidas provindas de investigações sobre a mobilização das proteínas de reserva em sementes, no entanto muitas críticas ainda podem ser feitas. Uma delas diz respeito à ausência de métodos de ensaio adequados à determinação das atividades enzimáticas. As técnicas geralmente utilizadas envolvem a remoção das proteínas não hidrolisadas por precipitação com ácido tricloroacético, seguida pela medida de um acréscimo de absor



ção em 280nm, acréscimo em grupos amínicos pela ninhidrina ou acréscimo em tirosina pelo método de LOWRY (ASHTON, 1976). Outra crítica pode ser feita quanto ao emprego de substratos inapropriados, quer sejam eles sintéticos, de origem animal ou mesmo proteínas vegetais originadas de espécies diferentes.

A maior limitação para o uso dos vários substratos sintéticos e substratos de origem animal é que as enzimas proteolíticas nativas de sementes germinantes devem ter uma maior especificidade pelas proteínas de reserva. Além disso, as globulinas como as principais proteínas de reserva de várias sementes, apresentam reduzida solubilidade nos tampões comumente usados e isso dificulta consideravelmente a medida das atividades enzimáticas (REILLY et al., 1978).

A utilização de substâncias estranhas à planta como substrato permite-nos afirmar que a planta encerra enzimas capazes de hidrolisar os substratos empregados. Porém, não podemos afirmar que tais enzimas são capazes de usar in vivo as proteínas de reserva da planta.

Vários pesquisadores têm admitido que o uso de substratos endógenos fornece uma indicação mais precisa das capacidades hidrolíticas das enzimas vegetais, muito embora parte das informações existentes resulte do emprego de substratos de outras origens (BURGER, 1966).

A atividade proteolítica presente em sementes tem sido estudada ultimamente pelo emprego de proteínas de reserva da mesma espécie ou de espécies diferentes. (HARVEY & OAKS, 1974; BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1977; REILLY et al., 1978; SHEPARD & MOORE, 1978; MINAMIKAVA, 1979; HARA & MATSUBARA, 1980) e ainda pela utilização de azoproteínas endógenas (GOAD, 1963; HOBDAÏ et al., 1973; PUSZTAI et al., 1977).

HOBDAÏ et al. (1973), estudando a distribuição sub

celular da atividade proteolítica, da atividade inibitória de tripsina e do efeito inibidor sobre as proteases endógenas em sementes germinantes de ervilha, não encontraram evidências convincentes de que a atividade de inibidores de tripsina esteja envolvida na regulação de proteases durante a germinação. Os resultados observados indicaram no entanto, que houve um acréscimo na atividade azoglobulinásica e concomitante redução da atividade inibitória. Eles sugeriram que o acréscimo era o resultado da síntese de novo de uma proteína enzimática ou decorrente da ativação de uma enzima inativa. A azoglobulina utilizada nos ensaios de atividade enzimática foi preparada, segundo o método de GOAD (1963), a partir das globulinas de sementes de ervilha.

O estudo da compartimentalização celular por sedimentação diferencial realizado por PUSZTAI et al. (1977), em cotilédones de sementes de Phaseolus vulgaris L., revelou que a maioria da atividade azocaseinásica, azoalbuminásica (BSA) e azoglobulinásica nos cotilédones encontra-se ligada a paredes celulares ou a outros elementos estruturais insolúveis. Os autores concluíram que a hidrólise das proteínas de reserva da semente, como um primeiro evento no metabolismo protéico da germinação, está sujeito a sérias dúvidas. Para eles o aumento substancial de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, que ocorre nas primeiras etapas da germinação, não deve ser devido a degradação do esqueleto peptídico das glicoproteínas de reserva mas possivelmente dos grupos amídicos destas proteínas.

HARVEY & OAKS (1974) caracterizaram uma protease ácida do endosperma do milho e mostraram que a enzima é ativa contra gliadina e edestina, além de apresentar apreciável atividade endopeptidásica com outros substratos utilizados. Para a medida da atividade enzimática, eles desenvolveram ensaios em gel de agar encerrando os substratos, além de outros métodos considerados de rotina. A degradação das proteínas do endosperma do milho por uma protease endógena



foi comprovada pelos ensaios em gel de agar.

BAUMGARTNER & CHRISPPEELS (1977) purificaram e caracterizaram a vicilina-peptídio-hidrolase, enzima capaz de hidrolisar in vitro a principal proteína de reserva de cotilédones germinantes de Vigna radiata (L.) Wilczek. Pelos experimentos realizados, eles concluíram que a hidrólise de vicilina in vitro pode ocorrer pela ação cooperativa de uma carboxipeptidase e a peptídio-hidrolase isolada.

REILLY et al. (1978) estudaram o sistema proteolítico que solubiliza a globulina de semente de abóbora (Cucurbita moschata). A globulina da semente quiescente foi purificada pelo método de VICKERY et al. (1941) modificado e usada como substrato. A peptidase capaz de hidrolisar essa proteína de reserva não é ativa contra os substratos caseína, hemoglobina ou BSA, e apresenta um máximo de atividade no segundo dia de germinação (sistema proteolítico I). O decréscimo de atividade, observado a partir de então, é acompanhado pelo aumento de proteínas solúveis em água.

O sistema proteolítico II, presente nos cotilédones de abóbora durante a germinação, apresenta atividade máxima no sexto dia, sendo capaz de hidrolisar caseína, hemoglobina, BSA e a própria globulina da semente.

Eles concluíram que a atividade proteolítica associada com o aparecimento de aminoácidos não está relacionada com a degradação primária da PSG (globulina da semente de abóbora) e sim com os derivados solúveis de PSG.

Uma protease encontrada em cotilédones de Lupinus angustifolius no quinto dia de germinação foi parcialmente purificada e caracterizada por SHEPARD & MOORE (1978) que encontraram ser a mesma capaz de hidrolisar as três principais frações globulínicas dessa semente ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  congutinas), além da gliadina uma proteína de reserva do endosperma do trigo. A purificação foi feita por fracionamento com sul

fato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e filtração em gel de Sephadex G-75.

MINAMIKAWA (1979) estudou as atividades hidrolíticas e a degradação dos componentes de reserva nos cotilédones germinantes de sementes de Phaseolus mungo. Os resultados obtidos foram comparados com a atividade hidrolítica de enzimas de sementes de outras espécies de leguminosas. Foi também examinado o efeito da remoção do eixo, nos estágios iniciais da germinação, sobre o metabolismo dos componentes de reserva. Usando como substratos caseína e globulina endógena de cotilédones de sementes com 24 horas de germinação, ele determinou a atividade proteolítica nos extratos de cotilédones de sementes convenientemente tratadas, tendo em vista a presença ou não do eixo embrionário. As atividades observadas para ambos os substratos usados foram semelhantes, sendo que a atividade globulínica mostrou-se um pouco mais baixa do que a atividade caseolítica.

As atividades proteolíticas I e II presentes nas sementes de Curcubita sp. foram determinadas por HARA & MATSUBARA (1980), usando como substratos proteínas endógenas tais como a globulina da semente quiescente e o produto de hidrólise do primeiro sistema proteolítico que eles denominaram de  $F_{\alpha\beta}$ , além das proteínas de origem animal (BSA e citocromo c de coração de cavalo). O substrato para a atividade proteolítica II foi o  $F_{\alpha\beta}$  originando pequenos peptídeos e aminoácidos como produtos de hidrólise. Eles observaram uma limitada atividade proteolítica I em cotilédones de 0 - 2 dias. Sementes quiescentes e cotilédones nos estágios iniciais de germinação mostraram reduzida atividade proteolítica II contra ambos os substratos endógenos.

Como se pode observar pelos trabalhos realizados, o controle da especificidade enzimática no que diz respeito a diferentes classes de proteínas de reserva é de interesse para os estudiosos de proteinases de planta, tendo em vista



o início relativamente recente de esforços com a finalidade de estudar proteases usando proteínas de reserva natural de plantas.

A análise dos conhecimentos relacionados com os eventos iniciais da germinação mostra que ainda não se conhece a estrutura do substrato, o envolvimento das várias enzimas, o mecanismo de controle e a natureza dos produtos intermediários (ASHTON, 1976).

O presente trabalho tem como objetivo a utilização de substratos endógenos (azoalbumina e azoglobulina) no estudo das atividades proteolíticas de sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô, admitindo-se que o uso de tais substratos possa fornecer dados mais próximos das condições reais, contribuindo assim para o esclarecimento das características dos sistemas envolvidos na metabolização das proteínas de reserva.

## 2 - MATERIAIS

### 2.1 - Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridõ provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curu, Pentecoste, Ceará, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### 2.2 - Reagentes

Albumina sérica bovina - Fração V 96-99% (Lot. 126c-0199) de Sigma Chemical Co., St Louis, EUA.

Acrilamida e N-N' - metileno bisacrilamida - Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y., EUA.

$\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (Lot. 91c - 2460) e L-Leucina-p-nitroanilida (Lot. 9125), substratos cromogênicos obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Beta-mercaptoetanol - E. Merk, Darmstadt, Alemanha.

Dodecil sulfato de sódio - E. Merk, Darmstadt, Alemanha.

Sephadex G-100 média (Lot. 5967; particle size: 40 - 120 $\mu$ ) e Blue Dextran 2000, adquiridos de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.



### 3 - MÉTODOS

#### 3.1 - Extração e Diazotização das Proteínas usadas como Substrato

##### 3.1.1 - Preparação da Farinha

Sementes não germinadas de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô foram utilizadas para o preparo da farinha de cotilédones, após remoção das películas e eixos. Os cotilédones foram triturados em moinho Wiley adaptado com uma tela de 40 malhas por polegada linear (40 mesh) e a farinha assim obtida foi mantida a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2 - Preparação do Extrato

O extrato foi obtido a partir da farinha de cotilédones de sementes não germinadas, usando-se como meio de extração tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). O homogenado, preparado na proporção 1:5 (tecido: meio de extração), após quatro horas de contacto foi filtrado e centrifugado durante 30 minutos, 7500xg, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O resíduo obtido foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado para determinação de proteína e diálise contra água. Após diálise, as frações solúveis (albuminas) e insolúveis (globulinas) foram separadas por centrifugação, nas mesmas condições acima citadas, liofilizadas e usadas posteriormente para diazotização.

### 3.1.3 - Diazotização das Albuminas e Globulinas

As albuminas e globulinas obtidas de sementes não germinadas foram diazotizadas segundo o método de GOAD (1963) para azoglutelinas do trigo por nós modificado. As preparações denominadas AZOALBUMINA e AZOGLOBULINA foram usadas como substrato nas determinações de atividade enzimática e obtidas conforme a sequência descrita a seguir.

ETAPA 1 - Foi preparada uma solução (A) constituída de:

Ácido sulfanílico .....	0,154 g
Brometo de potássio .....	0,0214 g
HCl 1,0 N .....	22,50 ml
Água destilada .....	18,50 ml

À solução mantida em agitação em banho de gelo foram adicionados, gota a gota, 9,0 ml de uma solução (B) de nitrito de sódio 0,2M. A solução final de ácido diazo-sulfanílico foi deixada em agitação, em banho de gelo por mais 15 minutos.

ETAPA 2 - Um volume de 100ml de uma solução de proteína (albumina ou globulina) 2% em NaOH 0,1N foi preparada e aquecida a 60°C por 15 minutos tendo sido o pH previamente ajustado a 10.

ETAPA 3 - A solução de ácido diazo-sulfanílico foi adicionada gota a gota à solução de proteína 2%. A reação se processou em banho de gelo e o pH foi mantido em torno de 10 pela adição de NaOH 1,0 N. Após a adição total do ácido, a mistura foi mantida sob agitação por mais 15 minutos, quando então a reação foi parada pela adição de HCl 1,0 N até atingir pH 7,0.

ETAPA 4 - A solução foi dialisada exaustivamente contra NaCl 0,2 M por 48 horas.



ETAPA 5 - A solução dialisada foi adicionado TCA 10% (p/v) sob agitação de modo que a suspensão ficou com uma concentração final de TCA de 5% (p/v).

ETAPA 6 - A suspensão foi deixada em repouso por 15 minutos, filtrada sob vácuo e o produto foi lavado com 100ml de TCA 5% (p/v).

ETAPA 7 - O precipitado da etapa anterior foi res-suspenso em água destilada, dialisado contra água por cerca de 18 horas e liofilizado. O material liofilizado (AZOALBUMINA e AZOGLOBULINA) foi então usado como substrato.

#### 3.1.4 - Preparação das Soluções usadas como Substrato

As soluções de azoalbuminas e azoglobulinas foram preparadas nas diferentes concentrações, em tampão fosfato pH 6,0 aquecido a 50°C. Antes de levar as soluções aos seus volumes finais o pH das mesmas foi ajustado a 6,0 e 6,9 para azoalbuminas e azoglobulinas, respectivamente. As soluções podem ser conservadas no congelador (-15°C) no máximo por 24 horas, mas geralmente eram mantidas por cerca de 2 horas em banho-maria, a temperatura do ensaio, antes do início da experiência.

#### 3.2 - Condições de Germinação

As sementes foram esterilizadas por imersão, durante 5 minutos, em solução comercial de hipoclorito de sódio contendo 5,2% de cloro ativo. Em seguida, as sementes foram lavadas com excesso de água corrente e água destilada e semeadas em vermiculite.

