

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM SEMENTES DE Clitoria ternatea L.

MARIA HELENA GOMES MOTA

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 - 1988

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

Maria Helena Gomes Mota

Dissertação aprovada em 29-02-1988

Iracema Lima Ainouz
Orientador da Dissertação

José Xavier Filho, D.Sc.

Renato de Azevedo Moreira, D.Sc.

A meus pais

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através 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.

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 apresentadas durante a realização desta dissertação.

À professora Ana Lúcia Ponte Freitas, pela cooperação e amizade.

Ao professor José Adalberto Gadelha, pela doação das sementes de cunhã.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e, de modo especial, à Maria de Fátima Muniz Soares, pela cooperação durante a execução do trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS</u>	xi
<u>RESUMO</u>	xii
<u>ABSTRACT</u>	xiii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	14
2.1 - <u>Material Vegetal</u>	14
2.2 - <u>Reagentes</u>	14
3 - <u>MÉTODOS</u>	15
3.1 - <u>Preparação de Farinha de Sementes Quiescentes</u> .	15
3.2 - <u>Curva de Solubilização de Proteína em Função do pH</u>	15
3.3 - <u>Condições de Germinação</u>	16
3.4 - <u>Composição Mínima</u>	16
3.4.1 - <u>Determinação de Umidade</u>	16
3.4.2 - <u>Determinação de Cinzas</u>	17
3.4.3 - <u>Determinação de Lipídios Totais</u>	17
3.5 - <u>Determinação de Proteína</u>	17
3.5.1 - <u>Método de Kjeldahl</u>	18
3.5.2 - <u>Método de Bradford</u>	18
3.6 - <u>Preparação dos Extratos</u>	19
3.6.1 - <u>Extração em pH 7,6</u>	19
3.6.2 - <u>Extração em pH 5,0</u>	19
3.6.3 - <u>Extração Seqüenciada com Água, NaCl e HCl</u> ...	20
3.6.4 - <u>Precipitação com Sulfato de Amônio</u>	20
3.7 - <u>Filtração em Gel de Sephadex</u>	20
3.8 - <u>Determinação das Atividades Enzimáticas</u>	21
3.8.1 - <u>Atividade Azocaseinásica</u>	21
3.8.2 - <u>Atividade BAPA-ásica</u>	22

	Página
3.8.3 - Atividade LPA-ásica	23
3.8.4 - Atividade Carboxipeptidásica	23
3.9 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u>	24
4 - <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	25
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	50
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	52
7 - <u>COMUNICAÇÃO A CONGRESSO</u>	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Curva de solubilização de proteínas de sementes quiescentes em função do pH	28
2	Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida das frações proteicas solubilizadas em diferentes valores de pH	29
3	Tamanho das plântulas durante a germinação ..	32
4	Peso fresco de cotilédones e eixos durante a germinação	33
5	Peso seco de cotilédones e eixos durante a germinação	35
6	Proteína total em cotilédones e eixos durante a germinação	36
7	Teor de proteína extraída a pH 7,6 de cotilédones e eixos durante a germinação	38
8	Teor de proteína extraída a pH 5,0 de cotilédones e eixos durante a germinação	39
9	Atividade azocaseinásica em cotilédones e eixos durante a germinação	41
10	Atividade LPA-ásica em cotilédones e eixos durante a germinação	43
11	Atividade BAPA-ásica em cotilédones e eixos durante a germinação	45
12	Atividade carboxipeptidásica em cotilédones e eixos durante a germinação	47

FIGURA

Página

- 13 Cromatografia em Sephadex G-100 da fração pre
cipitada, do extrato de farinha de sementes
quiescentes, com sulfato de amônio até 90% de
saturação 48

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Chave dicotômica para a nomenclatura de enzi mas proteolíticas em plantas	6
2	Composição mínima da semente comparada com ou tros valores encontrados na literatura	26
3	Peso fresco, peso seco e proteína total de se mentes com e sem tegumento, cotilédones e ei xos	27
4	Teor de proteína obtido por extração seqüen ciada com água, NaCl e HCl	31

ABREVIATURAS

BAPA- α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
CBZ-Phe-Ala - carbobenzoxi-L-fenilalanil-alanina
DFP - diisopropilfluorofosfato
DTT - ditiotreitól
LPA - L-leucina-p-nitroanilida
 β -ME - β -mercaptoetanol
p-CMB - para-cloromercuribenzoato
SDS - dodecil sulfato de sódio
TCA - ácido tricloroacético
TNBS - ácido trinitrobenzenosulfônico

RESUMO

Sementes quiescentes de Clitoria ternatea L. (cunhã) foram usadas para determinação da composição mínima e solubilização de proteínas. Foram estudados a variação de proteína total e ocorrência e comportamento de enzimas proteolíticas em cotilédones e eixos durante os primeiros 15 dias de germinação.

As sementes quiescentes, com um peso fresco médio de 47,8mg, apresentaram a seguinte composição mínima percentual: 10,74 de umidade, 4,18 de cinzas, 6,97 de nitrogênio total, 19,34 de lipídios totais e 32,92 de carboidratos.

A curva de solubilização de proteínas de sementes quiescentes, em função do pH, mostrou serem as proteínas mais solúveis em pH 9,0.

O teor de proteína total mostrou-se mais alto nos cotilédones, decrescendo até o final do período estudado, enquanto nos eixos há um acréscimo contínuo.

Extratos de cotilédones e eixos apresentaram atividade proteolítica quando foram utilizados os seguintes substratos: azocaseína (pH 6,0), α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (pH 7,6), L-leucina-p-nitroanilida (pH 7,0) e CBZ-fenilalanilalanina (pH 5,2).

Durante o período de germinação estudado as atividades LPA-ásica e BAPA-ásica apresentaram-se mais altas nos cotilédones, enquanto as atividades azocaseinásica e carboxipeptidásica mostraram-se mais altas nos eixos.

SUMMARY

Proximate analysis and protein solubilization of quiescent seeds, protein content and occurrence of proteolytic activity in cotyledons and axis of Clitoria ternatea L. during fifteen days germination were studied.

The quiescent seeds, presenting a medium fresh weight of 47.8mg, show the following minimum percentual composition: water content (10.74), ash (4.18), total nitrogen (6.79), total lipids (19.34), and total sugars (32.92).

The protein solubilization curve shows a high solubility at pH 9.0.

The total protein content, determined by the Kjeldahl method, decreases continuously in the cotyledons during germination, while in the axis it increases simultaneously.

The cotyledons and axis when tested for proteolytic activity show activity against the following substrates: azocasein (pH 6.0), α -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (pH 7.6), L-leucine-p-nitroanilide (pH 7.0), and CBZ-phenyl-alanyl-alanine (pH 5.2).

During the germination period studied the LPA-ase and BAPA-ase activities are higher in the cotyledons while the azocaseinase and the carboxypeptidase activities are higher in the axis.

1 - INTRODUÇÃO

Considerações Gerais

As sementes de plantas constituem uma forma de adaptação aos rigores da vida na terra e representam uma forma embrionária da planta que pode resistir às condições de seca, frio, etc. e podem servir como agente de dispersão para as diferentes espécies de plantas. Quando presentes em um meio ambiente que possua condições satisfatórias de umidade e temperatura, as sementes podem quebrar sua quiescência e iniciar o processo de germinação. A água embebida do meio ambiente reidrata os tecidos da semente e a velocidade dos processos metabólicos aumenta rapidamente. O processo de germinação é finalmente completado quando emerge a primeira radícula. Sob condições favoráveis, a plântula continua a crescer, se desenvolver e produzir uma planta fotossintética, funcionando (WILSON, 1986).

Durante a germinação e nos primeiros estágios de desenvolvimento da plântula, a planta é dependente das suas reservas de nutrientes. Essas reservas devem fornecer energia, cadeias carbonadas pré-formadas, nitrogênio fixado organicamente e minerais para o desenvolvimento da plântula, até que a planta tenha desenvolvido um sistema radicular funcional e capacidade fotossintética característicos de uma planta autotrófica (WILSON, 1986).

As reservas mais comumente encontradas são: carboidratos (incluindo amido e oligossacarídeos), proteínas, lipídios (especialmente triglicerídios) e fitinas (que servem como reserva de ions metálicos e fósforo). As proporções relativas de cada forma de reserva variam muito entre diferentes espécies e famílias de plantas. Em sementes maduras de plantas dicotiledôneas, as reservas estão geralmente locali-

zadas nos cotilédones do embrião, no endosperma ou em ambos (BEWLEY & BLACK, 1978).

Os cotilédones servem como principal ou único tecido de reserva na maioria das leguminosas. Entretanto, apesar de suas diferenças anatômicas, ultra-estrutura e composição química, os tecidos de reserva das sementes são bastante semelhantes. A maioria das substâncias de reserva são guardadas em formas insolúveis, especialmente nas organelas de reserva, isto é, como amido nos amiloplastos ou triglicerídios nos esferossomos (corpos gordurosos). O nitrogênio é estocado em quase todas as sementes em substâncias pouco solúveis ou proteínas de reserva insolúveis, que estão geralmente armazenadas nos chamados corpos proteicos ou grãos de aleurona (PERNOLLET, 1978). Os nutrientes minerais (fosfato, potássio, magnésio e cálcio) são estocados como um precipitado insolúvel de sais mistos (fitatos), dentro dos corpos proteicos. As quantidades das principais substâncias de reserva nas sementes diferem de gênero para gênero (SALMIA, 1981).

Durante a germinação e crescimento da plântula, as reservas são mobilizadas, isto é, as moléculas são hidrolisadas em suas unidades constituintes, isto é, monossacarídeos, aminoácidos, ácidos graxos, etc. Essas moléculas são então utilizadas pela plântula para o fornecimento de energia metabólica e biossíntese (WILSON, 1986).

No caso particular das reservas proteicas à mobilização durante a germinação tem sido considerada dependente de três componentes: proteínas de reserva, corpos proteicos e enzimas proteolíticas (MILLERD, 1975).