A semeadura em vermiculite foi feita em recipientes de plástico (30 x 26 x 10 cm) colocando-se as sementes na superfície da mistura de vermiculite e água na proporção de 3:1 (v/v). A germinação foi feita a temperatura de 26°C, na obscuridade, e os cotilédones foram colhidos em diferentes intervalos de tempo.

### 3.3 - Preparação dos Extratos de Cotilédones Quiescentes e Germinantes usados como Fonte de Enzima

Os extratos de cotilédones de sementes não germinadas foram preparados da mesma maneira já descrita na secção 3.1.2, e o sobrenadante não dialisado foi usado para determinações da atividade enzimática.

Os extratos de sementes germinantes foram preparados com cotilédones obtidos em diferentes dias de germinação, triturados em almofariz, a temperatura de 4°C, usando-se como meio de extração tampão fosfato pH 7,6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e a mesma proporção tecido: meio de extração (1:5) empregada nos extratos de cotilédones de sementes não germinadas.

A filtração foi feita através de tecido fino, logo após a trituração, e o homogenado foi centrifugado a 7500 x g, por 20 minutos, a 4°C. O resíduo da centrifugação foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado nas determinações de atividade enzimática.

### 3.4 - Determinação de Proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método do microbiureto (GOA, 1953) usando-se albumina sérica bovina como padrão. A determinação da concentração de



proteína nos efluentes das colunas cromatográficas foi feita pela medida de absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU.

### 3.5 - Determinação das Atividades Azoalbuminásica e Azoglobulinásica

As condições de ensaio de atividade azoalbuminásica e azoglobulinásica foram estabelecidas no extrato de cotilédones de sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.

#### 3.5.1 - Concentrações dos Substratos e dos Extratos

Os ensaios de atividade foram feitos incubando-se, por 30 minutos a 50°C, 2,0 ml de substrato (azoalbumina ou azoglobulina) e 1,0 ml de extrato de cotilédones. A reação foi parada com 1,0 ml de TCA 10% (p/v). Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel de filtro qualitativo e 1 ml do filtrado foi alcalinizado com 1 ml de NaOH 2N. A atividade enzimática foi medida pela absorvância em 440 nm dos peptídios diazotizados, em espectrofotômetro SPEKÓL.

Na determinação das concentrações ótimas de substrato, o meio de reação encerrava 1,0 ml de extrato de cotilédones, 0,5 a 2,0 ml de substrato a 3% e 1,5 a 0,5 ml do tampão fosfato pH 6,0 (azoalbuminas) ou pH 6,9 (azoglobulinas).

A concentração ótima de extrato foi determinada usando-se 2,0 ml de substrato a 2%, 0,2 a 1,0 ml de extrato e 0,8 a 0,2 ml do tampão de extração.

A fim de corrigir a atividade autodigestiva do extrato, foram normalmente usados controles onde o extrato e o substrato foram incubados separadamente e o substrato adicionado ao extrato após adição de TCA 10% (p/v).

### 3.5.2 - Efeito do pH

O efeito do pH sobre as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica foi estudado usando-se os substratos a 2% preparados com tampão Universal (LONG, 1961) nos intervalos de pH que variaram de 4,0 a 9,0. Os ensaios foram feitos incubando-se 2,0 ml do substrato 2% com 1,0 ml de extrato, por 30 minutos a 50°C, sendo a reação parada com 1,0 ml TCA 10% (p/v). Após 30 minutos de repouso, as suspensões foram filtradas em papel qualitativo, sendo retirado 1,0 ml do filtrado e alcalinizado com 1,0 ml de NaOH 2N. A avaliação da atividade foi feita pela absorbância em 440 nm dos produtos corados formados. Foram feitas provas em branco, sendo que, nestes casos, a adição de TCA precedeu à dos substratos.

### 3.5.3 - Efeito da Temperatura e do Tempo de Reação

A temperatura e o tempo de reação foram estabelecidos, fazendo-se ensaios de atividade enzimática nas temperaturas de 40, 50 e 60°C e nos intervalos de tempo de 15, 30, 45 e 60 minutos. Os ensaios foram feitos incubando-se 2,0 ml de substrato a 2% (pH 6,0 para azoalbumina e 6,9 para azoglobulina) com 1,0 ml de extrato. Foram mantidas as demais condições descritas na secção 3.5.2.

### 3.6 - Unidade de Atividade



Para os cálculos de atividade azoalbuminásica e azoglobulinásica definiu-se arbitrariamente uma unidade de atividade (UA) como a quantidade de enzima que produz uma absorvância de 0,001 a 440 nm por ml do extrato por 30 minutos.

### 3.7 - Fracionamento das Proteínas por Diálise e Precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato de cotilédones de sementes com 3 dias de germinação foi submetido a diálise contra água a 4°C e após mudanças sucessivas o conteúdo do saco de diálise foi submetido a centrifugação. As albuminas (material solúvel) e globulinas (material insolúvel) assim obtidas foram usadas para a determinação de proteína e das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica.

As frações 0/25, 25/50 e 50/75 de extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias foram obtidas por fracionamento com sulfato de amônio nos intervalos de 0 a 25, 25 a 50 e 50 a 75% de saturação a temperatura ambiente (27°C). O extrato foi deixado em contacto com o sal por cerca de 4 horas. O precipitado formado foi removido por centrifugação (7.500 x g, 20 min. 4°C), redissolvido no tampão de extração, dialisado contra água a 4°C seguido de diálise contra o tampão de extração. As frações resultantes foram utilizadas para determinação de proteína e das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica.

### 3.8 - Fração 0/75 do Extrato de Cotilédones de Sementes Germinadas por 3 dias.

Para preparação da fração 0/75, o extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias foi precipitado com

sulfato de amônio de 0 a 75% de saturação. O extrato preparado conforme descrito na secção 3.3., foi deixado em contacto com o sal por cerca de 4 horas. O precipitado obtido foi removido por centrifugação (7.500 x g, 20 min, 4°C), redissolvido no tampão de extração e dialisado contra água. Quando o conteúdo do saco de diálise apresentava algum precipitado, êste era removido por centrifugação, antes da liofilização.

### 3.8.1 - Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica presentes na fração 0/75 foi determinada usando-se a fração liofilizada dissolvida em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6. Aliquotas de 10 ml encerrando 10 mg de proteína por ml foram aquecidas em banho-maria a 30, 40, 50 e 60°C até 40 minutos. Em intervalos de 10 minutos foram retiradas aliquotas de 1,0 ml e feitos os ensaios de atividade nas condições padrão anteriormente descritas (2,0 ml de substrato 2% em pH 6,0 para azoalbumina e 6,9 para azoglobulina, 1,0 ml da fração, incubados por 30 minutos a 50°C).

### 3.8.2 - Fracionamento por Filtração em gel de Sephadex G-100

As cromatografias em Sephadex G-100 foram feitas em uma coluna medindo 2,5 x 40 cm. O gel foi deixado em água por 72 horas com agitação ocasional e usado, depois de desprezadas as partículas finas, para preparação da coluna (K 25/45 Pharmacia). A coluna foi em seguida equilibrada com tampão fosfato 0,02M, pH 7,6 a temperatura ambiente (27°C). Uma amostra de 20 mg de Blue Dextran foi dissolvida no mesmo tampão (3 ml) contendo sacarose 10% e aplicada na coluna pa



ra determinar o seu volume de exclusão ( $V_o$ ).

A fração 0/75 (cerca de 50 mg de proteína) dissolvida em 2,5 ml do tampão de equilíbrio, encerrando 10% de sacarose, foi aplicada na coluna e os efluentes recolhidos em frações de 3,0 ml, mantendo-se um fluxo de 30 ml por hora. As frações coletadas foram usadas nas determinações de proteína, pela absorvância em 280 nm, e reunidas em quatro grupos para as determinações das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica utilizando-se as condições padrão de ensaio já estabelecidas.

A fórmula de DETERMAN & MICHEL (1966) foi usada para os cálculos dos pesos moleculares:

$$\log M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o)$$

$V_e$  = volume de eluição;

$V_o$  = volume de exclusão.

### 3.9 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram feitas inicialmente segundo o método de CLARKE (1964). Foram usados tubos de vidro de 7 x 35 mm, uma amperagem de 2,0 mA/tubo, mantendo-se a voltagem constante. As amostras, encerrando sacarose numa concentração final de 10%, foram aplicadas e submetidas a eletroforese em tampão TRIS - glicina-HCl pH 8,3.

Para detecção das proteínas foi usado o método descrito por STECK et al. (1980). As proteínas são fixadas e coradas, ao mesmo tempo, pela imersão do gel em uma solução contendo 180 ml de etanol, 420 ml de água destilada, 100 ml de formaldeído 35% e 0,8g de Comassie Brilliant Blue R-250,

por uma hora. Decorrido esse tempo, o gel é imerso em uma solução descorante contendo 250 ml de etanol, 750 ml de água destilada e 10 ml de formaldeído 35%. Após sucessivas trocas da solução descorante o gel é deixado descorando por cerca de 15 horas.

As eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS 1%, em presença e ausência de beta-mercaptoetanol, foram feitas segundo a técnica de WEBER & OSBORN (1969). A eletroforese foi desenvolvida com corrente constante e igual a 7 mA por coluna de gel, por cerca de 4 horas. As proteínas foram detectadas como descrito no parágrafo anterior e os pesos moleculares determinados conforme XAVIER FILHO & MOREIRA (1978).

### 3.10 - Determinação das Atividades BAPA-ásica e LPA-ásica

A determinação das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica foi feita conforme descrito por AINOUZ et al. (1981).

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos de cotilédones de sementes quiescentes e germinantes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. se ridó apresentam a propriedade de hidrolisar os seguintes substratos: hemoglobina (pH 3,5), caseína (pH 6,0),  $\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (pH 7,6) e L-Leucina-p-nitroanilida (pH 7,0) (AINOUZ et al., 1981). As atividades detectadas, embora indiquem a presença de enzimas capazes de agir sobre os substratos referidos, não nos permite excluir a possibilidade de que na planta tais enzimas não utilizem as proteínas de reserva como substrato. Isto é, as proteínas de reserva não são necessariamente substratos para as enzimas capazes de hidrolisar proteínas estranhas a planta. A fim de verificar se cotilédones de sementes quiescentes de Vigna unguiculata encerram enzimas capazes de hidrolisar as proteínas de reserva de mesma origem vegetal, optamos pelo emprego de substratos endógenos. Assim sendo, foram utilizados como substratos proteínas (albuminas e globulinas), modificadas por diazotização, obtidas de sementes quiescentes e como fonte de enzima extratos de sementes quiescentes e germinantes.

##### 4.1 - Condições de Ensaio

As condições ótimas de ensaio, para as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, foram estabelecidas usando-se como fonte de enzima extratos de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias. A escolha do tempo de germinação deve-se ao fato de que, em ensaios preliminares, as atividades, embora presentes nos cotilédones em estado quiescente,



se mostraram em quantidades mensuráveis inferiores àquelas do terceiro dia.

Na determinação da concentração ótima de substrato foram usados volumes crescentes (0,5 ml a 2,0 ml) de soluções de azoalbumina ou azoglobulina a 3% e volume fixo (1,0 ml) de extrato encerrando cerca de 15,0 mg de proteína por ml. Verificou-se que a concentração final de 1,5% no volume de reação (3,0 ml) para ambos os substratos (FIGURA 1) é suficiente para saturar a enzima.

Quando a concentração final dos substratos foi mantida em 1,3% e se fez variar o volume de extrato (0,2 ml a 1,0 ml), observou-se que as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica aumentaram linearmente em função de quantidades crescentes de enzima (FIGURA 2).

O efeito do pH nos ensaios foi determinado no intervalo de 4,0 a 9,0 mantendo-se a concentração de 1,3% para ambos os substratos e usando-se 1,0 ml do extrato. Os dados obtidos (FIGURA 3) mostram uma atividade máxima para azoalbumina em torno de pH 6,0 e para azoglobulina em torno de pH 7,0.

Foram feitas determinações variando-se o tempo de ensaio e verificou-se que após 30 minutos de ensaio as atividades começam a decrescer (FIGURA 4).

Na determinação de temperatura ótima a ser usada nos ensaios verificou-se que a 50°C os valores eram maiores do que aqueles obtidos a 40 e 60°C (FIGURA 5).

Tendo em vista os resultados obtidos, foram escolhidas as seguintes condições padrão de ensaio: 1,0 ml de extrato preparado com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) na proporção 1:5 (cotilêtone: meio de extração); 2,0 ml de substrato na concentração de 2% (p/v) preparados em tampão fosfato pH 6,0 e 6,9 para azoalbumina e azoglobulina, respec

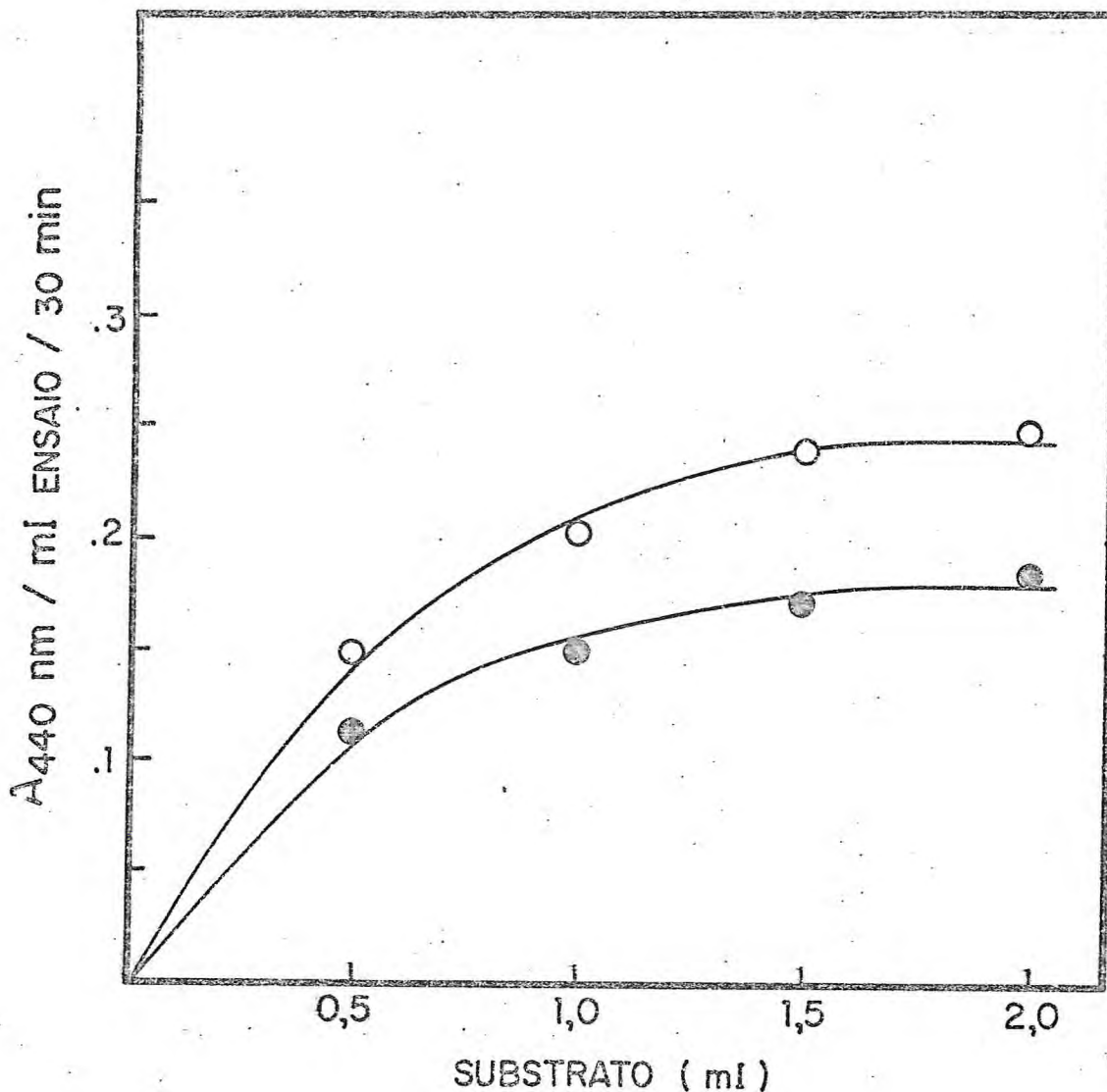


FIGURA 1 - Efeito da concentração do substrato sobre as atividades azoA (o—o) e azoG (●—●) em cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô germinadas por 3 dias.

Condições de ensaio: tempo de reação, 30 minutos; temperatura, 50°C; pH 6,0 para azoalbumina e 6,9 para azoglobulina; 1,0 ml de extrato e concentrações crescentes de substrato para um volume total de reação de 3,0 ml; 1,0 ml de TCA 10% (p/v) totalizando um volume de ensaio de 4,0 ml.

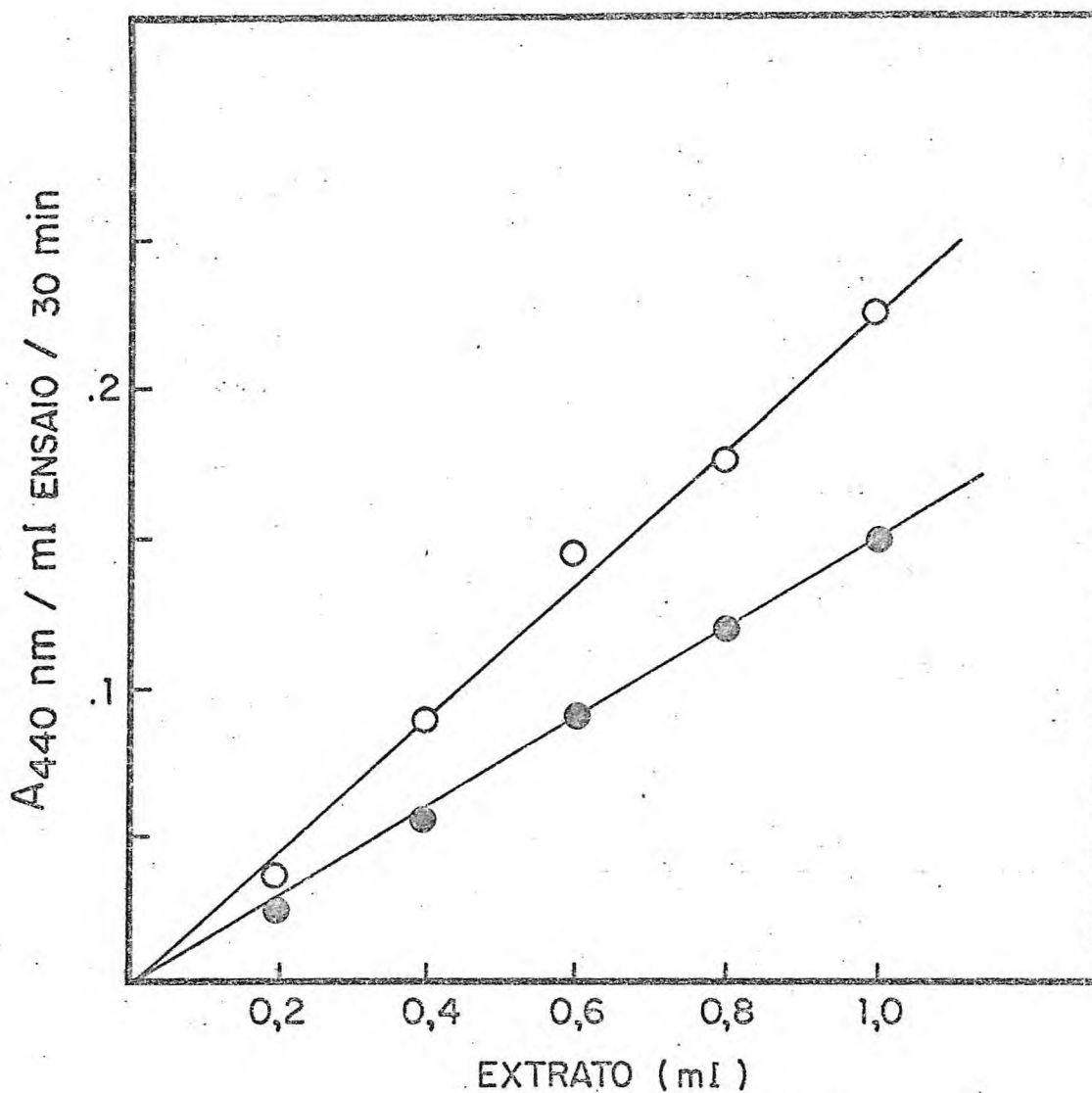


FIGURA 2 - Efeito da concentração da enzima sobre as atividades azoA (○—○) e azoG (●—●) de cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.

Condições de ensaio: tempo de reação, 30 minutos; temperatura, 50°C; 2,0 ml de substrato a 2%; pH 6,0 para azoalbumina e 6,9 para azoglobulina; concentrações crescentes de extrato para um volume de 1,0 ml; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 1.



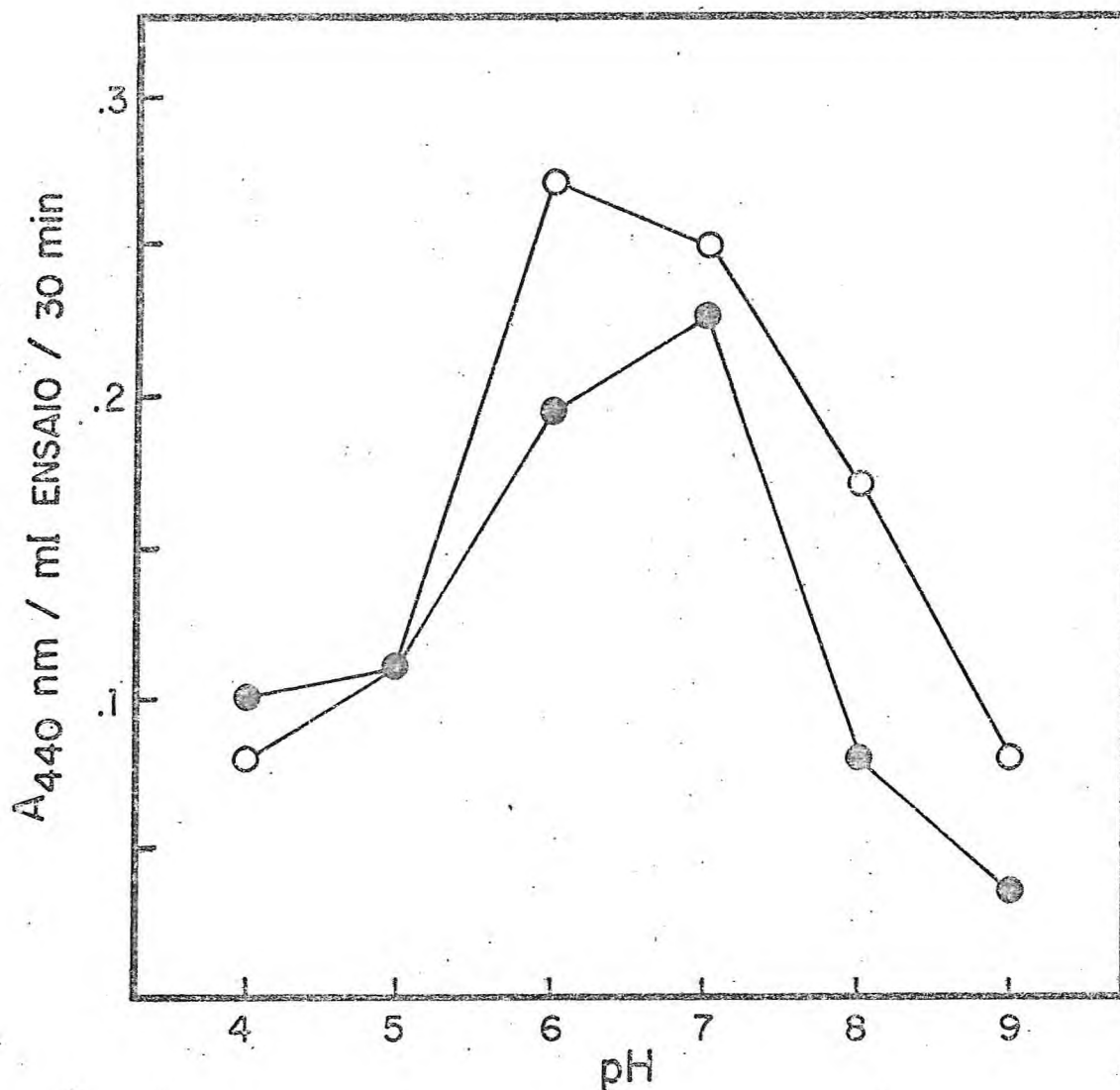


FIGURA 3 - Efeito do pH sobre as atividades azoA (o—o) e azoG (●—●) de cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.

Condições de ensaio: tempo de reação, 30 minutos; temperatura 50°C; 1,0 ml do extrato; 2,0 ml de substrato a 2%; pH variando nos valores indicados; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 1.