Proteínas de reserva

Uma proteína de reserva pode ser definida como qualquer proteína que: a) é acumulada na semente em grandes quantidades; b) ocorre somente na semente; e c) pode ser

hidrolisada para fornecer seus aminoácidos constituintes que são então usados como fonte de nitrogênio reduzido pelas plantas durante a germinação e crescimento inicial. Consistente com seu papel de reserva de nitrogênio reduzido, as proteínas de reserva comumente encerram uma alta proporção das amidas glutamina ou asparagina (SPENCER, 1984).

As principais proteínas de reserva de leguminosas são globulinas (insolúveis em água, solúveis em sal), embora recentemente algumas albuminas tenham sido identificadas com a definição anteriormente referida (SPENCER, 1984).

Há um notável grau de uniformidade nas propriedades físico-químicas das proteínas de reserva. Em leguminosas são ou do tipo-legumina ou do tipo-vicilina. Leguminas são globulinas que apresentam uma massa molecular em torno de 360.000 daltons (12 S), consistindo de seis unidades semelhantes (de aproximadamente 60.000 daltons) cada uma encerrando, por sua vez, um polipeptídio básico e um ácido covalentemente ligados por uma ponte dissulfeto. As globulinas do tipo-vicilina têm um peso molecular de aproximadamente 180.000-200.000 daltons (7-9 S), uma estrutura de subunidades mais complexa do que as leguminas e sem apresentarem pontes dissulfeto (SPENCER, 1984).

As lectinas também têm sido consideradas proteínas de reserva em potencial e têm provado ser comum em sementes, especialmente de leguminosas (WILSON, 1986).

Os inibidores de proteínases constituem um outro grupo de proteínas ao qual tem sido atribuída a função de proteína de reserva, principalmente por causa do seu alto teor em aminoácidos sulfurados (WILSON, 1986).

Corpos protéicos

Na maioria das sementes as proteínas parecem estar localizadas nos corpos protéicos. Várias enzimas hidrolíticas cuja função é degradar compostos de reserva durante a

germinação sem reagir com o resto da célula estão nos corpos protéicos. Os corpos protéicos têm propriedades autolíticas que não diferem daquelas dos lisossomos, uma vez que as hidrolases dos corpos protéicos não reagem com os compostos citoplasmáticos durante a germinação (ASHTON, 1976).

Os corpos protéicos têm uma forma arredondada e seus tamanhos variam bastante nas várias espécies de plantas e também na mesma espécie de planta. Em dicotiledôneas eles têm um diâmetro variando entre 1 e 22 μm , com um tamanho médio de poucos microns. São envolvidos por uma membrana unitária. A arquitetura interna dos corpos protéicos difere entre as espécies de plantas. Em algumas plantas, especialmente nas leguminosas, eles parecem ser estruturas granulares ou homogêneas sem inclusão aparente (WILSON, 1986).

Essas organelas subcelulares são encontradas por todo o embrião das dicotiledôneas, mas também no eixo e no endosperma, se este tecido está presente como órgão de reserva na semente madura.

A estrutura, composição e mudanças dos corpos protéicos durante a germinação tem sido objeto de várias revisões (ASHTON, 1976; BEWLEY & BLACK, 1978; PERNOLLET, 1978).

Enzimas proteolíticas

A hidrólise das proteínas é efetuada em qualquer material biológico pela ação combinada de proteinases (também referidas como proteases e endopeptidases) e peptidases (exopeptidases, dipeptidases) (SALMIA, 1981). Em células animais e microbianas a proteólise desempenha papéis críticos em numerosos processos, tais como: ativação de enzimas, maturação hormonal, funções de lisossomos, excreção de proteína, diferenciação celular e envelhecimento. Em tecidos vegetais, a maioria das pesquisas têm sido concentradas no papel das proteases na mobilização das proteínas de reserva (STOREY & WAGNER, 1986).

As enzimas proteolíticas têm sido classificadas em vários grupos de acordo com a hidrólise das ligações peptídicas internas e externas de proteínas ou baseadas no mecanismo de catálise. STOREY & WAGNER (1986) propõem, no trabalho de revisão sobre proteases vegetais, a classificação apresentada na TABELA 01 e chamam a atenção para a necessidade de uma uniformização na denominação das enzimas proteolíticas em plantas. As endopeptidases são classificadas tendo em vista o mecanismo catalítico, enquanto as exopeptidases são classificadas conforme a especificidade do substrato. Aquelas específicas para α -NH₂-terminal são aminopeptidases (que removem unidades de aminoácidos) ou dipeptidil peptidases (que removem seqüencialmente dipeptídios de proteínas e peptídios). As enzimas atuando na porção α -COOH-terminal são carboxipeptidases (que removem unidades de aminoácidos) ou peptidil dipeptidase (que removem seqüencialmente dipeptídios). Dipeptidases convertem dipeptídios em aminoácidos, enquanto tripeptidases agem sobre tripeptídios para produzir um dipeptídio e um aminoácido. Dipeptidil peptidases, peptidil dipeptidases, dipeptidases e tripeptidases ainda não foram caracterizadas em células vegetais.

A proposição de STOREY & WAGNER (1986) deve-se ao fato dos diferentes autores usarem uma terminologia diferente, dificultando os estudos de comparação das atividades encontradas nas diversas espécies estudadas. Por outro lado, a inclusão de uma endopeptidase na classificação proposta exige dados relativos aos inibidores específicos para as diferentes classes mecanísticas. Infelizmente, um simples e único protocolo de diagnóstico que prove de modo claro e inequívoco que uma protease é do tipo serina, cisteína, ácido aspártico ou metálica não é ainda disponível.

Pelos motivos referidos encontramos, por exemplo, nos estudos de SALMIA (1981) referência a: (1) carboxipeptidases, com ótimo de pH em torno de 5,0, consideradas serino proteases por serem inibidas por diisopropilfluorofosfato; (2) naftilamidases (arilamidases), consideradas aminopeptidases que hidrolisam substratos sintéticos (leucil- β -naftilamida e leu-

TABELA 1 - Chave dicotômica para a nomenclatura de enzimas proteolíticas em plantas*

Proteases ou peptidases - enzimas atuando sobre ligações peptídicas

I. Clivam ligações peptídicas internas - A

II. Clivam ligações peptídicas externas - B

A. Endopeptidases ou proteinases

1. Serina-proteinase (EC.3.4.21) - serina ou histidina do centro ativo envolvida na catálise, pH ótimo usualmente entre 7 e 9.
2. Cisteína-proteinase (EC.3.4.22) - cisteína do centro ativo envolvida na catálise, pH ótimo usualmente entre 4 e 7.
3. Ácido aspártico-proteinase (EC.3.4.23) - duas unidades de ácido aspártico e uma tirosina do centro ativo envolvidos na catálise, pH ótimo abaixo de 5.
4. Metaloproteinase (EC.3.4.24) - ion metálico do centro ativo envolvido na catálise, pH ótimo usualmente entre 7 e 9.

B. Exopeptidases

1. Amino-peptidase (EC.3.4.11) - remove unidades de aminoácido da porção N-terminal de cadeias peptídicas.
2. Dipeptil peptidase (EC.3.4.14) - remove unidades dipeptídicas da porção N-terminal de cadeias peptídicas.
3. Carboxipeptidase (EC.3.16.17) - remove unidades de aminoácido da porção COOH-terminal de cadeias peptídicas.
4. Peptidil dipeptidase (EC.3.4.15) - remove dipeptídios da porção COOH-terminal de cadeias peptídicas.
5. Dipeptidase (EC.3.4.13) - cliva dipeptídios a aminoácidos.
6. Tripeptidase - cliva tripeptídios das porções N- e COOH-terminais.

* STOREY & WAGNER, 1986.

cil-p-nitroanilida) nos quais o grupo carboxila de um aminoácido forma uma ligação peptídica com um grupo amino de alguma amina aromática; (3) peptidases alcalinas, com pH ótimo na região alcalina e pouca ou nenhuma atividade sobre os substratos para naftilamidases.

Estudos de revisão sobre enzimas proteolíticas em plantas foram feitos por RYAN (1975), ASHTON (1976), RYAN & WALKER-SIMMONS (1981), MIKOLA (1983), por vários autores em dois volumes editados por DALLING (1986) e mais recentemente por SHUTOV & VAINTRAUB (1987).

Os principais estudos envolvendo a mobilização de proteínas em sementes têm sido iniciados determinando-se as enzimas que possam estar envolvidas nestes processos. É suposto, por esta abordagem, que aquelas atividades proteolíticas, que estão presentes ou aumentam o nível coincidentemente com o desaparecimento das proteínas de reserva, são aquelas enzimas responsáveis pela sua degradação (WILSON, 1986).

Basicamente, dois tipos de abordagem diferentes no estudo da mobilização das proteínas de reserva em dicotiledôneas, tem aparecido na literatura: (1) caracterização da velocidade de utilização das enzimas proteolíticas presentes em sementes quiescentes e germinantes e no desenvolvimento da plântula; e (2) caracterização das mudanças estruturais que ocorre na proteína de reserva durante a germinação e nos primeiros estágios de desenvolvimento da plântula. O estudo da mobilização das proteínas de reserva em uma dada espécie de planta deveria envolver ambos os caminhos experimentais, mas infelizmente raras vezes isto foi posto em prática (WILSON, 1986).

Apesar das críticas feitas quanto à obtenção das enzimas a partir de extratos de tecidos como um todo, que presumivelmente contêm proteínas originárias do citossol, do rompimento dos corpos proteicos, de vacúolos e de outras organelas; do emprego não apropriado de substratos de origem animal; e da metodologia empregada, WILSON (1986) considera os estudos de degradação em função do tempo uma abordagem útil para a questão da mobilização de proteínas e uma base

útil para futuras experiências, principalmente, se associados a estudos de compartimentalização.

Infelizmente, em muitos casos, uma única enzima tem sido estudada para um tipo de semente. As enzimas purificadas mais conhecidas incluem as proteinases ácidas presentes em sementes quiescentes de maconha (ST. ANGELO *et. al.*, 1969) e em sementes germinantes de feijão (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1977). Carboxipeptidases altamente purificadas foram obtidas de cevada (VISURI *et. al.*, 1969, MOELLER *et. al.*, 1970), de algodão (IHLE & DURE, 1972 a e b) e de arroz (DOI *et. al.*, 1980 a e b). Aminopeptidases têm sido purificadas de grão de cevada (KOLEHMAINEN & MIKOLA, 1971; SOPANEN & MIKOLA, 1975), de ervilha (ELLEMAN, 1974) e abóbora (ASHTON & DAHMEN, 1968). Dipeptidases de cevada (SOPANEN, 1976) e de abóbora (ASHTON & DAHMEN, 1968) têm sido purificadas.