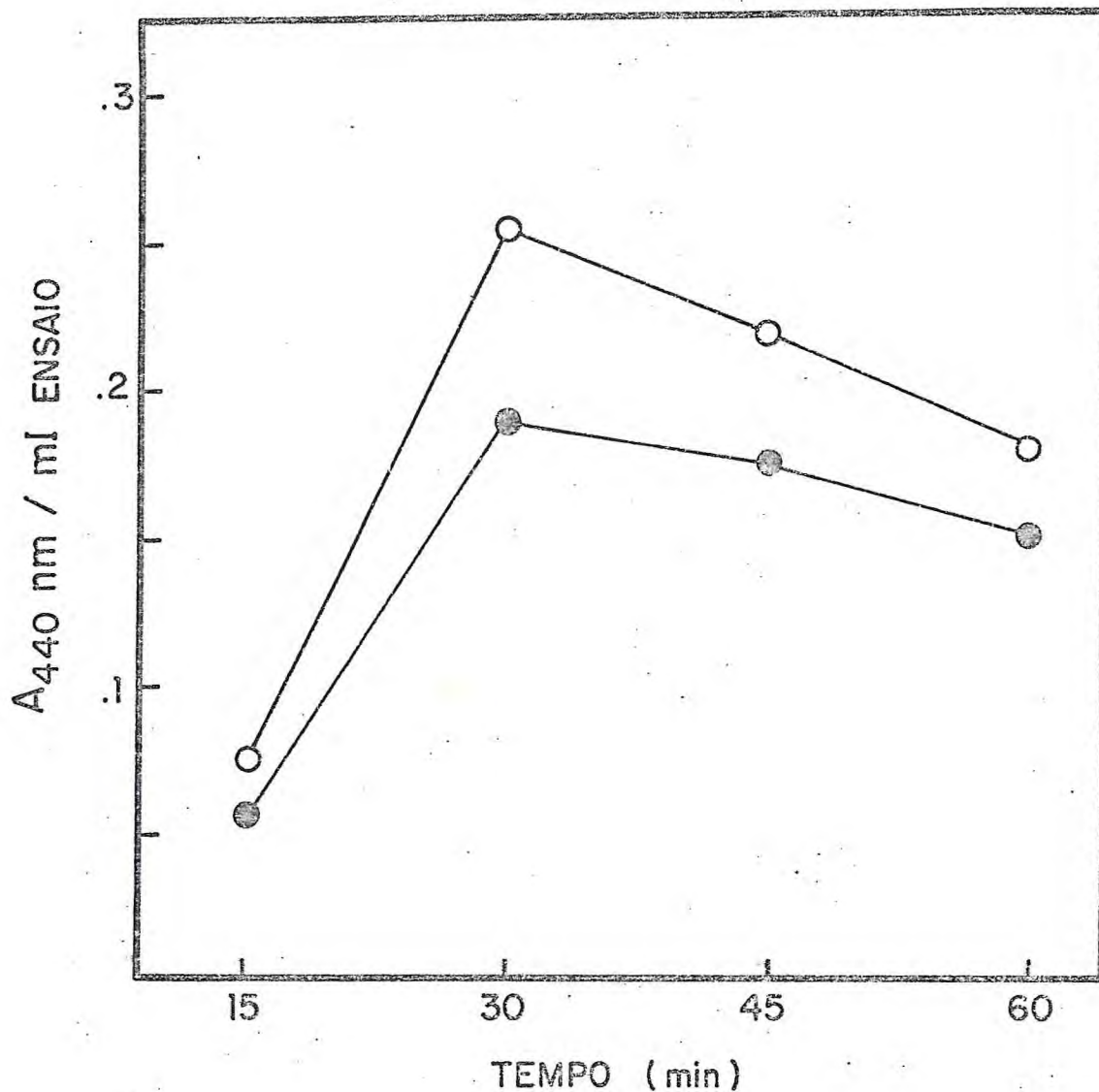


FIGURA 4 - Efeito do tempo de reação sobre as atividades azoA (o—o) e azoG (●—●) em cotilédones de sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.

Condições de ensaio: temperatura 50°C; 1,0 ml do extrato; 2,0 ml do substrato a 2%; pH 6,0 para azoalbumina e pH 6,9 para azoglobulina; tempo variando conforme indicado; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 1.

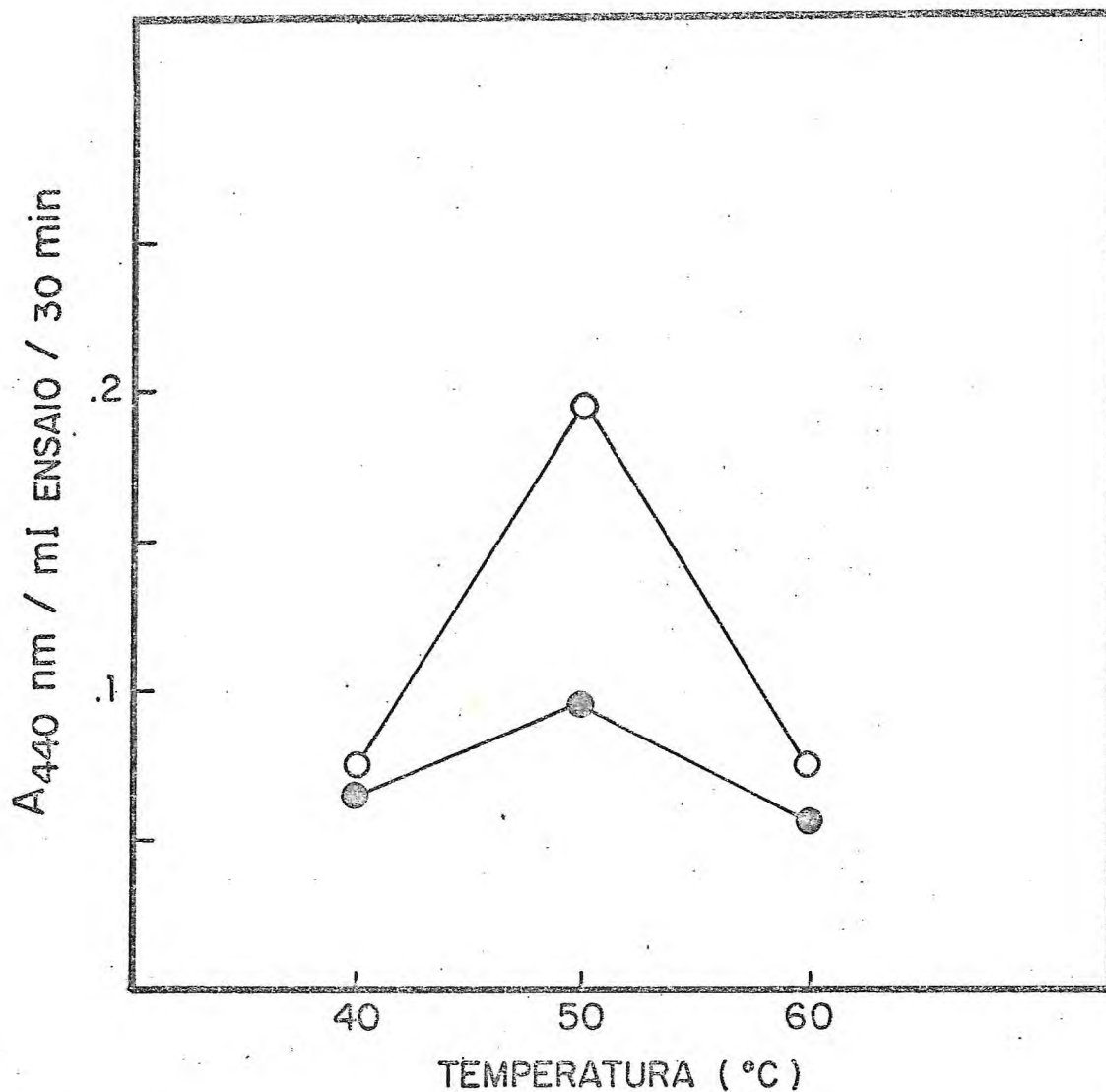


FIGURA 5 - Efeito da temperatura de reação sobre as atividades de azoA (o—o) e azoG (●—●) em cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridó germinadas por 3 dias.

Condições de ensaio: tempo, 30 minutos; 1,0 ml de extrato; 2,0 ml do substrato a 2%; pH 6,0 para azoalbumina e pH 6,9 para azoglobulina; temperatura variando conforme indicado; mantendo-se as demais condições descritas na FIGURA 1.



tivamente; tempo, 30 minutos; temperatura 50°C. Reação para da com 1,0 ml de TCA 10% (p/v), perfazendo um volume total de ensaio de 4,0 ml.

Os valores de pH escolhidos estão próximos aqueles usados por outros autores. HOBDAV et al. (1973) fizeram determinações da atividade azoglobulinásica em Pisum sativum em pH 7,0. REILLY et al. (1978) usando globulina de semente de Cucurbita moschata como substrato, empregaram também pH 7,0 na determinação de atividade. MINAMIKAWA (1979) empregou pH 6,0 na determinação da atividade proteolítica usando globulinas da semente de Phaseolus mungo como substrato.

#### 4.2 - Atividades Azoalbuminásica e Azoglobulinásica durante a Germinação

Uma vez estabelecidas as condições de ensaio para determinação das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, foram feitas determinações de peso fresco, peso seco e teor de proteína extraída de cotilédones nos vários dias de germinação. Embora a germinação possa ser considerada como envolvendo os processos que têm início com a absorção de água e que sucessivamente terminam com a emergência da radícula ou hipocótilo (BEWLEY & BLACK, 1978), no presente trabalho, o termo germinação é empregado indistintamente e contado a partir da sementeira até a queda dos cotilédones (7 dias). Assim sendo, a retirada dos cotilédones foi feita levando-se em consideração as duas variáveis tempo e tamanho do hipocótilo, quando empregadas as condições de germinação descritas na secção 3.2. Foram estabelecidos tamanhos padrões de hipocótilos, tomando-se amostras representativas de populações de plântulas durante a germinação. As medidas dos hipocótilos de cada amostra foram agrupadas em uma distribuição de frequência (TABELA 1).

TABELA 1 - Padronização dos hipocótilos usados para a retirada dos cotilédones.

Tempo de Germinação (dias)	Tamanho dos hipocótilos (cm)
1	radículas emergidas
2	1,5 a 2,0
3	5,5 a 6,0
4	9,0 a 11,0
5	13,0 a 15,0
6	16,0 a 18,0
7	queda dos cotilédones

A observação do aumento de peso fresco no primeiro dia de germinação, tem sido aceita como sendo decorrente da absorção de água pelas sementes o que é seguido de um acentuado decréscimo a partir do terceiro dia (FIGURA 6). Esse decréscimo tem sido explicado como resultante da mobilização do material de reserva da semente para outras partes da plântula em desenvolvimento.

Os valores de peso seco decresceram a partir do segundo dia de germinação, atingindo no sétimo dia um peso correspondente a 7,5% daquele apresentado pela semente quiescente, uma vez que as reservas cotiledonárias encontram-se praticamente exauridas (FIGURA 6).

O decréscimo contínuo na quantidade de proteína extraída dos cotilédones durante a germinação (FIGURA 6) está de conformidade com estudos realizados com outras sementes de leguminosas. Esse decréscimo tem sido sugerido como devido a hidrólise das proteínas de reserva em componentes de menores pesos moleculares, pela ação de enzimas proteolíticas, que possivelmente são translocados dos órgãos de reserva para as zonas de crescimento.

Os dados obtidos com relação ao peso fresco, peso seco e proteína extraída embora não acrescentem nada de novo à literatura, constituem determinações prévias fundamentais no estudo da variação das atividades enzimáticas durante a germinação.

As atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica estão tão presentes tanto em cotilédones de sementes germinantes como em cotilédones de sementes quiescentes (FIGURA 7), sendo que nos últimos as atividades mensuráveis apresentam valores muito baixos. Na determinação da atividade total, expressa em unidades de atividade por cotilédone, verifica-se que ambas as atividades sofrem considerável aumento nos primeiros dias de germinação, alcançando atividade máxima no



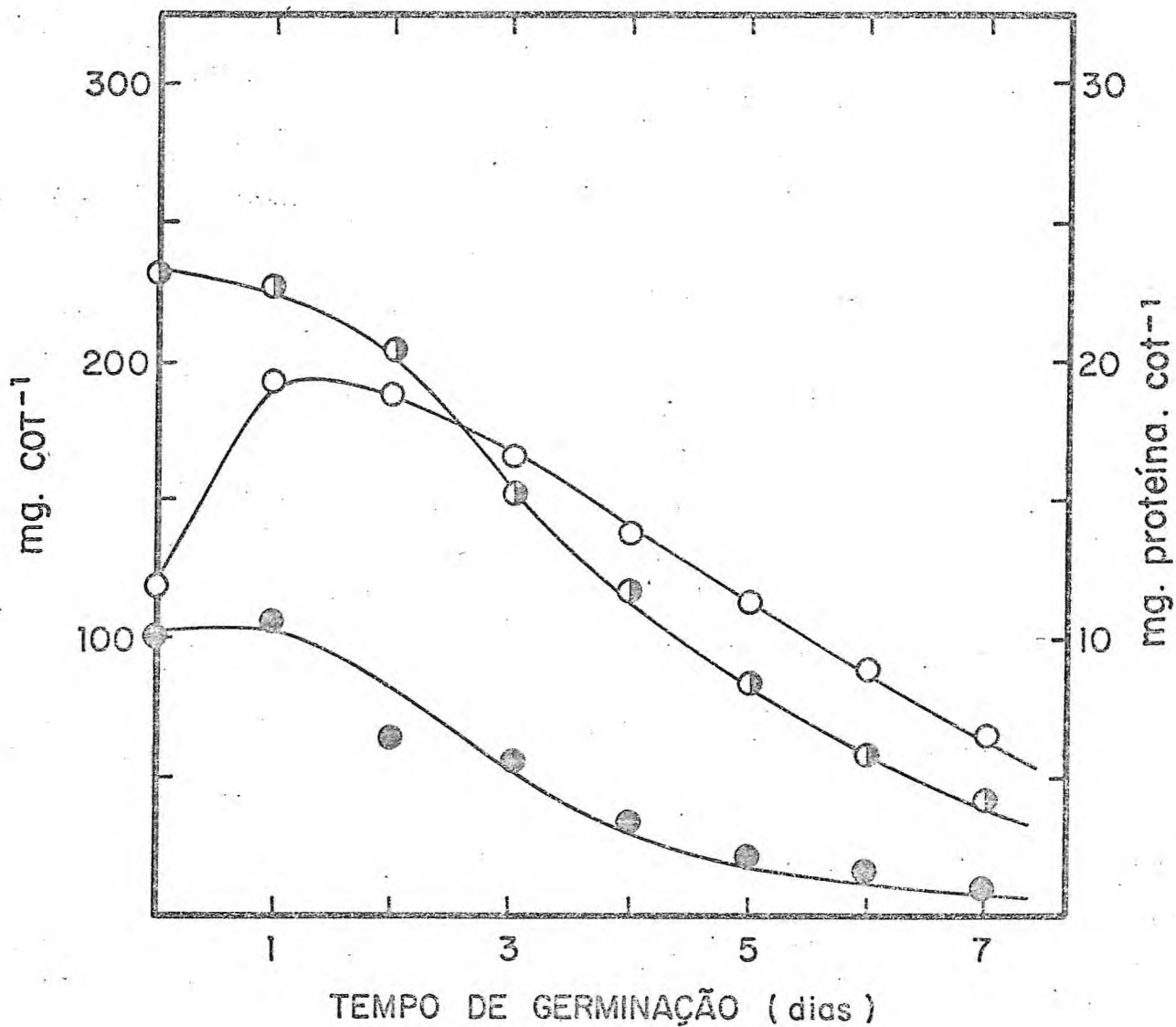


FIGURA 6 - Peso fresco (o—o), peso seco (●—●) e teor de proteína extraída (◐—◐) de cotilédones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô durante a germinação.

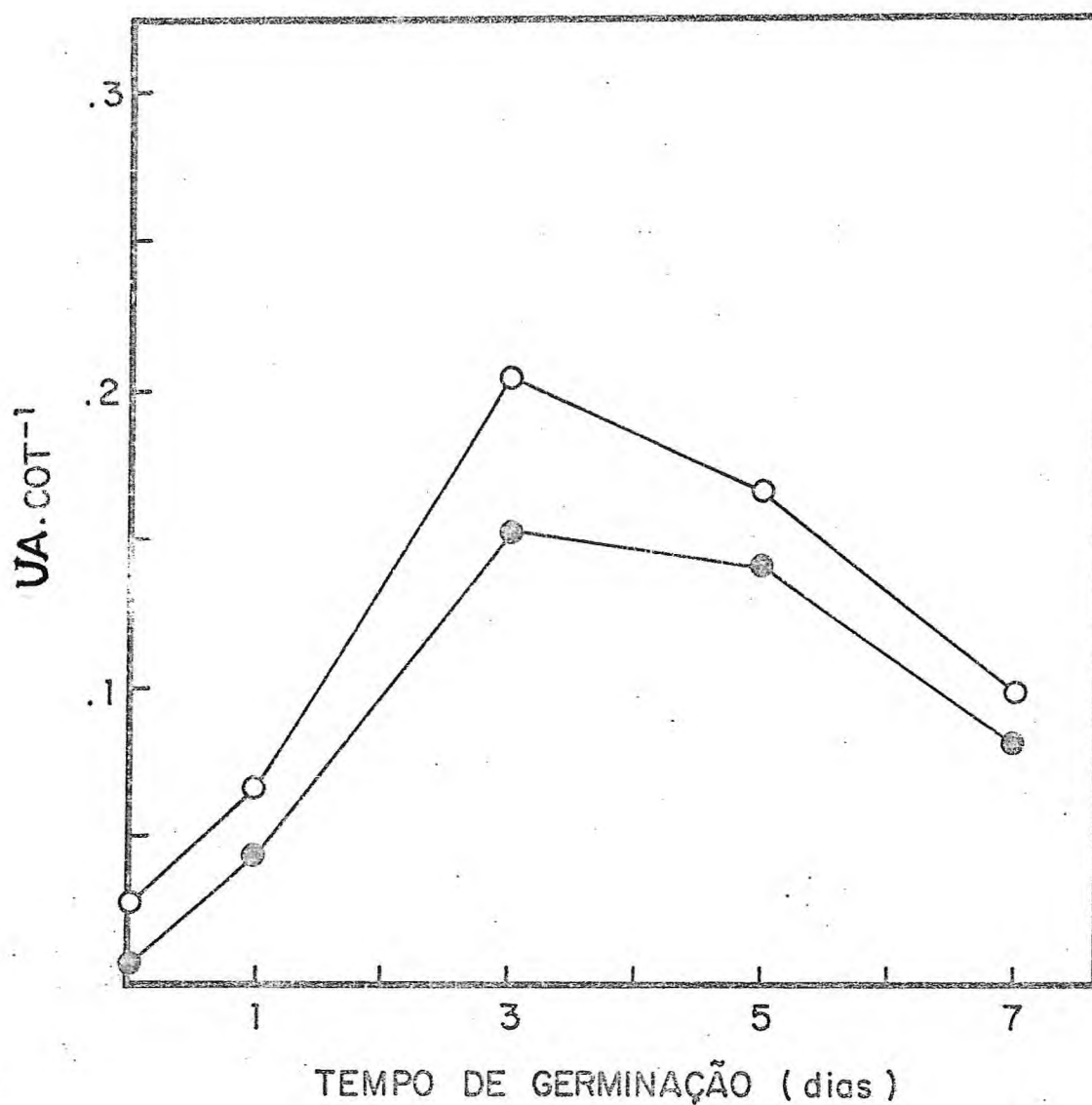


FIGURA 7 - Atividades azoA (o—o) e azoG (●—●) de cotilêdo nes de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) - Walp. cv. seridô durante a germinação. Foram usadas as condições padrão de ensaio.

terceiro dia. Um decréscimo de atividade foi observado nos dias subsequentes, sendo que as atividades presentes no sétimo dia, avaliadas em torno de 50% do máximo de atividade alcançada, mostrou-se ainda superior a atividade presente nos extratos de sementes quiescentes. Quando as atividades são expressas em unidade de atividade por mg de proteína (FIGURA 8) verifica-se que as atividades específicas aumentam durante a germinação. Observa-se também que a degradação das albuminas ocorre paralelamente a das globulinas, indicando que as albuminas também servem de substrato. Os dados reforçam a hipótese de MURRAY (1979) de que a fração albumínica encerra proteínas de reserva, função que tem sido considerada exclusiva das globulinas.

Os resultados indicam que as proteases presentes em cotilédones não germinantes de Vigna unguiculata in vitro não têm praticamente atividade sobre as proteínas de reserva da própria semente no estado quiescente, reforçando a idéia de que a susceptibilidade das proteínas de reserva à hidrólise pelas proteases presentes em sementes quiescentes, deve-se a um processo de síntese ou ativação de modificadores das proteínas de reserva durante a germinação. Esse processo de modificação, que deve preceder a hidrólise das proteínas, não pode evidentemente ser considerado como o único mecanismo possível de hidrólise (KOROLYOVA et al., 1975).

Outras sugestões têm sido consideradas tais como, a síntese de novo de enzimas ou ativação de zimógenos tornando assim possível a hidrólise de proteínas de reserva não modificadas (RYAN, 1981). A regulação da atividade das proteases por inibidores endógenos pode ser também um outro fator limitante da proteólise (ASHTON, 1976; RYAN, 1981).

Os dados relativos às atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica durante a germinação estão em concordância com aqueles encontrados por AINOUZ et al. (1981), quando foram usados como substrato caseína (pH 6,0) e hemoglobina



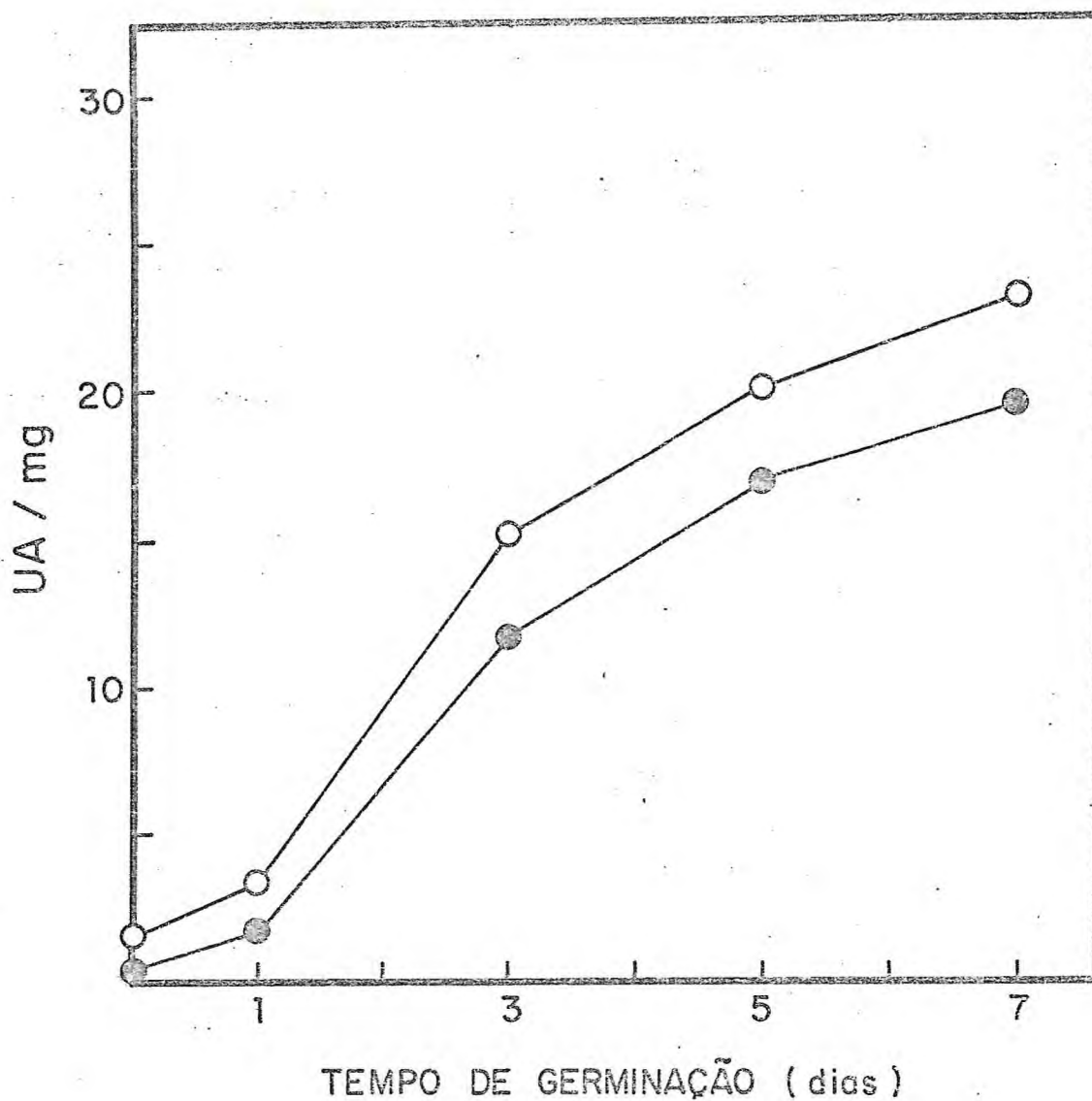


FIGURA 8 - Atividade específica em extratos de cotilêdones de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô durante a germinação, observada contra os substratos azoalbumina (o—o) e azoglobulina (●—●). Foram usadas as condições padrão de ensaio.

(pH 3,5).

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, para outras sementes, quando do uso de substratos em d $\acute{o}$ genos, entre os quais podemos destacar:

HOBDAY et al. (1973) estudando a atividade azoglobulinásica de Pisum sativum em pH 7,0 verificaram também um acréscimo de atividade atingindo um máximo no quinto dia de germinação seguido de um decréscimo até o nono dia. As observações de HOBDAY et al. (1973), não estão em concordância com aquelas, relativas a atividade proteolítica em Pisum sativum, obtidas anteriormente por YOUNG & VARNER (1959) que não verificaram um acréscimo seguido de um decréscimo, quando usaram caseína como substrato.

SHEPARD & MOORE (1978), também observaram um acréscimo de atividade até o quinto dia seguido de um decréscimo até o 12 $^{\circ}$  dia, durante a germinação de Lupinus angustifolius usando gliadina como substrato.

REILLY et al. (1978), usando globulina de Cucurbita moschata como substrato, verificaram que a atividade proteolítica atinge um máximo no oitavo dia de germinação e decresce até o 11 $^{\circ}$  dia, enquanto a atividade caseinolítica atinge um máximo no sexto dia e é praticamente nula no 11 $^{\circ}$  dia.

MINAMIKAWA (1979), também encontrou um acréscimo de atividade até o quarto dia de germinação, seguido de um decréscimo até o nono dia, quando usou como substratos caseína e globulinas de sementes de Phaseolus mungo com um dia de germinação.

#### 4.3 - Purificação da Fração com Atividades Azoalbuminásica e Azoglobulinásica

Os cotilédones obtidos de sementes germinadas por 3 dias, por apresentarem uma maior capacidade de hidrolisar as proteínas de reserva da semente quiescente, foram usados para estudo de purificação da fração responsável pelas atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica.