Muitas endopeptidases detectadas em sementes são enzimas que têm uma atividade ótima em pH ácido e podem ser classificadas como endopeptidases ácidas. Várias espécies de plantas tem sido examinadas para a atividade de tais endopeptidases, isto é: milho (HARVEY & OAKS, 1974), "mung-bean" (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1977) e arroz (DOI *et. al.*, 1980 d).

Entretanto, essas enzimas não têm sempre sido bem caracterizadas, algumas delas mostrando serem inibidas por inibidores específicos para SH ou ativadas por agentes redutores e outras não são afetadas por nenhum inibidor específico. Nenhum dos resultados obtidos estabelece uma propriedade geral para as enzimas ácidas em sementes germinantes de plantas.

DOI *et. al.*, (1980 d) estudaram o comportamento dessas enzimas em sementes quiescentes e germinantes de arroz. As enzimas apresentam um pH ótimo entre 3 e 3,5 com 2% de hemoglobina e mostraram diferenças nas propriedades testadas. O comportamento dessas enzimas com relação aos inibidores das atividades peptidásicas e proteásicas sugere que existe no mínimo dois tipos de proteinases diferentes nas sementes quiescentes e germinantes de arroz, isto é, uma enzima sensível a pepstatina e uma enzima sulfidrílica. Essas enzimas

foram separadas por cromatografia em gel de Sephadex G-100, onde o primeiro pico de atividade correspondia à enzima pepstatina-sensível e o segundo pico correspondia à enzima sulfidrílica.

BAUMGARTNER & CHRISPEELS (1977), purificaram uma enzima denominada vicilina-peptídio-hidrolase em "mung-bean". A enzima isolada de cotilédones de "mung bean" germinados foi incubada em pH 5,1 e seus produtos de reação são oligopeptídios e pequenos peptídios.

Uma protease com ótimo de pH em 3,8 foi obtida de endosperma de sementes de milho por HARVEY & OAKS (1974). A enzima é capaz de degradar gliadina, edestina e hidrolisar parcialmente zeína e glutelina. A atividade aumenta do terceiro ao oitavo dia após imbebição e decresce no décimo dia.

A presença de aminopeptidases tem sido examinada em várias plantas, isto é, arroz (DOI et. al., 1980 c), Phaseolus vulgaris (CRUMP & MURRAY, 1979) e cevada (MIKOLA & KOLEHMAINEN, 1972).

Recentemente, o papel fisiológico de aminopeptidases em plantas tem sido observado em relação ao transporte de peptídios para o embrião.

DOI et. al. (1980 c) conseguiram a purificação de uma LPA-ase presente em grãos de arroz quiescentes, usando fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-150. A enzima purificada apresentou atividade LPA-ásica mais baixa após a focalização isoelétrica. A atividade LPA-ásica foi mais alta na presença de sais, indicando que cátions (K^+ , Na^+) estão relacionados com a ativação da enzima. Foram determinados: pH ótimo, efeito de ânions ativando a enzima, ponto isoelétrico e estabilidade térmica. A enzima isolada por DOI et. al., é semelhante a uma aminopeptidase obtida de grão de cevada não germinado em relação à insensibilidade ao EDTA, mas é diferente em comparação com a inibição por pCMB 10 mM e ativação por composto SH.

CRUMP & MURRAY (1979) estudaram as mudanças na atividade de várias enzimas proteolíticas em Phaseolus vulgaris

L. Dois tipos de aminopeptidases denominadas AP 1 (fenantrolina-insensível) e AP 2 (fenantrolina-sensível) foram encontradas em sementes germinadas usando leucil- β -naftilamida como substrato. A atividade de AP 1 alcançou um valor máximo aos dois dias de germinação e depois decresceu. A AP 2 apresentou atividade máxima no quarto dia de germinação.

MIKOLA & KOLEHMAINEN (1972), concluíram que plântulas de cevada contêm oito peptidases diferentes com pH ótimo variando entre 4,8 e 8,6. Três entre essas são consideradas aminopeptidases e atuam sobre aminoacil- β -naftilamidas (pH ótimo na hidrólise de di e tripeptídeos varia entre 5,8 e 6,5). Duas das oito peptidases são caracterizadas por seus ótimos de pH relativamente alto, pH 7,8 e 8,6, para Ala-Gly e Leu-Try respectivamente. Essas peptidases estão presentes nos grãos de aleurona e escutelo, mas totalmente ausentes no endosperma.

Carboxipeptidases tendo propriedades enzimáticas semelhantes têm sido encontradas em várias plantas, incluindo: algodão (IHLE & DURE, 1972 a e b), arroz (DOI et. al., 1980 a e b) e cevada (MIKOLA, L., 1983) e em vários órgãos das plantas. A maioria dessas carboxipeptidases tem sido caracterizada por apresentar um pH ótimo em torno de 5 e 5,5 e inibição por diisopropilfluorofosfato (DFP).

A atividade carboxipeptidásica é em geral encontrada em níveis significantes em sementes não germinadas de legumes e aumentam durante a germinação.

Funções fisiológicas dessas enzimas têm sido estudadas em sementes germinantes, entretanto, nenhuma conclusão definitiva tem sido obtida.

DOI et. al. (1980 a e b) realizaram uma série de experimentos para elucidar a natureza e papel fisiológico de carboxipeptidases em arroz, especialmente em relação à mobilização das proteínas de reserva durante a germinação e o "turnover protéico" das células em crescimento. Eles concluíram que as sementes de arroz germinantes contêm três enzimas carboxipeptidásicas que hidrolisam o substrato, carbobenzoxi-

L-fenilalanil-alanina a diferentes valores de pH. As atividades foram máximas para as três CPA-ases em pH 4,5, 5 e 7. A enzima ativa a pH 5 foi parcialmente purificada em folhas de arroz e apresentou-se muito semelhante a outras carboxipeptidases de diferentes plantas.

Durante a germinação, o conteúdo de nitrogênio no endosperma das sementes de arroz diminuiu enquanto que nas partes da plântula em crescimento aumentava. A acumulação de aminoácidos livres no endosperma e plântula, acompanhado pela redução do conteúdo de nitrogênio, indicava a hidrólise das proteínas de reserva no endosperma seguido do transporte dos produtos para as partes em desenvolvimento da plântula. Métodos gasométricos foram empregados para a determinação dos conteúdos dos aminoácidos livres nos diferentes tecidos. As atividades exopeptidásicas observadas demonstraram que essas enzimas estavam hidrolisando proteínas de reserva.

As atividades carboxipeptidásicas presentes em sementes de cevada foram determinadas por MIKOLA, L. (1983), usando substratos específicos. A alta atividade em extratos de grãos de cevada germinantes em torno de pH 5, foram medidas pela atividade hidrolítica em oito dipeptídeos carbobenzoxi (Z-dipeptídeos e um Z-tripeptídeo). Os resultados indicam que todas as atividades foram devidas a cinco carboxipeptidases. Todas as cinco enzimas são inibidas por DFP e por pCMB. As cinco enzimas de cevada parecem-se em vários aspectos com três carboxipeptidases lisossômicas de tecidos de mamíferos.

IHLE & DURE (1972 a e b) isolaram uma carboxipeptidase de cotilédones de plântulas de algodão. A enzima foi capaz de hidrolisar vários substratos-ésteres, polipeptídeos e proteínas desnaturadas aparentemente a partir da extremidade C-terminal. A enzima foi inibida por diisopropilfluorofosfato (DFP).

Múltiplas formas de carboxipeptidases em plantas têm sido encontradas. É possível que as diferentes formas das enzimas sejam isoenzimas, mas alguma heterogeneidade pode ser devida a modificações proteolíticas ou desaminação de aspara

gina e glutamina. Algumas dessas enzimas dissociam-se em fragmentos ou subunidades durante eletroforese em gel de poli-acrilamida com SDS na presença de agentes redutores. É possível que subunidades distintas estejam presentes ou que algumas enzimas possam ser clivadas por enzimas proteolíticas durante a purificação (RYAN & WALKER-SIMMONS, 1981).

Como se pode observar pelos trabalhos realizados, uma melhor caracterização da especificidade enzimática durante a germinação e um melhor conhecimento sobre as proteínas de reserva das sementes é de interesse para podermos atingir uma melhor compreensão do processo germinativo como um todo. Existem dúvidas se as mesmas enzimas ou enzimas semelhantes ocorrem em sementes diferentes. Estudos comparativos têm sido realizados com monocotiledôneas e dicotiledôneas. Vários resultados desses estudos indicam que grupos correspondentes de peptidases ocorrem nessas plantas, mas sua relativa importância na mobilização das proteínas de reserva durante a germinação parece ser diferente (MIKOLA, 1983).

Por causa da importância econômica das leguminosas, muitos trabalhos sobre a bioquímica das proteínas de reserva em suas sementes quiescentes e germinantes têm sido estimulados.

Justificativa e Objetivo

Uma das causas apontadas como responsáveis pela baixa produtividade da pecuária brasileira, especialmente do Nordeste, é a escassez de forragem de boa qualidade. Atualmente a cunhã (Clitoria ternatea L.) vem sendo introduzida no Ceará como forrageira e vem se mostrando bem adaptada às condições ecológicas da região. A planta apresenta caules finos, elevada massa foliar adequando-se à produção de feno de ótima qualidade.

Renato BRAGA (1960) refere-se à cunhã como uma leguminosa tropical perene, originária da Ásia, segundo alguns

autores, ou da América do Sul, segundo outros. Ela ocorre do Amazonas até São Paulo, inclusive Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso.

Poucos estudos são encontrados com relação à parte aérea da planta (KATIYAR et. al., 1970; AZEVEDO, 1983) e não se encontra na literatura dados com relação às proteínas de sementes exceto os trabalhos de JOSHI et. al. (1981) e de AZEVEDO (1983). Dizem os autores que as folhas apresentam em média 26% de proteína bruta.