Inicialmente, o extrato preparado com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 foi submetido a diálise contra água. As frações albumínica (solúvel em água) e globulínica (insolúvel em água) representam, respectivamente, cerca de 16 e 51% da proteína total extraída (TABELA 2).

A fração globulínica encerra cerca de 9% da atividade de azoalbuminásica e 22% da atividade azoglobulinásica, inicialmente detectadas no extrato total.

A fração albumínica apresenta cerca de 42% da atividade azoalbuminásica e 28% da atividade azoglobulinásica com relação às atividades iniciais detectadas, mostrando encerrar maior percentagem de atividade enzimática do que a fração globulínica.

Verifica-se que houve uma recuperação de cerca de 50% de ambas as atividades, distribuídas nas frações albumínica e globulínica.

Quando comparamos as atividades verificamos que a atividade azoalbuminásica total está predominantemente na fração albumínica. A atividade azoglobulinásica total está distribuída quase que equitativamente nas duas frações, muito embora apresente maior atividade específica na fração albumínica.

Na TABELA 2 verificamos que a atividade azoglobulinásica total apresenta valores mais altos do que a atividade de azoalbuminásica, indicando que as globulinas parecem ser mais susceptíveis à hidrólise. Comparando-se com os dados até agora obtidos, podemos verificar que a atividade azoal-



TABELA 2 - Atividades azoA e azoG nas frações obtidas por diálise contra água.

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade azoA			Atividade azoG		
			UA *	UA/mg **	Purificação ( $\bar{x}$ )	UA *	UA/mg **	Purificação ( $\bar{x}$ )
Extrato	30	448,5	3.300	7,36	-	6.450	14,38	-
Albumina	20	71,8	1.400	19,50	2,65	1.800	25,07	1,74
Globulina	15	228,8	300	1,31	-	1.425	6,23	-

Os dados referem-se a 30ml do extrato total de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias preparado com tampão fosfato 0,02M, pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (cotilédones: meio de extração).

\* UA - Unidade de atividade total.

\*\* UA/mg - Atividade específica.

buminásica vinha apresentando valores mais altos. Embora os dados pareçam contraditórios, essas variações podem ser atribuídas ao emprego de diferentes preparações (albumina e globulina de sementes quiescentes) usadas para diazotização e não invalidam os resultados já apresentados.

Extratos de cotilédones de sementes germinadas por três dias preparados em tampão fosfato pH 7,6 foram também usados para fracionamento com sulfato de amônio nos intervalos de saturação de 0 a 25, 25 a 50 e 50 a 75% numa tentativa de purificação das frações protéicas com atividade azoalbuminásica e azoglobulinásica.

As atividades estão distribuídas em todas as frações obtidas (TABELA 3 e FIGURA 9). Houve uma baixa recuperação de proteína (25%) mas foram obtidas frações com atividades específicas mais altas e uma recuperação de ambas as atividades em torno de 50% com relação as atividades totais iniciais.

Tendo em vista os dados da TABELA 03 foi utilizado o esquema apresentado na FIGURA 10 para a preparação da fração que precipita com sulfato de amônio no intervalo de 0 a 75% de saturação (fração 0/75).

A fração 0/75, preparada a partir do extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias, encerrando 29,5% da proteína inicial presente no extrato e uma recuperação de 100% de ambas as atividades (TABELAS 4 e 5), foi usada para outra etapa de purificação. Foram também feitas determinações da termoestabilidade das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica presentes na fração 0/75.

#### 4.4 - Termoestabilidade da Fração 0/75

No estudo da estabilidade térmica, a fração liofiliz

TABELA 3 - Atividades azoA e azoG nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade azoA		Atividade azoG	
			UA *	UA/mg **	UA *	UA/mg **
Extrato	230	2.956,0	29.900	10,11	40.250	13,61
0/25	13	74,6	986	13,20	1.314	17,60
25/50	31	439,9	8.432	19,16	13.183	29,96
50/75	33	225,7	5.915	24,45	6.901	28,52

Os dados referem-se a 230ml do extrato total de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias preparado com tampão fosfato 0,02M pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (cotilédones: meio de extração).

\* UA - Unidade de atividade total.

\*\* UA/mg - Atividade específica.



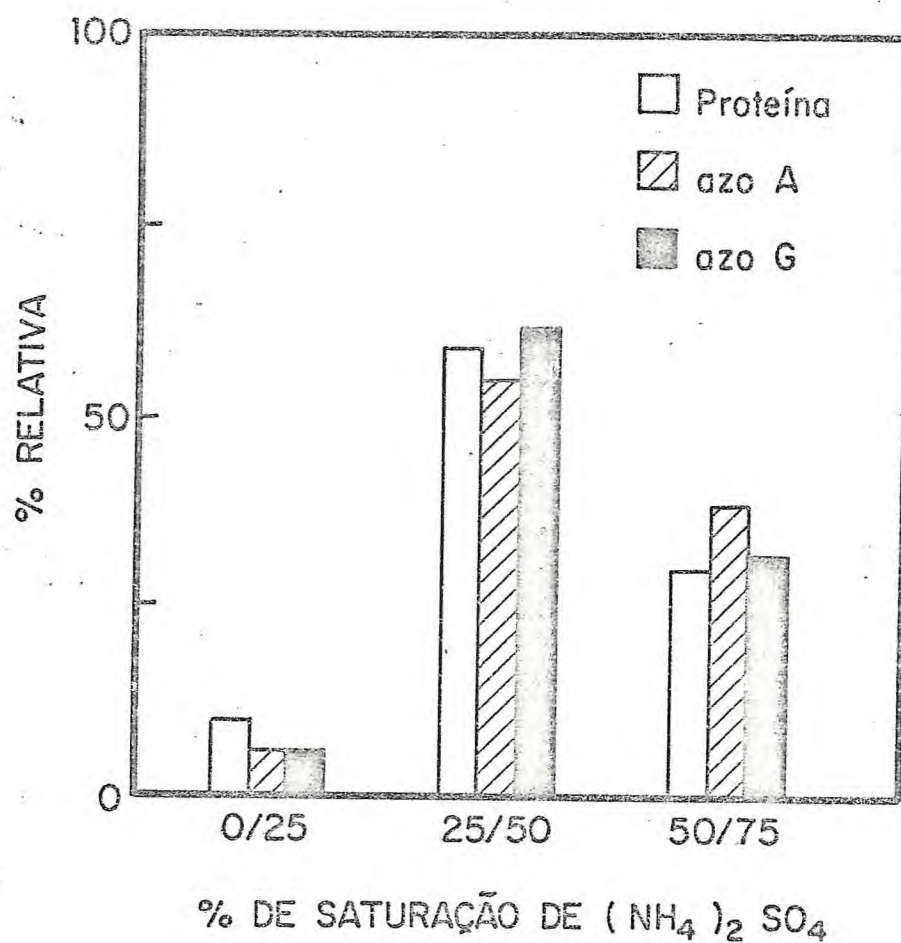


FIGURA 9 - Proteína e atividades azoA e azoG nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio, do extrato de cotilêdones de sementes germinadas por 3 dias. As percentagens foram expressas considerando-se 100% a proteína total precipitada e as atividades totais obtidas.

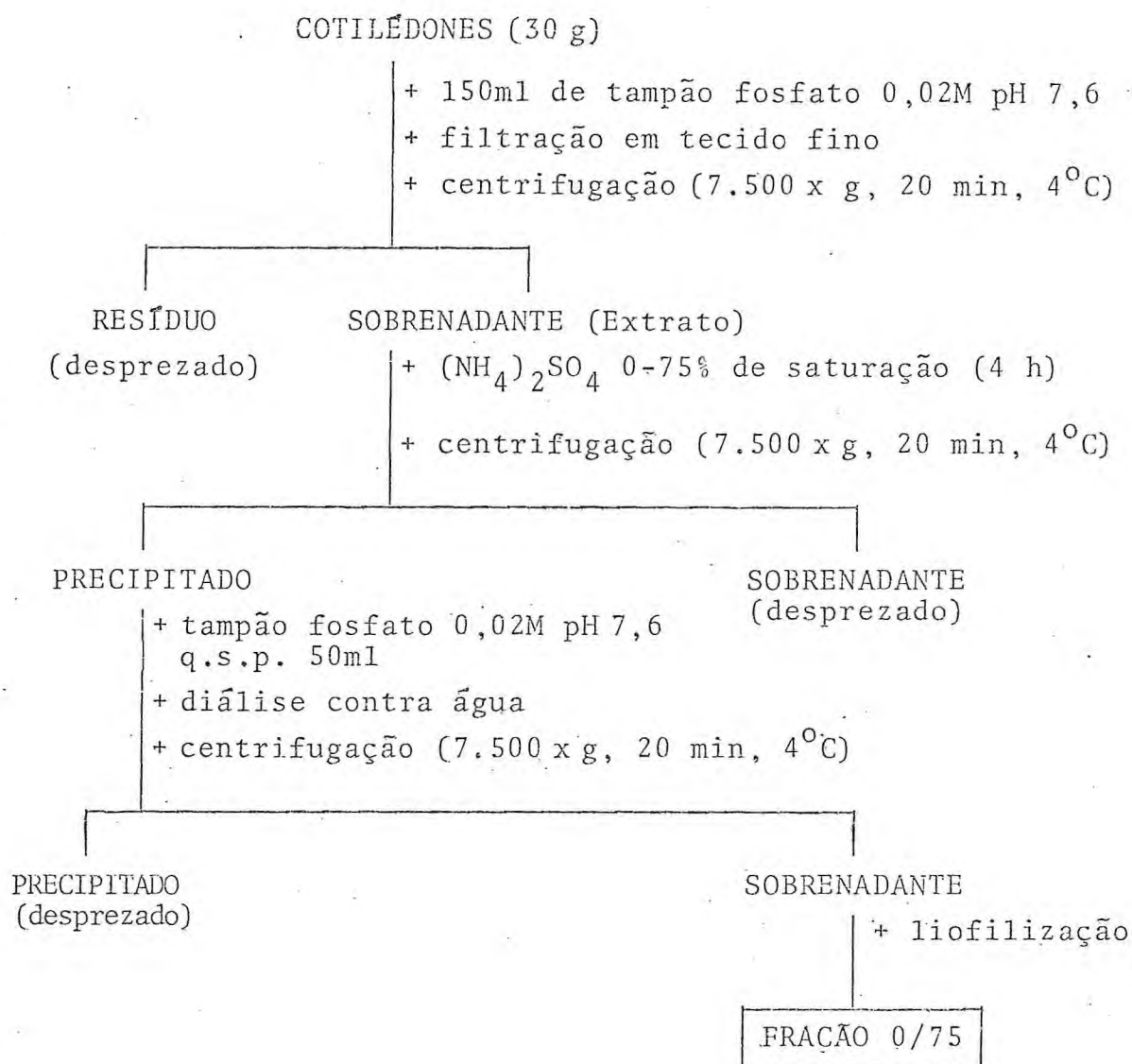


FIGURA 10 - Esquema de obtenção da fração 0/75 de extrato de cotilédones de sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridõ germinadas por 3 dias.

zada e dissolvida em tampão fosfato pH 7,6 foi submetida a aquecimento prévio por 10, 20, 30 e 40 minutos nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C. Após aquecimento, alíquotas da fração foram usadas nos ensaios de atividades enzimáticas nas condições padrão estabelecidas (FIGURAS 11 e 12).

A fração 0/75 quando incubada a 30°C, nos diferentes intervalos de tempo, e em seguida usada para a determinação das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, apresentou uma redução em torno de 7% para ambas as atividades enzimáticas em estudo. Quando a fração foi pré-incubada a 40°C por 10, 20, 30 e 40 minutos, observou-se que a atividade de azoalbuminásica decresceu em torno de 13% nos três primeiros intervalos de tempo, porém esse decréscimo foi um pouco maior (cerca de 26%) quando a fração foi submetida ao aquecimento prévio à mesma temperatura por 40 minutos. Alíquotas da fração 0/75 submetidas ao tratamento anterior foram também usadas na medida de atividade azoglobulinásica. Verificou-se que houve diminuição da atividade enzimática de 18% nas alíquotas submetidas aos diversos períodos de incubação.

Houve um decréscimo considerável de ambas as atividades testadas quando a fração 0/75 foi submetida ao aquecimento prévio a 50°C por 30 e 40 minutos. Porém, quando os tempos foram de 10 e 20 minutos o comportamento foi aproximadamente o mesmo quando do aquecimento a 40°C.

Apenas 27% das atividades proteolíticas foram mantidas quando a fração 0/75 foi aquecida a 60°C por 10, 20 e 30 minutos observando-se perda quase total das atividades, quando a fração foi pré-incubada a mesma temperatura por 40 minutos. Podemos concluir que as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica presentes na fração 0/75 apresentam estabilidade nas temperaturas de 30 e 40°C, enquanto há uma perda de 75% quando submetida por 10 minutos a temperatura de 60°C.