Um melhor conhecimento das proteínas de sementes de cunhã poderia possibilitar o emprego das mesmas, separadamente das folhas, como complementação na alimentação animal. Por outro lado, o conhecimento das propriedades das proteínas vegetais é essencial a qualquer estudo de melhoramento genético visando o aproveitamento biotecnológico de plantas.

O presente trabalho tem por objetivo determinar algumas características das proteínas presentes em sementes quiescentes de cunhã (Clitoria ternatea L.), bem como verificar a variação do teor de proteínas durante a germinação. Como as enzimas proteolíticas são consideradas importantes na mobilização das proteínas de reserva da semente, foram feitas determinações das atividades enzimáticas durante a germinação. Esperamos dessa maneira contribuir com dados que sirvam de base para estudos posteriores relacionados com a mobilização de proteínas de cunhã.

2 - MATERIAIS

2.1 - Material Vegetal

No presente trabalho foram usadas sementes de cunhã (Clitoria ternatea L.) doadas pelo Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

2.2 - Reagentes

Os reagentes a seguir relacionados foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA: azocaseína, albumina sérica bovina, N,N'-metileno bisacrilamida, CBZ-fenilalanil-alanina, Coomassie brilliant blue G-250 e R, ditiotreitól, dodecil sulfato de sódio, N,N,N'-tetrametiletilenodiamina, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico e BAPA.

Acrilamida foi adquirida de Inlab, São Paulo, Brasil.
Dimetilsulfóxido obtido de Carlo Erba.

β -mercaptoetanol e L-leucina-p-nitroanilida foram obtidos de E. Merck, Darmstadt, Alemanha

Sephadex G-25 e Sephadex G-100 de Pharmacia, Uppsala Suécia.

3 - MÉTODOS

3.1 - Preparação de Farinha de Sementes Quiescentes

Sementes quiescentes de cunhã, após remoção do tegumento foram trituradas em moinho de café elétrico, tratadas com hexana para remoção dos lipídios e colocadas para secar a temperatura ambiente (ca. 26°C). A farinha assim obtida foi estocada em refrigerador (ca. 8°C) e usadas para todas as experiências.

3.2 - Curva de Solubilização de Proteína em Função do pH

Farinha de sementes quiescentes foi usada para verificar a solubilização de proteínas em função do pH do meio de extração. A porções de 1g de farinha foram adicionados 10ml de água e às suspensões foi adicionado HCl ou NaOH, de modo a ajustar o pH no intervalo de 2,0 a 10,0. Após duas horas de contato, a 8°C, com agitação ocasional as suspensões foram centrifugadas (9.200 xg, 30min, 4°C) e os sobrenadantes, filtrados em lã de vidro, foram usados para determinação de proteína pelo método de BRADFORD (1976). A seguir os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada, liofilizados e usados para determinação de proteína e eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970), em presença de SDS e β -mercaptoetanol.

3.3 - Condições de Germinação

Sementes quiescentes de Clitoria ternatea L, foram tratadas por trinta minutos com ácido sulfúrico concentrado e lavadas com água corrente por 20 minutos, antes de serem colocadas para germinar.

A germinação foi feita em papel (mata borrão filtro 80g/m²) previamente esterilizado em autoclave. As sementes foram colocadas entre folhas de papel (30x30cm), umedecidas com água destilada e enroladas. Os rolos, encerrando 15 sementes cada, foram colocados em bequer de 1000ml contendo 80ml de água destilada. Os bequeres, contendo 4 rolos cada, foram colocados em uma câmara úmida mantida no escuro e à temperatura ambiente (ca. 26°C).

Cotilédones e eixos foram coletados após 3, 6, 9, 12 e 15 dias de germinação. Uma parte do material foi usada para determinação de peso fresco, peso seco e proteína total pelo método de Kjeldahl (HILLER et. al., 1948). A outra parte foi colocada em saco plástico, liofilizada, triturada em almofariz e estocada em congelador, para posterior preparação dos extratos e determinação das atividades enzimáticas.

3.4 - Composição Mínima

3.4.1 - Determinação de Umidade

As determinações de umidade foram feitas em estufa a 110°C por 24 horas. O cálculo de peso seco foi estimado pela perda de peso nas condições referidas e expresso em porcentagem.

3.4.2 - Determinação de Cinzas

A determinação de cinzas foi feita pela combustão direta (TRIEBOLD, 1946). Este método consiste na oxidação de toda a matéria orgânica, presente na amostra, por incineração e determinação das cinzas resultantes.

A amostra (2g), colocada em um cadinho de porcelana, foi transferida para uma mufla deixando-se a temperatura atingir 550-600°C. O aquecimento foi mantido até as cinzas apresentarem uma coloração cinza-esbranquiçada e atingirem peso constante. A amostra foi resfriada em dessecador e pesada.

O teor de cinzas foi expresso em percentagem e em termo de peso seco.

3.4.3 - Determinação de Lipídios Totais

Os lipídios totais foram determinados por extração intermitente com hexana em extrator de Soxhlet (TRIEBOLD, 1946).

3.5 - Determinação de Proteína

As dosagens de proteína foram feitas pelo método de Kjeldahl (HILLER et. al., 1948) quando do uso do material só lido e pelo método de BRADFORD (1976) quando se tratava de material em solução.

3.5.1 - Método de Kjeldahl

Por esse método foi determinado o teor de nitrogênio total e usado o fator 6,25 para cálculo da proteína total de farinha, cotilédones e eixos de sementes quiescentes e germinantes. A mineralização foi feita em presença de H_2SO_4 concentrado (3ml) e solução a 10% de $HgSO_4$ (0,5ml) como catalizador. A seguir as amostras foram usadas para destilação, após adição sucessiva de zinco em pó (ca. 200mg), NaOH 50% (12ml) e tiosulfato de sódio 20% (2ml). O destilado foi recebido em 10ml de ácido bórico a 2% e titulado com HCl 0,01N em presença de indicador misto (encerrando 0,4g de vermelho de metila e 0,2g de verde de bromocresol em 100ml de etanol). O nitrogênio total foi expresso em termos de peso seco.

Em geral foram usadas porções de 50 a 100mg do material para mineralização e as amostras mineralizadas foram diluídas com água (50 a 100ml) para destilação de alíquotas convenientes (5ml).

3.5.2 - Método de BRADFORD (1976)

Este método utiliza a propriedade apresentada pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250 de se ligar a proteínas, causando em meio ácido uma mudança de absorção máxima do corante de 495 para 595 nm. A reação apresenta a vantagem de ser rápida, de não estar sujeita a interferência de compostos que geralmente afetam outros métodos usados para determinação de proteína e de ser sensível a pequenas quantidades de proteína (5 a 100 μ g).

No presente trabalho foram usadas alíquotas de 100 μ l, encerrando de 5 a 45 μ g de proteína, às quais foi adicionado 5ml do reagente de Bradford que contém por 1000ml de volume final: 148,86mg de Coomassie a 70%, 50ml de álcool etílico a 95%,

10ml de ácido fosfórico a 85% (p/v) e água destilada q.s.p. 1000ml.

Após 10 minutos a absorvância em 595 nm foi medida contra uma prova em branco sem proteína. A concentração de proteína foi estimada com relação a uma curva padrão de albumina sérica bovina. Nas condições descritas, 5µg de proteína apresenta uma absorvância de ca. 0,070 e a curva se apresenta linear até 45µg de proteína.

3.6 - Preparação dos Extratos

3.6.1 - Extração em pH 7,6

Farinha de sementes quiescentes, cotilédones e eixos de sementes quiescentes e germinantes liofilizados foram usados para extração de proteína com tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,02 M, pH 7,6 na proporção 1:10 (p/v) para cotilédones e 1:20 (p/v) para eixos. As amostras foram deixadas em contato com o tampão, com agitação ocasional, por 30min, à temperatura ambiente e a seguir centrifugadas (7500 xg, 30min, 4°C). Os sobrenadantes foram filtrados em lã de vidro e usados para determinação de proteína, determinação da atividade azocaseinásica, filtração em gel de Sephadex G-25 e posterior determinação das atividades LPA-ásica e BAPA-ásica.

3.6.2 - Extração em pH 5,0

Extrações em pH 5,0 foram feitas quando se teve por objetivo determinar a atividade carboxipeptidásica. Os extratos foram preparados como tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 com 1,0 mM DTT, mantidas as mesmas relações tecido:meio de extração e condições de centrifugação descritas para a extra

ção em pH 7,6. Os extratos foram a seguir submetidos a filtração em gel de Sephadex G-25, a fim de eliminar compostos de baixo peso molecular presentes no extrato, antes de serem usados para determinação da atividade carboxipeptidásica.

3.6.3 - Extração Seqüenciada com Água, NaCl e HCl

A extração seqüenciada foi feita usando-se 5g de farinha de sementes quiescentes para 100ml de água. A extração foi feita por 2h à temperatura de 8°C e após remoção do sobrenadante por centrifugação (9.200 xg, 30min, 4°C) o resíduo foi extraído com 100ml de NaCl 1,0 M. O resíduo da extração com NaCl foi extraído com HCl 0,1 N (100ml). Os sobrenadantes foram usados para determinação de proteína.

3.6.4 - Precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato preparado com farinha de sementes quiescentes em tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 90%. O precipitado foi redissolvido em tampão, dialisado contra água e liofilizado. A amostra liofilizada foi submetida a filtração em gel de Sephadex G-100 e os efluentes da cromatografia usados para determinação das atividades LPA-ásica e BAPA-ásica.

3.7 - Filtração em Gel de Sephadex

As cromatografias em gel de Sephadex G-25 foram feitas em colunas medindo 15x1,3cm. O suporte foi tratado conforme instruções do fabricante e as colunas foram equilibradas e eluídas com o mesmo tampão. Para obtenção do material

a ser usado na determinação das atividades BAPA-ásica e LPA-ásica foi empregado para eluição tampão fosfato $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ 0,02 M, pH 7,6. Para determinação da atividade carboxipeptidásica, as colunas foram equilibradas e eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 com 0,1 mM DTT. Todas as cromatografias foram feitas a temperatura ambiente (ca. 26°C), usando-se um fluxo de $30\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ e os efluentes coletados em frações de 3ml. O teor de proteína nos efluentes das colunas cromatográficas foi determinado pelo método de BRADFORD (1976). A eluição foi seguida pela medida de absorbância em 280 nm.

As cromatografias em Sephadex G-100 foram feitas em colunas medindo (15x1,3cm), equilibradas e eluídas com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6. As massas moleculares foram calculadas segundo DETERMANN & MICHEL (1966).

3.8 - Determinação das Atividades Enzimáticas

3.8.1 - Atividade Azocaseinásica

Como substrato foi usada uma solução de azocaseína 1% em tampão fosfato $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ 0,02 M pH 6,0. A azocaseína (1g) foi dissolvida no tampão (100ml) e aquecida até a ebulição por 15min. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, o volume foi levado para 100ml com água, podendo ser armazenado em congelador (ca. -20°C) até 8 dias.

O ensaio foi feito utilizando-se alíquotas (1,0ml) dos extratos em pH 7,6, como fonte de enzima, incubados com 2,0ml de azocaseína 1%, em pH 6,0, por 30min, a 50°C. A reação foi parada pela adição de 1,0ml de TCA 10% e após 15min de repouso foi filtrada em papel de filtro quantitativo.

Foram sempre usadas amostras controle, nas quais a adição de TCA foi feita antes da adição do substrato à amostra. Alíquotas de 1,0ml do filtrado foram alcalinizadas pela adição de 1,0ml de NaOH 2 N e a atividade foi estimada pela

absorbância em 440 nm.

Uma unidade de atividade (U.A.), para efeito de cálculo, foi definida como a quantidade de enzima por mililitro de extrato, capaz de produzir uma absorbância de 0,100 em 440 nm nas condições de ensaio descritas.

3.8.2 - Atividade BAPA-ásica

A atividade BAPA-ásica foi determinada usando-se como substrato α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA), de acordo com ERLANGER *et. al.* (1961). O método está fundamentado na produção, por hidrólise, de p-nitroanilina que é amarela e pode ser estimada colorimetricamente em 410 nm.

As soluções de substrato (5×10^{-4} M) foram preparadas dissolvendo-se 21,74mg de BAPA em 1,0ml de dimetilsulfóxido a 40°C e completando-se o volume para 100ml com tampão fosfato pH 7,6.

Os ensaios foram feitos usando-se alíquotas apropriadamente diluídas dos efluentes obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25, pH 7,6 dos extratos obtidos em pH 7,6, como fonte de enzima.

O meio de reação encerrava 0,5ml de efluente e 2,5ml de BAPA 5×10^{-4} M, pH 7,6. A incubação foi feita por 15min a 40°C e a reação parada pela adição de 1,0ml de ácido acético 30%.

A avaliação da atividade foi feita pela absorbância em 410 nm e para efeito de cálculo foi usado o coeficiente de extinção molar $E_{410 \text{ nm}} = 8800 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ERLANGER *et. al.*, 1961).

Foram feitos ensaios controle nos quais a adição de ácido acético foi feita antes da adição do substrato.

3.8.3 - Atividade LPA-ásica

A atividade LPA-ásica foi determinada segundo ERLANGER *et. al.* (1961) usando-se como substrato L-leucina-p-nitroanilidálica (LPA) $2,5 \times 10^{-4}$ M na concentração final no meio de reação, em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0. As soluções estoque 5×10^{-4} M foram preparadas dissolvendo-se o substrato (12,56 mg) em dimetilsulfóxido (1,0ml) a 40°C e completando-se o volume (100ml) com tampão previamente aquecido. As soluções podem ser armazenadas no congelador por uma semana sem apresentar alterações e diluídas convenientemente na hora do ensaio. O meio de reação encerrava 0,5ml de efluente e 2,5ml de LPA $3,0 \times 10^{-4}$ M, pH 7,0. A incubação foi feita por 15min a 40°C e a reação parada pela adição de 1,0ml de ácido acético a 30%.

A medida de atividade foi feita nas mesmas condições descritas para os ensaios de BAPA.

3.8.4 - Atividade Carboxipeptidásica

A atividade carboxipeptidásica foi determinada seguindo-se o método descrito por MIKOLA & KOLEHMAINEN (1972), usando-se como substrato marcador carbobenzoil-fenilalanilalanina. O método está baseado na liberação do aminoácido C-terminal seguida pela reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Como fontes de enzimas foram usadas alíquotas dos efluentes obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25 (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 com 0,1 mM DTT) dos extratos preparados em pH 5,0.

O substrato foi preparado dissolvendo-se previamente CBZ-Phe-Ala (14,8mg em 0,4ml de NaOH 0,1 N e complementando-se o volume para 100ml com água) de modo a se obter uma concentração de 4 mM.

O ensaio foi feito incubando-se 500µl de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,2 contendo 1 mM EDTA e 100µl dos

efluentes das colunas de Sephadex G-25 em banho-maria por 100min a 30°C. A reação foi parada com 2ml de TNBS (3 volumes de tetraborato de sódio 5% (p/v) é adicionado a 1 volume de uma solução aquosa de TNBS a 2% (p/v) para uso imediato). A reação corada foi deixada no banho a 30°C por mais 60min e terminada pela adição de 1ml de ácido acético 1 M. As absorvâncias foram medidas em 340 nm contra uma prova em branco após 1h de acidificação.

A atividade foi calculada com referência a uma curva-padrão de alanina e expressa em μ moles de substrato hidrolisado por parte da planta (eixo ou par de cotilédone) por 100min nas condições descritas.

3.9 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS em presença de β -mercaptoetanol foram feitas segundo LAEMMLI (1970).

Amostras liofilizadas das frações obtidas por extração nos diferentes valores de pH foram suspensas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 1% de SDS e 1% de β -ME e aquecidas por 10min a 100°C. Depois de resfriadas, sacarose e azul de bromofenol foram adicionados às amostras e alíquotas de 40 μ l foram usadas. A eletroforese foi desenvolvida com corrente constante de 25 mA durante 4 horas.

As proteínas foram fixadas e coradas pela imersão do gel em uma solução contendo 400ml de metanol, 530ml de água destilada, 70ml de ácido acético e 0,67g de Coomassie Brilliant Blue R-250 (75%) por um período de ca. de 16 horas. Decorrido esse tempo, o gel é imerso em uma solução descorante contendo 350ml de metanol, 800ml de água e 100ml de ácido acético. Após sucessivas trocas da solução descorante o gel se apresenta com um fundo claro destacando-se as bandas correspondentes às diversas frações protéicas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes quiescentes de cunhã (Clitoria ternatea L.) apresentaram a composição mínima expressa em porcentagem, em termos de peso seco, mostrada na TABELA 2. Os valores encontrados para cinzas e umidade estão próximos daqueles obtidos por AZEVEDO (1983), que usou sementes da mesma origem daquelas por nós utilizadas, e bem mais altos do que os valores encontrados por JOSHI et. al. (1981). As sementes aqui empregadas apresentaram um teor mais elevado de proteína bruta (ca. 43%) e de lipídios totais.

As sementes quiescentes apresentando um peso fresco médio de 47,85mg, quando desprovidas de tegumento, tiveram o seu peso reduzido para 38,69mg, sendo este peso distribuído em cerca de 91% para um par de cotilédones e 9% para um eixo (TABELA 3).

O efeito do pH sobre a solubilização de proteínas foi estudado determinando-se a concentração de proteína extraída de farinha de sementes quiescentes, quando o pH do meio de extração variou de 2,0 a 10,0. Verificou-se que cerca de 27,4% da proteína presente na semente, determinada pelo método de Kjeldahl, é solubilizada em pH 2,0 (FIGURA 1); Observou-se um decréscimo de solubilização em valores de pH entre 3,0 e 5,0 seguido por acréscimo até pH 10,0. A curva de solubilização das proteínas de cunhã apresenta-se portanto semelhante à de Vigna sinensis (AINOUZ, 1970).

As amostras quando liofilizadas apresentaram diferentes teores de proteína, isto é, não há uma relação constante entre a massa de material liofilizado e a quantidade de proteína extraída. Isto pode ser explicado pelo fato de não se tratar de proteínas puras e sim de uma mistura de proteínas sobre as quais o reagente de Bradford age diferentemente (READ & NORHCOTE, 1981).

A FIGURA 2 mostra uma eletroforese em gel de polia

TABELA 2 - Composição mínima da semente de *Clitoria ternatea* L. comparada com outros valores encontrados na literatura.

	A	B	C
Umidade	10,74	1,75	9,81
Cinzas	4,18	3,75	3,86
Nitrogênio total (N_t)	6,97	-	-
Proteína bruta ($N_t \times 6,25$)	43,56	38,40	39,15
Lipídios totais	19,34	10,20	12,58
Glicídios totais*	32,92	-	-

* O teor de glicídios totais foi obtido por diferença.

A: dados do presente trabalho.

B: JOSHI, S.S. et. al. (1981)

C: AZEVEDO, A.R. (1983)

TABELA 3 - Peso fresco, peso seco e proteína total de sementes com e sem tegumento, cotilédones e eixos.

	Sementes com tegumento	Sementes sem tegumento	Cotilédones	Eixo
Peso fresco (mg)	47,85 ± 0,88	38,69 ± 1,0	35,78 ± 0,87	3,42 ± 0,17
Peso seco (mg)	43,14 ± 0,72	34,85 ± 0,83	31,86 ± 0,67	3,18 ± 0,14
Umidade (%)	9,85 ± 0,22	9,94 ± 0,24	11,44 ± 0,18	9,46 ± 0,84
Matéria seca (%)	90,15 ± 0,22	90,06 ± 0,24	88,56 ± 0,18	90,53 ± 0,84
Proteína (%)	43,56	57,04	46,94	42,38
$N_t \times 6,25$				

As médias correspondem a cinco determinações.