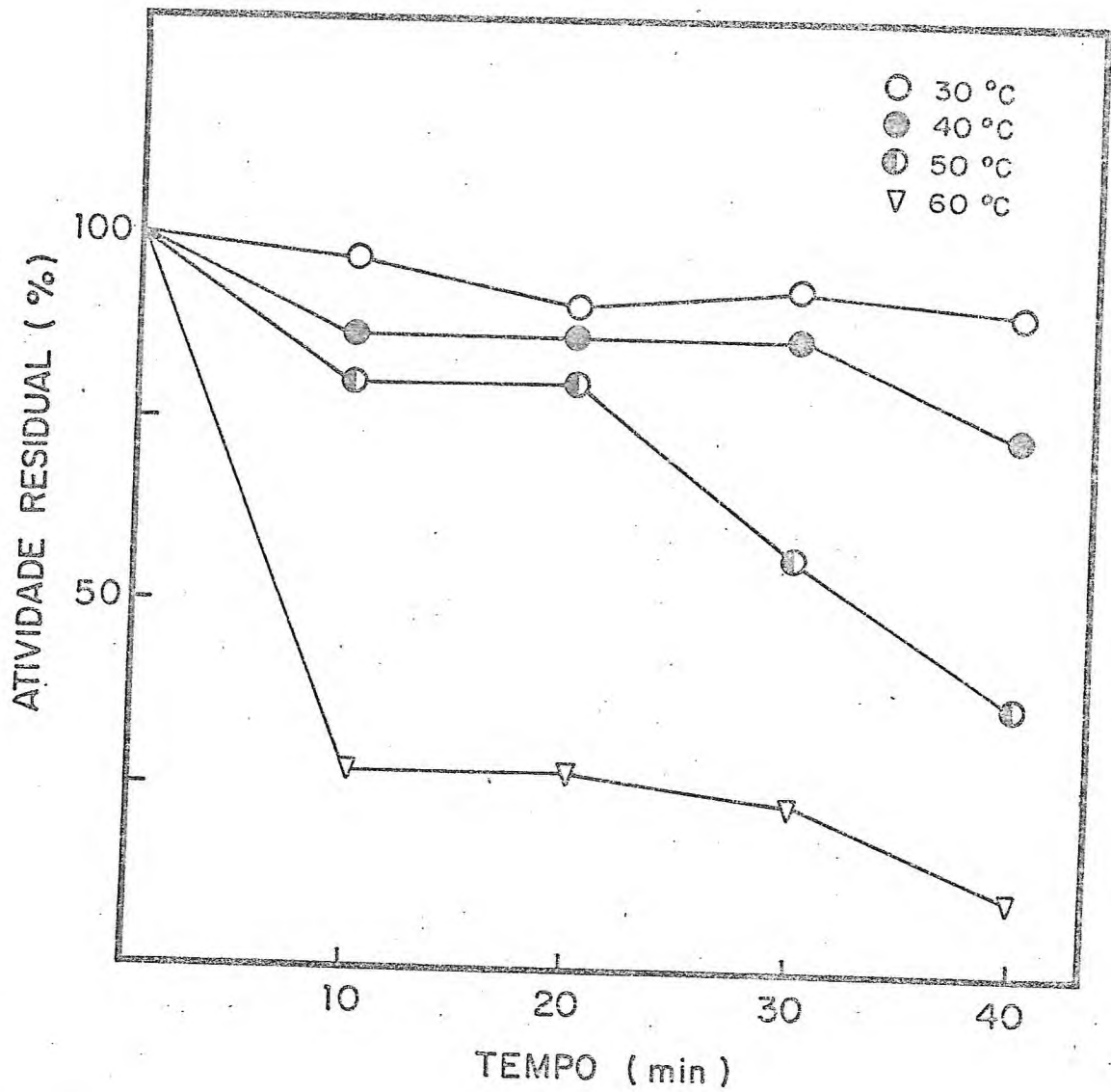


FIGURA 11 - Termoestabilidade da atividade azoA presente na fração 0/75 de cotilédones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô. Foram usadas as condições padrão de ensaio.

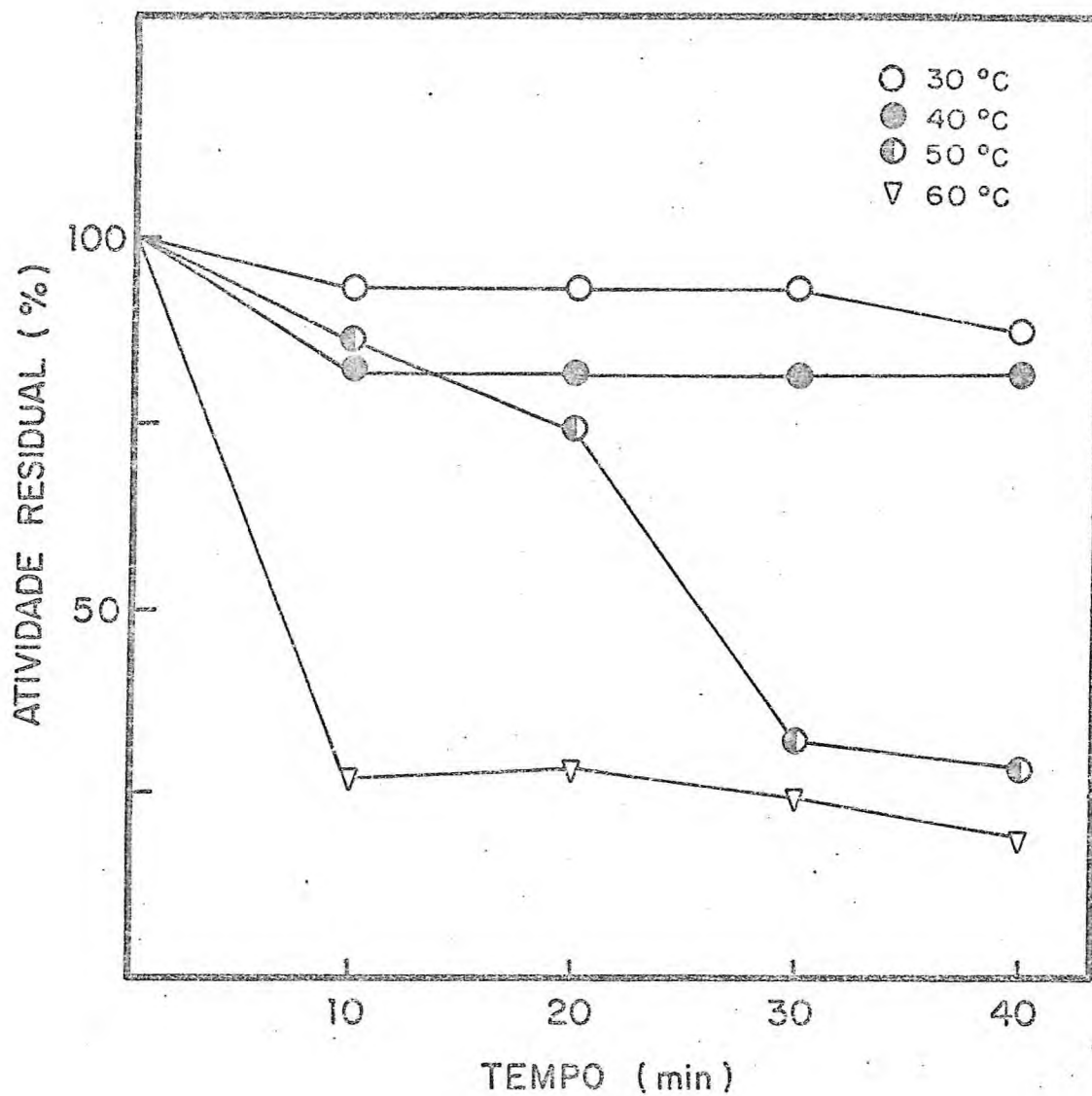


FIGURA 12 - Termoestabilidade da atividade azoG presente na fração 0/75 de cotilédones de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô. Foram usadas as condições padrão de ensaio.

#### 4.5 - Filtração da Fração 0/75 em Gel de Sephadex G-100

A fração 0/75 submetida a cromatografia em Sephadex G-100 (FIGURA 13), em tampão fosfato de sódio pH 7,6, apresentou quatro picos (I, II, III e IV) com pesos moleculares de 116.000, 66.000, 22.000 e 4.000 daltons. O pico III encerra a maior parte das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, apresenta uma recuperação de 100% da atividade azoalbuminásica e uma purificação de 5,4 vezes (TABELA 4). Quanto à atividade azoglobulinásica, há uma recuperação de 85% e uma purificação de 4,5 vezes (TABELA 5). O pico III mostrou-se inativo quando  $\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida e L-Leucina-p-nitroanilida foram usados como substratos.

Em experiências anteriores (AINOUZ et al., 1981) foi mostrado, por filtração em gel de Sephadex G-100, que o pico I encerra as atividades caseinásica e hemoglobínica e o pico II é responsável pelas atividades BAPA-ásica e LPA-ásica. Assim sendo, as enzimas responsáveis pela hidrólise in vitro das azoalbuminas e azoglobulinas parecem ser diferentes daquelas capazes de hidrolisar caseína, hemoglobina, BAPA e LPA.

O peso molecular de 22.000 daltons, apresentado pelo pico III, é comparável ao peso molecular de 23.000 daltons encontrado por BAUMGARTNER & CHRISPEELS (1977) para a vicilina-peptídio-hidrolase, a enzima capaz de hidrolisar in vitro a principal proteína de reserva de Vigna radiata (L.) Wilczek, e ao de 27.000 daltons encontrado para a enzima purificada de Lupinus angustifolius (SHEPARD & MOORE, 1978).

#### 4.6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As frações obtidas nas etapas de purificação foram



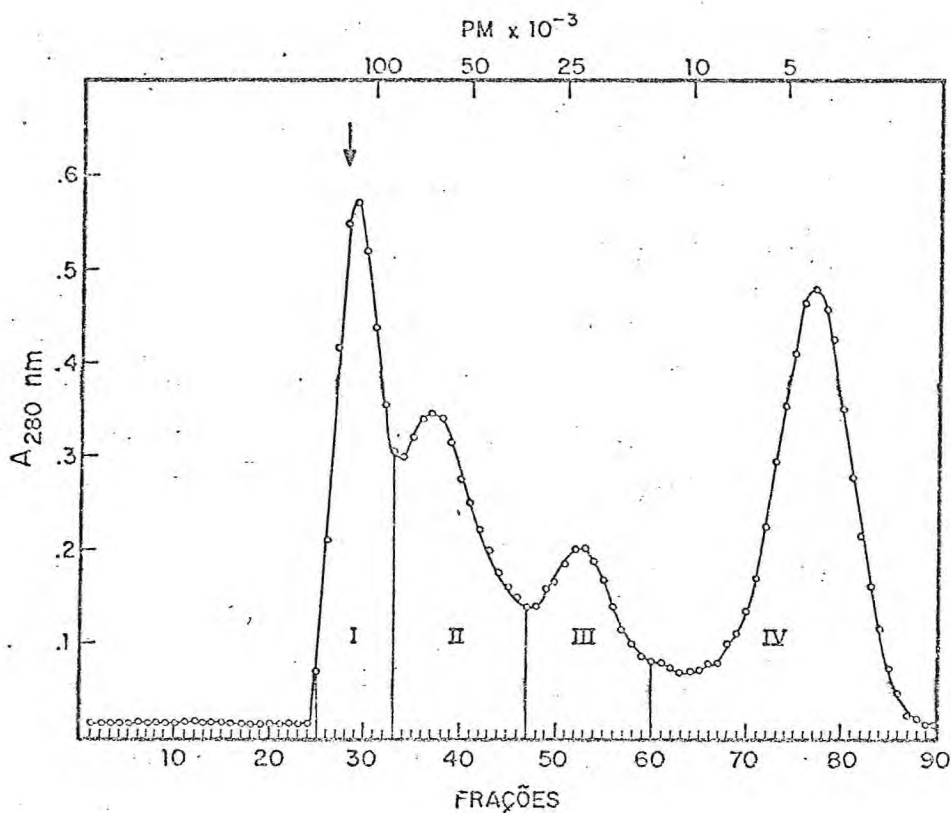


FIGURA 13 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração 0/75 liofilizada. A coluna (2,5 x 40 cm) foi equilibrada com tampão fosfato 0,02M.pH 7,6. A amostra (50mg da fração 0/75) foi dissolvida no mesmo tampão (2,5 ml). A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 30 ml/hora, a temperatura ambiente (27<sup>o</sup>C) e o eluato coletado em frações de 3 ml.

TABELA 4 - Atividade azoA nas frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-100.

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade azoA			
			UA*	UA/mg**	Recuperação (%)	Purificação (x)
Extrato Total	120	1.704,0	26.400	15,49	-	-
0/75	48	502,0	26.400	52,58	-	-
0/75 (liof.)	6	35,9	2.046	57,03	100	-
Pico I Sephadex G-100	6	19,5	1.020	52,30	49,8	-
Pico II Sephadex G-100	6	8,7	420	48,20	20,5	-
Pico III Sephadex G-100	6	6,8	2.100	309,70	102,6	5,4

Os dados referem-se a extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias preparado com tampão fosfato 0,02M, pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (cotilédones: meio de extração).

\* UA - Unidade de atividade total.

\*\* UA/mg - Atividade específica.

TABELA 5 - Atividade azoG nas frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-100.