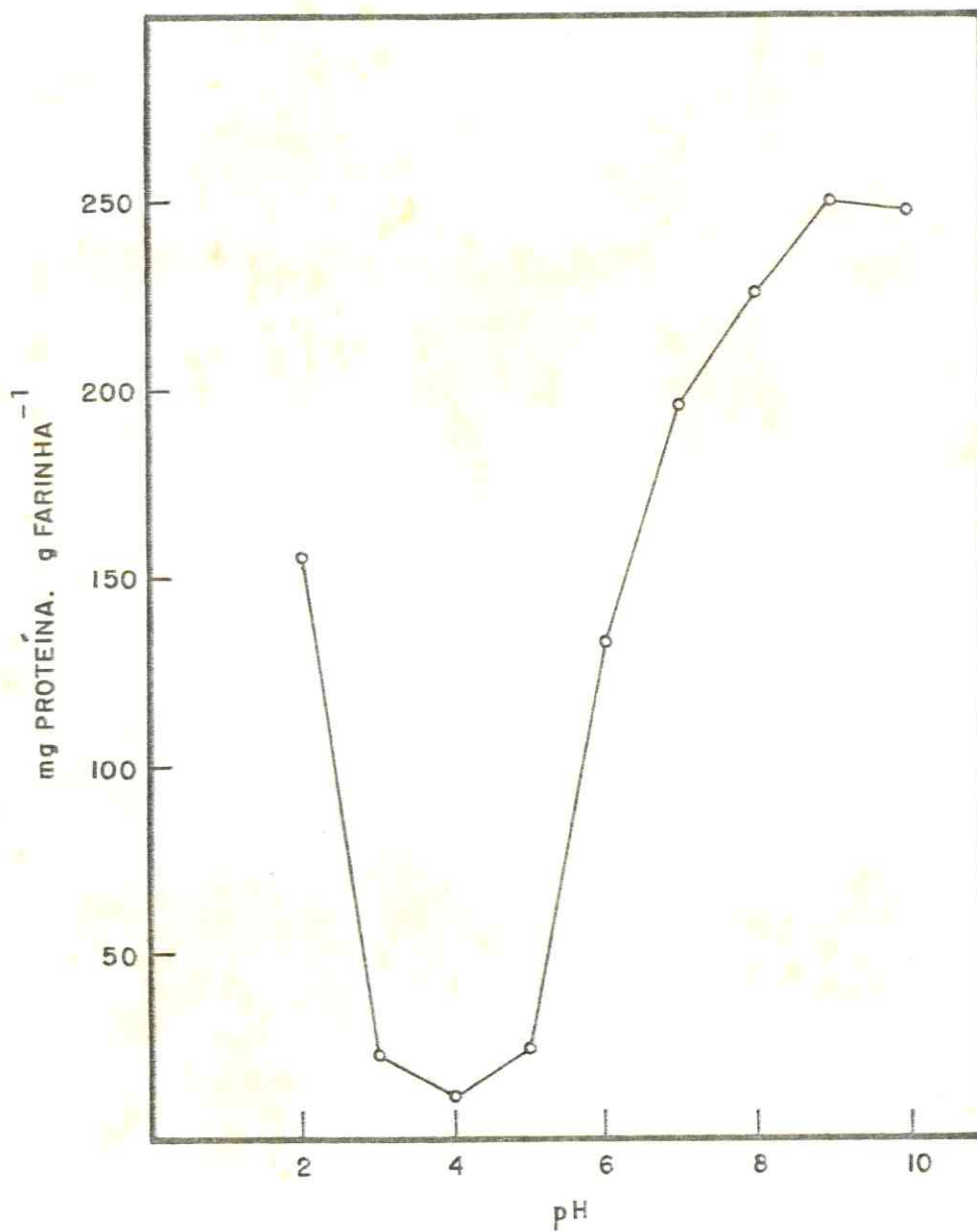


FIGURA 1 - Curva de solubilização de proteínas de sementes quiescentes em função do pH.

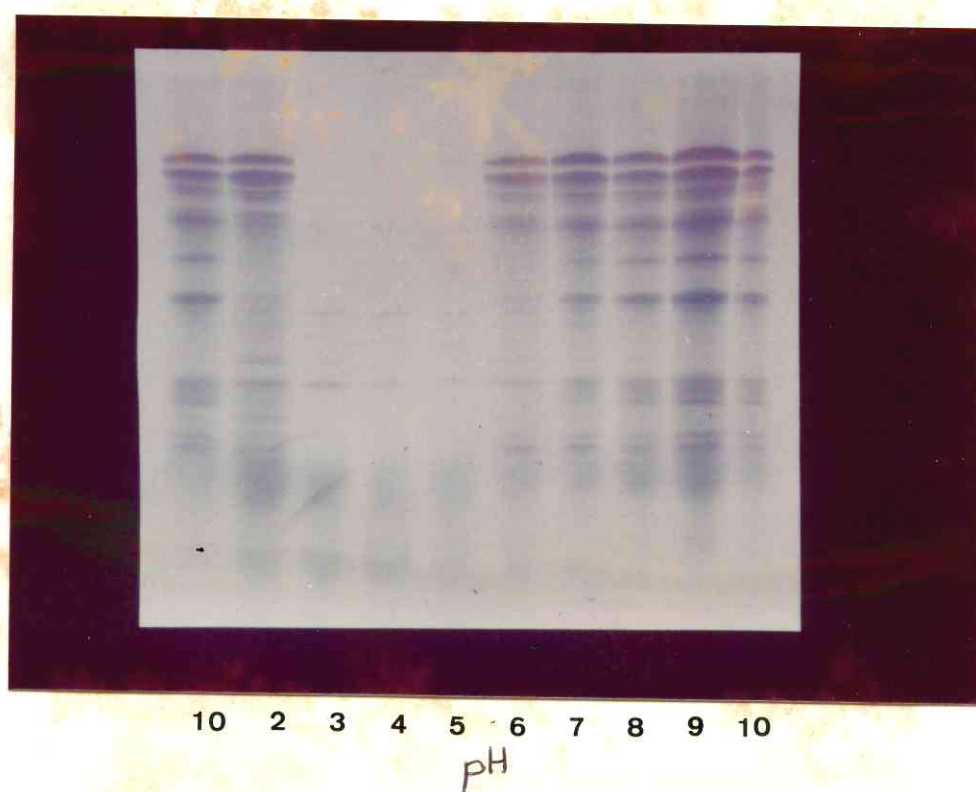


FIGURA 2 - Eletroforese em placa de gel de poli-
acrilamida das frações protéicas
solubilizadas em diferentes valo-
res de pH.

crilamida, em presença de SDS e β -mercaptoetanol, das diversas frações protéicas solubilizadas em diferentes valores de pH.

As proteínas de sementes quiescentes foram estudadas com relação à extração com água, seguida da extração com NaCl 1,0 M e HCl 0,1 N. Considerando-se que a semente sem tegumento encerra 57% de proteína bruta e por extração com água foi obtido 12,7% de proteína, podemos verificar que com água, NaCl e HCl foram extraídas 22,3, 12,3 e 5,3% respectivamente, da proteína total determinada pelo Kjeldahl (TABELA 4).

Após obtenção dos dados sobre sementes quiescentes foram estabelecidas as condições de germinação e tamanho das plântulas (FIGURA 3) a serem usadas para determinações de peso fresco, peso seco, proteína total, proteína extraída em pH 7,6 e 5,0 e atividades proteolíticas em cotilédones e eixos durante a germinação.

Embora a germinação seja considerada por alguns autores como consistindo daqueles processos que têm início com a absorção de água e que terminam com a emergência da radícula ou hipocótilo (BEWLEY & BLACK, 1978), no presente trabalho o termo germinação inclui todos os eventos subsequentes e associados ao desenvolvimento da planta até 15 dias após o plantio. Os resultados estão expressos por parte de planta, isto é, por par de cotilédones e eixo (compreendendo hipocótilo, epicótilo e radícula).

Os valores de peso fresco de cotilédones (FIGURA 4) até 15 dias de germinação foram determinados e os resultados mostram que houve um aumento gradativo de peso fresco até o final do período estudado. O aumento de peso fresco nos cotilédones corresponde a um aumento observado no tamanho do cotilédone, contrariando o que geralmente acontece com as demais sementes estudadas: Phaseolus aureus Roxb. (CHRISPEELS & BOULTER, 1975), Phaseolus mungo (MINAMIKAWA, 1979), Vigna unguiculata (PRISCO et. al., 1975), Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1984). O aumento de peso fresco tem sido explicado como sendo resultado da absorção de água pela semen-

TABELA 4 - Teor de proteína obtido por extração seqüenciada com água, NaCl e HCl.

	mg.ml ⁻¹	%*	mg.g ⁻¹	%**
Água	6,4	22,3	127,0	12,7
NaCl 1,0 M	5,2	12,3	69,5	7,0
HCl 0,1 N	1,6	5,3	31,0	3,0

*% - percentagem com relação à proteína total determinada pelo Kjeldahl;