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Atividade azoG			
			UA *	UA/mg **	Recuperação (%)	Purificação (x)
Extrato total	120	1.704,0	26.400	15,49	-	-
0/75	48	502,0	26.400	52,58	-	-
0/75 (liof.)	6	35,8	1.620	45,00	100	-
Pico I Sephadex G-100	6	19,5	390	20,00	24,1	-
Pico II Sephadex G-100	6	8,7	300	34,50	18,5	-
Pico III Sephadex G-100	6	6,8	1.380	203,00	85,2	4,5

Os dados referem-se a extrato de cotilédones de sementes germinadas por 3 dias preparado com tampão fosfato 0,02M, pH 7,6 usando-se a proporção 1:5 (cotilédones: meio de extração).

\* UA - Unidade de atividade total.

\*\* UA/mg - Atividade específica.



submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Os diagramas eletroforéticos (FIGURA 14) mostram um estudo comparativo dos padrões eletroforéticos de amostras de extrato total de sementes quiescentes e de sementes germinadas por 3 dias, da fração 0/75 e do pico III obtido a partir da fração 0/75 por cromatografia em Sephadex G-100. Os diagramas 1, 2, 3 e 4 representam as amostras submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 8,3 e os diagramas 5 e 6 referem-se aos padrões eletroforéticos do pico III, antes e após tratamento com beta-mercaptoetanol, em gel de poliacrilamida com SDS.

Verificou-se que por eletroforese em pH 8,3, o pico III que retém as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, apresenta seis bandas de proteína comuns a todas as amostras.

O pico III (diagramas 5 e 6), quando submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS sem tratamento com beta-mercaptoetanol, apresentou cinco bandas de proteína com pesos moleculares em torno de 9.200, 12.180, 14.940, 22.320 e 28.480 daltons. Quando o pico III foi tratado com beta-mercaptoetanol verificou-se a presença de cinco bandas de proteína com pesos moleculares em torno de 9.200, 12.180, 13.500, 14.940 e 28.480 daltons.

Podemos observar que o uso de beta-mercaptoetanol não modificou sensivelmente o padrão eletroforético do pico III obtido antes do tratamento. O fato do pico III ter apresentado várias faixas de proteína é uma indicação de que a fração não está suficientemente purificada e, por falta de um método de ensaio adequado, não se pode afirmar se todas estão envolvidas na atividade proteolítica.

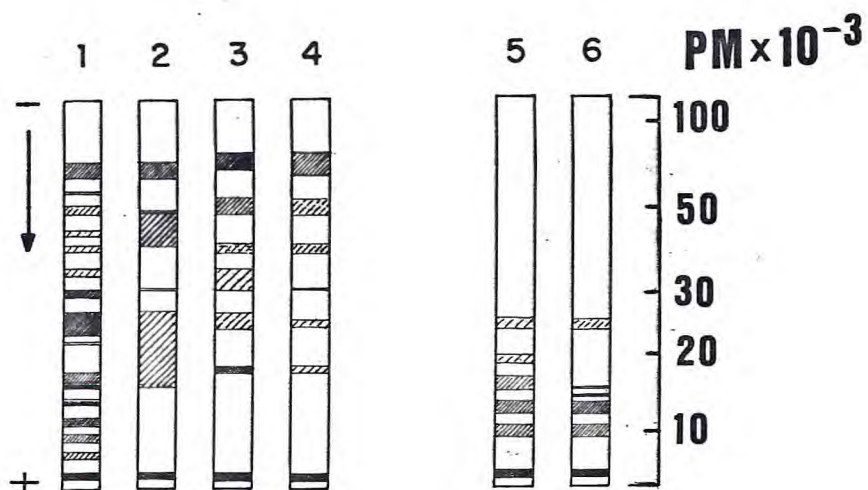


FIGURA 14 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.

Diagramas 1, 2, 3 e 4: eletroforese em pH 8,3.

1. Extrato total de sementes quiescentes;

2. Extrato total de sementes germinadas por 3 dias;

3. Fração 0/75 de sementes germinadas por 3 dias;

4. Pico III (Sephadex G-100);

Diagramas 5 e 6, eletroforese com SDS em presença e ausência de beta-mercaptoetanol.

5. Pico III (SDS);

6. Pico III (SDS e beta-mercaptoetanol).

## 5 - CONCLUSÕES

1. O extrato de cotilédones de sementes quiescentes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridô apresenta baixa capacidade de hidrolisar azoalbuminas (pH 6,0) e azoglobulinas (pH 6,9) obtidas de sementes quiescentes.
2. Há um aumento das atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica totais nos cotilédones até o terceiro dia de germinação seguido de um decréscimo até o sétimo dia, quando os cotilédones ainda encerram o dobro das atividades iniciais.
3. Quando as atividades são expressas por mg de proteína o acréscimo das atividades corresponde ao decréscimo de proteínas nos cotilédones.
4. As atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica, presentes em cotilédones de sementes germinadas por 3 dias, estão concentradas na fração do extrato que precipita com sulfato de amônio até 75% de saturação.
5. As atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica de cotilédones germinantes de Vigna unguiculata apresentam estabilidade quando a fração 0/75 é aquecida as temperaturas de 30 e 40°C, enquanto que uma perda de atividade em torno de 75% é observada quando a fração é submetida por 10 minutos a temperatura de 60°C.
6. A fração 0/75, obtida por precipitação com sulfato de amônio (75% de saturação), quando submetida a filtração em gel de Sephadex G-100 em pH 7,6 apresenta um componente com peso molecular de 22.000 daltons, encerrando as atividades azoalbuminásica e azoglobulinásica.



7. O sistema enzimático responsável pela hidrólise das azoalbuminas e azoglobulinas de sementes quiescentes diferem daqueles responsáveis pela hidrólise dos seguintes substratos: caseína, hemoglobina,  $\alpha$ -N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida e L-Leucina-p-nitroanilida.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L., BENEVIDES, N.B. and FREITAS, A.L.P. Proteolytic activities in seeds of Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridõ. Biol. Plantarum (Praha), 23 (2) : 133-140, 1981.
- ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol., 27 : 95-117, 1976.
- BEWLEY, J.D. and BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1 Springer-Verlag, New York, 1978.
- BAUMGARTNER, B. and CHRISPPEELS, M.J. Purification and characterization of vicilin-peptide-hidrolase the major endopeptidase in the cotyledons of mung bean seedlings. Eur. J. Biochem, 77 : 223-233, 1977.
- BURGER, W.C. The proteases of barley and malt recent research. Cereal Sci. Today, 11 : 19-23, 1966.
- CLARKE, J.T. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 : 428 - 436, 1964.
- DETERMANN, H. and MICHEL, W. The correlation between molecular weight and evolution behavior in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog., 25 : 303-313, 1966.
- GOA, J. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5 : 218-222, 1953.
- GOAD, L.J. The development of amylase and protease activity in germinating wheat. PhD thesis. University of Manchester. 1963.

- HARA, I. and MATSUBARA, H. Pumpkin (Cucurbita sp) seed globulin VI. Proteolytic activities appearing in germinating cotyledons. Plant & Cell Physiol., 21 (2) : 233-245, 1980.
- HARVEY, B.M.R. and OAKS, A. Characteristics of an acid protease from maize endosperm. Plant Physiol., 53 : 449-452, 1974.
- HOBDAY, S.M., THURMAN, D.A. and BARBER, D.J. Proteolytic and trypsin inhibitory activities in extracts of germinating Pisum sativum seeds. Phytochem., 12 : 1041-1046, 1973.
- KOROLYOVA, T.N., SHUTOV, A.D. and VAINTRAUB, I.A. The action of the proteolytic enzymes of dry Vetch seeds on their own reserve proteins. Plant Sci. Letters, 4 : 309-313, 1975.
- LONG, C. Ed. Biochemist's Handbook. F. and F.N. Spon Ltd. London, 1961.
- MINAMIKAWA, T. Hydrolytic enzyme activities and degradation of storage components in cotyledons of germinating Phaseolus mungo seeds. Bot. Mag. (Tokyo), 92 : 1-12, 1979.
- MURRAY, D.R. A storage role of albumins in pea cotyledons. Plant Cell & Environment, 2 : 221-226, 1979.
- PUSZTAI, A. and DUNCAN, I. Changes in proteolytic enzyme activities and transformation of nitrogenous compounds in the germinating seeds of kidney bean (Phaseolus vulgaris). Planta (Berl.), 96 : 317-325, 1971.
- PUSZTAI, A., CROY, R.R.D., GRANT, G., and WATT, W.B. Compartmentalization in the cotyledonary cells of Phaseolus vulgaris L. seeds: A differential sedimentation study. New Phytol., 79 : 61-71, 1977.



- REILLY, C.C., O'KENNEDY, B.T., TITUS, J.S., and SPLITTSTOESSER, W.E.  
The solubilization and degradation of pumpkin seed globulin during germination. Plant & Cell Physiol., 19 (7) : 1235-1246, 1978.
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 24 : 173-96, 1973.
- RYAN, C. and WALKER, S.M. Plant Proteinases in The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. Vol. 6 Abraham Marcus, ed. Academic Press. London, 1981.
- SHEPARD, D.V. and MOORE, K.G. Purification and properties of a protease from Lupinus angustifolius during germination. Eur. J. Biochem., 91 : 263-268, 1978.
- STECK, G., PETER, L. and BURK, R.R. Detection of proteins and low molecular weight peptides in polyacrylamide gels by formaldehyde fixation. Anal. Biochem., 107 : 21-24, 1980.
- VICKERY, H.B., SMITH, E.L., HUBBELL, R.B., and NOLAN, L.S. Cucurbit seed globulins I. J. Biol. Chem., 140 : 613-624, 1941.
- WEBER, K. and OSBORN, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244 (16) : 4406-4412, 1969.
- XAVIER FILHO, J. and AZEVEDO MOREIRA, R. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 84 : 296-303, 1978.
- YOUNG, J.L. and VARNER, J.E. Enzyme synthesis in the cotyledons of germinating seeds. Arch. Biochem. Biophys., 84 : 71-78, 1959.

7 - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

Abstract Only 785

PROTEOLYTIC ACTIVITY IN *Vigna unguiculata* (L.) Walp  
USING MODIFIED ENDOGENOUS PROTEINS AS SUBSTRATES.

I. Lima Ainoz and A.L. Linhares Ponte, Dept. of Bio-  
Chemistry and Molecular Biology, Univ. Fed. do Ceará,  
C.P. 1065, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Proteolytic activity in extracts of cotyledons of mature and germinated seeds, obtained with sodium phosphate buffer pH 7.6, was studied using modified endogenous proteins as substrates. Azoglobulins and azoalbumins were prepared from mature seeds and used as substrates against extracts of cotyledons from germinated seeds up to seven days. The assays were carried out at 50°C, for 30 min, at pH 6.0 for azoalbumins and pH 6.9 for azoglobulins. The activities for both substrates increase up to the 3rd day and then decrease until the 7th day. The proteolytic activities patterns using azoglobulins, azoalbumins, casein (pH 6.0), and hemoglobin (pH 3.5) as substrates are similar but differ significantly when BAPA (pH 7.6) and LPA (pH 7.0) were used as substrates. The results suggest that there are several enzymes involved in the degradation of the seed proteins during germination. (Supported by CNPq grants)

Plant. Physiol. 65(6) Sup., 142 Abstract 785 (1980).



14

ATIVIDADE AZOGLOBULÍNICA EM COTILÉDONES DE SEMENTES GERMINANTES DE Vigna unguiculata (L.) Walp cv. SERIDÓ.

A.L. POATE FREITAS e I. LIMA RINOUZ

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, C.P. 1065, Fortaleza, CE.

O emprego de substratos endógenos, no estudo da atividade proteolítica em sementes de vegetais, tem sido sugerido como um dos possíveis meios de se verificar o comportamento das enzimas proteolíticas durante a germinação, por se oferecer condições mais próximas daquelas que ocorrem in vivo.

Verificou-se anteriormente (Plant Physiol 65(6), 142, 1980) que azoglobulinas, preparadas a partir de sementes quiescentes de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. Seridó, são hidrolisadas por extratos de cotilédones de sementes germinadas por três dias.

A atividade azoglobulínica foi determinada nas frações obtidas por precipitação, do extrato de sementes germinadas por três dias, com sulfato de amônio. Os ensaios de atividade foram feitos por 30 min a 50°C, usando-se como substrato solução de azoglobulina a 2% em tampão fosfato ( $K_2HPO_4/NaH_2PO_4$ ) 0,2 M pH 6,9. A reação foi parada com TCA e o filtrado posteriormente neutralizado com NaOH 2N. A medida de atividade foi feita pela absorbância em 440nm.

A atividade em estudo mostrou-se distribuída nas frações precipitadas nos intervalos de até 25%, de 25 a 50% e 50 a 75% de saturação com sulfato de amônio. A preparação obtida por precipitação com sulfato de amônio até 75% de saturação apresentou 4 frações, quando submetida a cromatografia em Sephadex G-100 (pH 7,6). A fração encerrando maior atividade azoglobulínica parece ser diferente daquelas responsáveis pela hidrólise dos substratos anteriormente usados (caseína, hemoglobina, L-leucina-p-nitroanilida e  $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida). Os resultados sugerem a ocorrência de diferentes sistemas enzimáticos em sementes quiescentes e germinantes, em concordância com a sugestão de outros autores quando do estudo de outras sementes.

(UFC, CNPq)

I Reunião Regional da SBBq, Fortaleza, 1980.