**% - grama de proteína por 100 gramas de farinha.

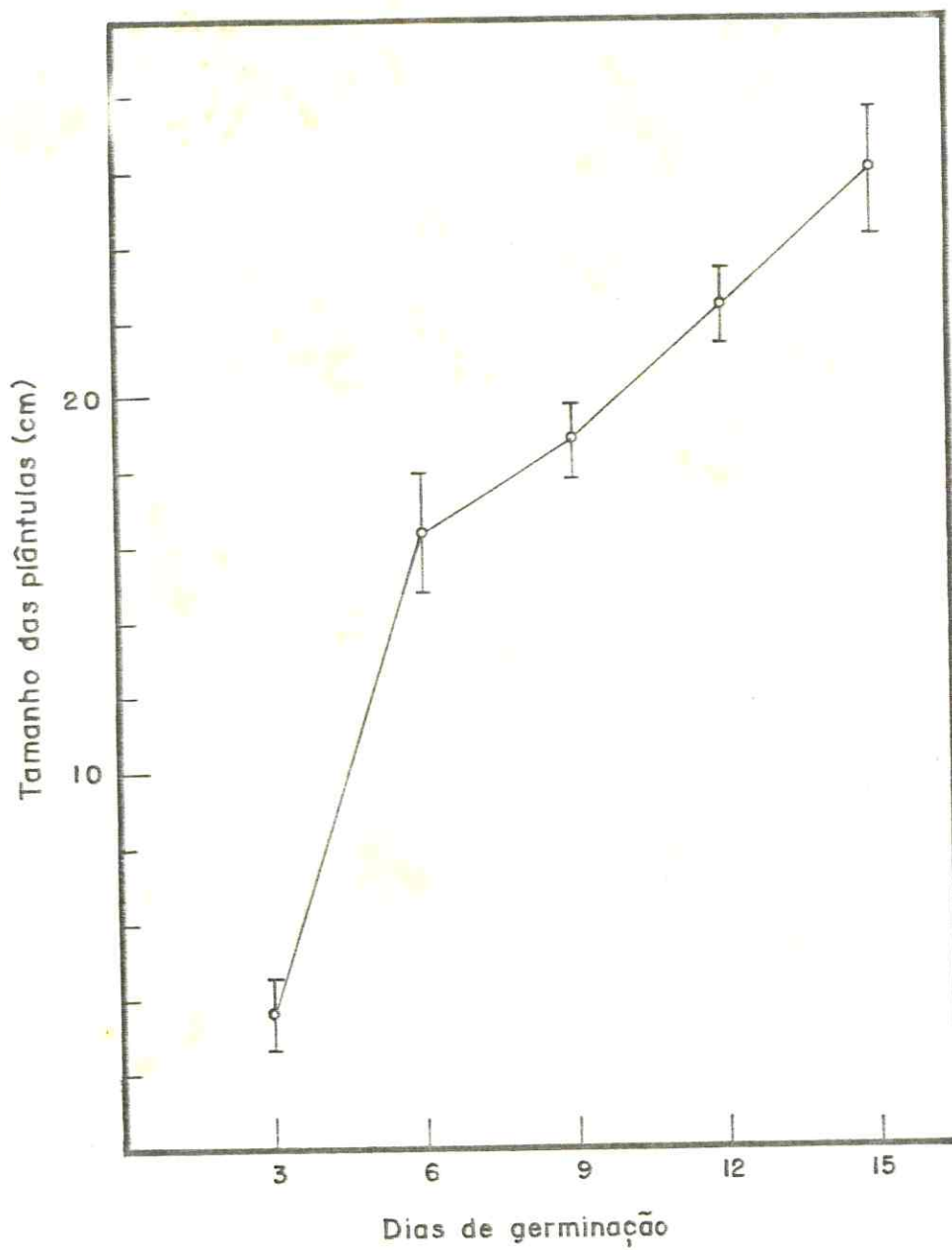


FIGURA 3 - Tamanho das plântulas durante a germinação.

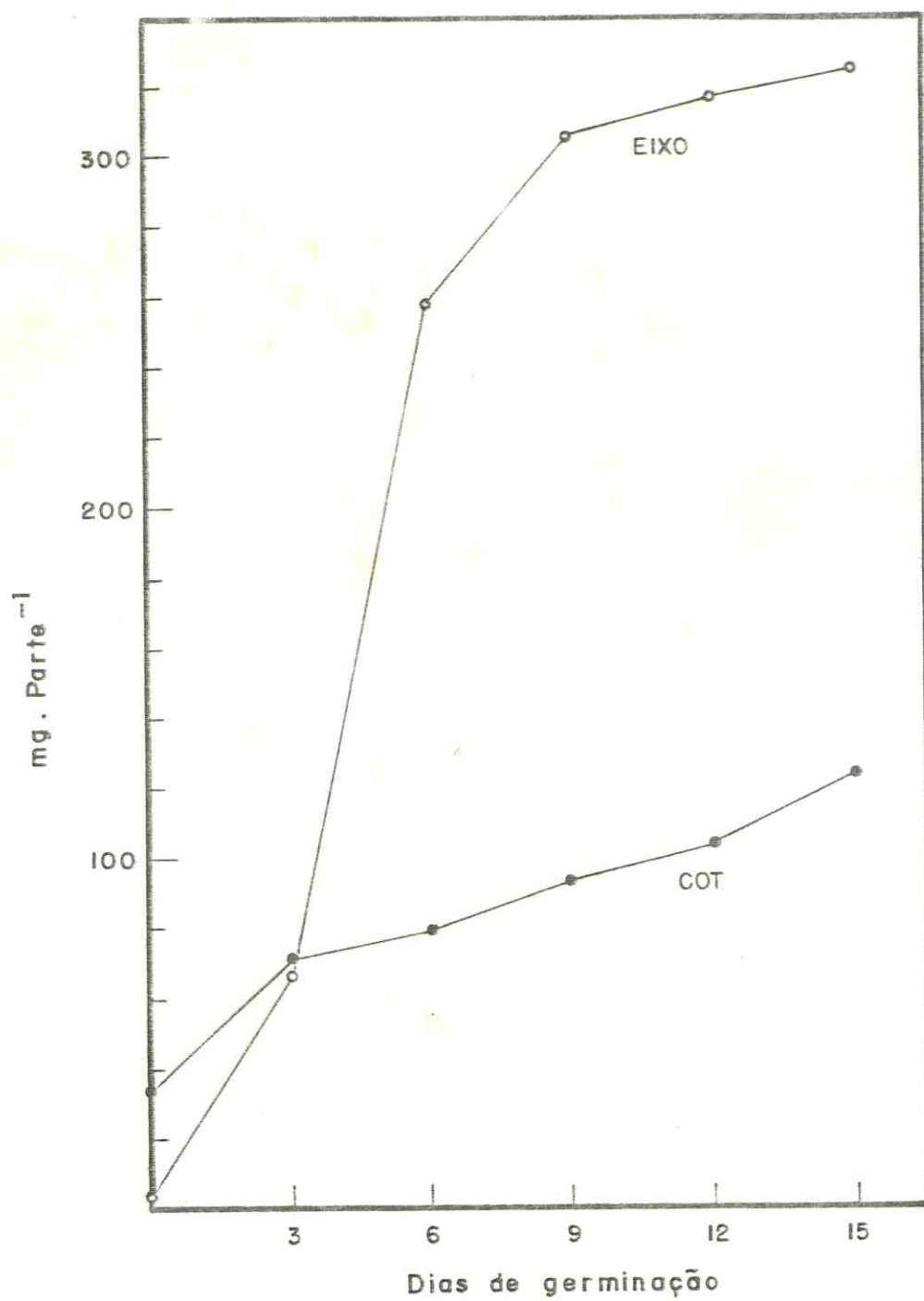


FIGURA 4 - Peso fresco de cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

te acompanhado pelo entumescimento dos corpos protéicos.

Quando foram determinados os pesos frescos dos eixos (FIGURA 4) observou-se inicialmente um maior acréscimo até o sexto dia e a partir de nove dias o peso fresco atinge um valor aproximadamente constante. Esse aumento rápido de peso fresco durante os primeiros dias tem sido relacionado com os eventos de crescimento e desenvolvimento do eixo na formação de novos tecidos necessários para a sustentação da própria plântula. COLLINS & WILSON (1972) referem-se à mais rápida absorção de água nos eixos do que nos cotilédones de Phaseolus vulgaris. Os resultados encontrados para o peso fresco dos eixos está em concordância com os autores citados no parágrafo anterior. Esse paralelismo foi também por nós encontrado (FIGURAS 3 e 4).

Verificou-se na determinação de peso seco de cotilédones um decréscimo contínuo até atingir 37% do peso inicial no 15º dia de germinação (FIGURA 5). O decréscimo observado no peso dos cotilédones sugere que as reservas cotiledonárias estão sendo transportadas para as zonas de crescimento, o que é comprovado pelo aumento dos valores de peso seco dos eixos. A redução do peso seco dos cotilédones está em concordância com outros dados encontrados na literatura (OOTA et. al., 1953; CRUMP & MURRAY, 1979; MOREIRA & CAVADA, 1984) e tem sido explicada como resultante da mobilização gradativa do material de reserva da semente para outras partes da plântula em desenvolvimento.

O peso seco dos eixos aumenta continuamente até o nono dia quando atinge cerca de cinco vezes o peso inicial (FIGURA 5). Verificamos que o decréscimo no peso seco dos cotilédones corresponde ao acréscimo de peso seco nos eixos.

O teor de proteína total dos cotilédones (expresso em termos de peso seco) sofre um ligeiro decréscimo a partir do terceiro dia enquanto nos eixos há um acréscimo (FIGURA 6). O decréscimo de proteínas nos cotilédones com o concomitante aumento nos eixos sugere que durante a germinação ocorre hidrólise das proteínas de reserva e que possivelmente

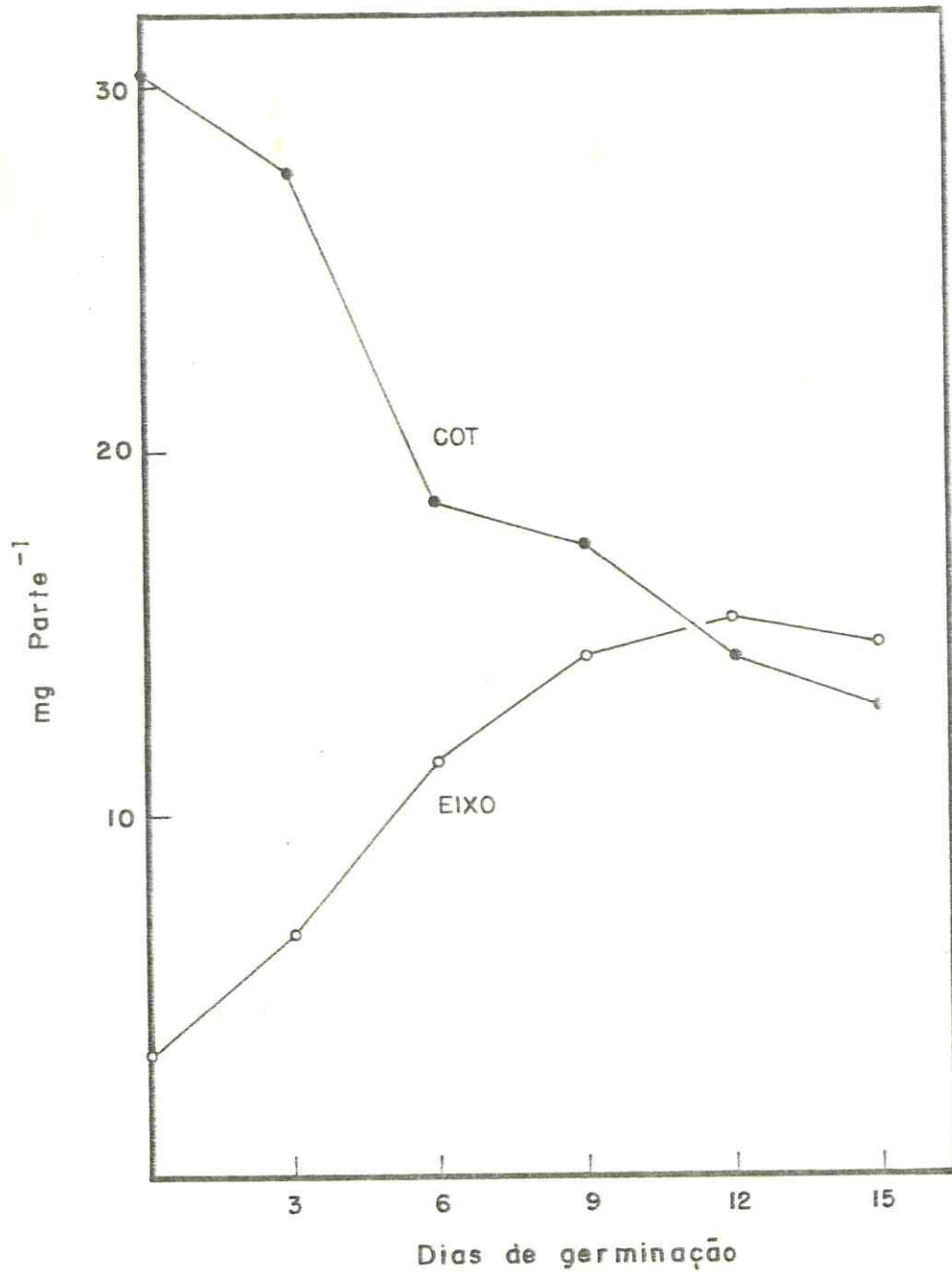


FIGURA 5 - Peso seco de cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

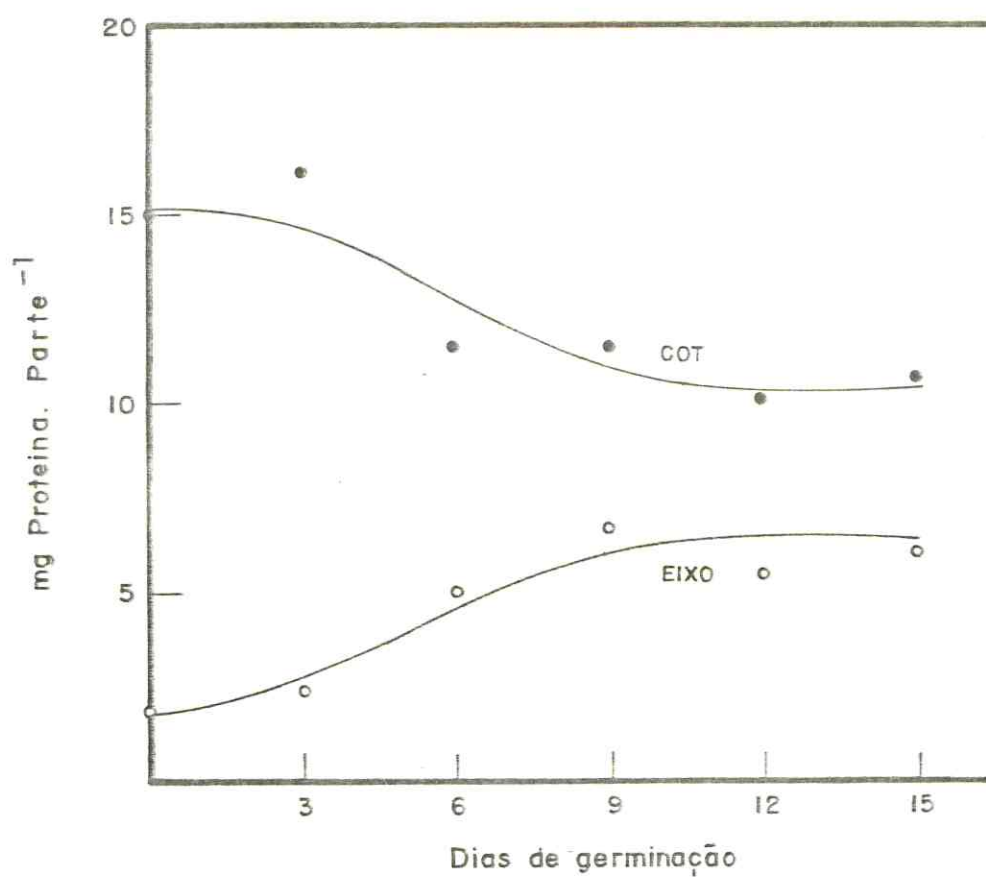


FIGURA 6 - Proteína total ($N_{total} \times 6,25$) em cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

seus produtos de hidrólise são translocados para o eixo em desenvolvimento, como tem sido sugerido para outras sementes (COLLINS & WILSON, 1972; BASHA & BEEVERS, 1975), muito embora os autores apresentem dados relativos à proteína extraída.

Quando o teor de proteína foi determinado nos extratos feitos com tampão fosfato 0,02 M pH 7,6 (FIGURA 7) verificou-se que em cotilédones a proteína extraída decresce rapidamente até o sexto dia e nos dias subseqüentes apresenta valores quase constantes. O teor de proteína extraída nos eixos praticamente não apresentou variação.

Quando as extrações foram feitas com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 observou-se em cotilédones um ligeiro aumento no terceiro dia de germinação com decréscimo nos dias seguintes. Nos eixos o teor de proteína extraída manteve-se constante (FIGURA 8).

Com base nesses dados, verifica-se que, em extratos preparados com cotilédones e eixos quiescentes e germinantes com tampão fosfato, embora haja maior quantidade de proteína extraída, o comportamento é semelhante em ambos os tampões com relação ao decréscimo de proteína extraída de cotilédones durante a germinação e nos níveis aproximadamente constantes de proteína extraída nos eixos até quinze dias de germinação.

Comparando-se os dados de extração com aqueles de proteína total (FIGURA 6) para os cotilédones podemos sugerir que as proteínas são mais solúveis, nos tampões usados nos primeiros dias de germinação. A proteína dos eixos apresenta mais baixa solubilidade nos tampões empregados.

Os extratos e os efluentes das cromatografias de cotilédones e eixos liofilizados de sementes quiescentes e germinantes de *Clitoria ternatea* L. foram capazes de hidrolisar os seguintes substratos, usados para determinação de atividade proteolítica: azocaseína (pH 6,0). L-leucina-p-nitroanilida (pH 7,0), α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (pH 7,6) e CBZ-fenilalanil-alanina (pH 5,2). As condições de pH empregadas para todos os substratos foram as mesmas usadas para

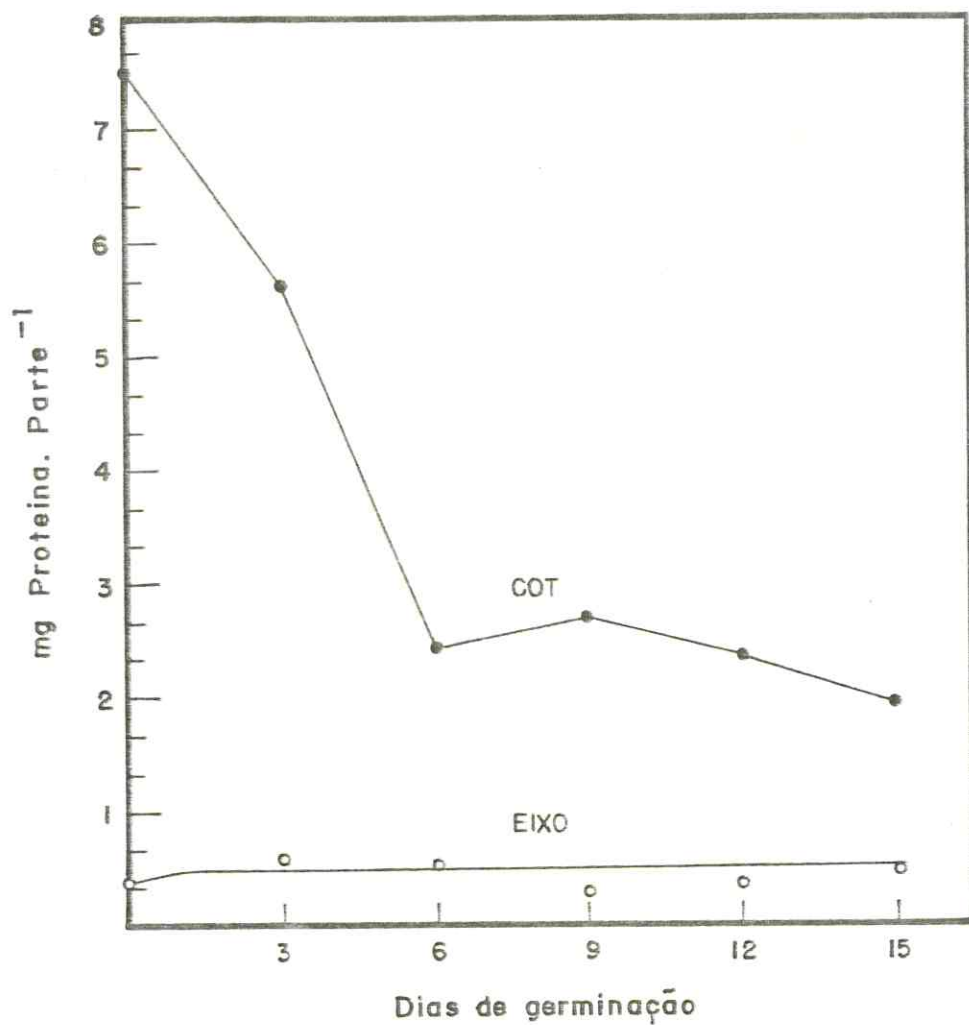


FIGURA 7 - Teor de proteína extraída a. pH 7,6 de cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

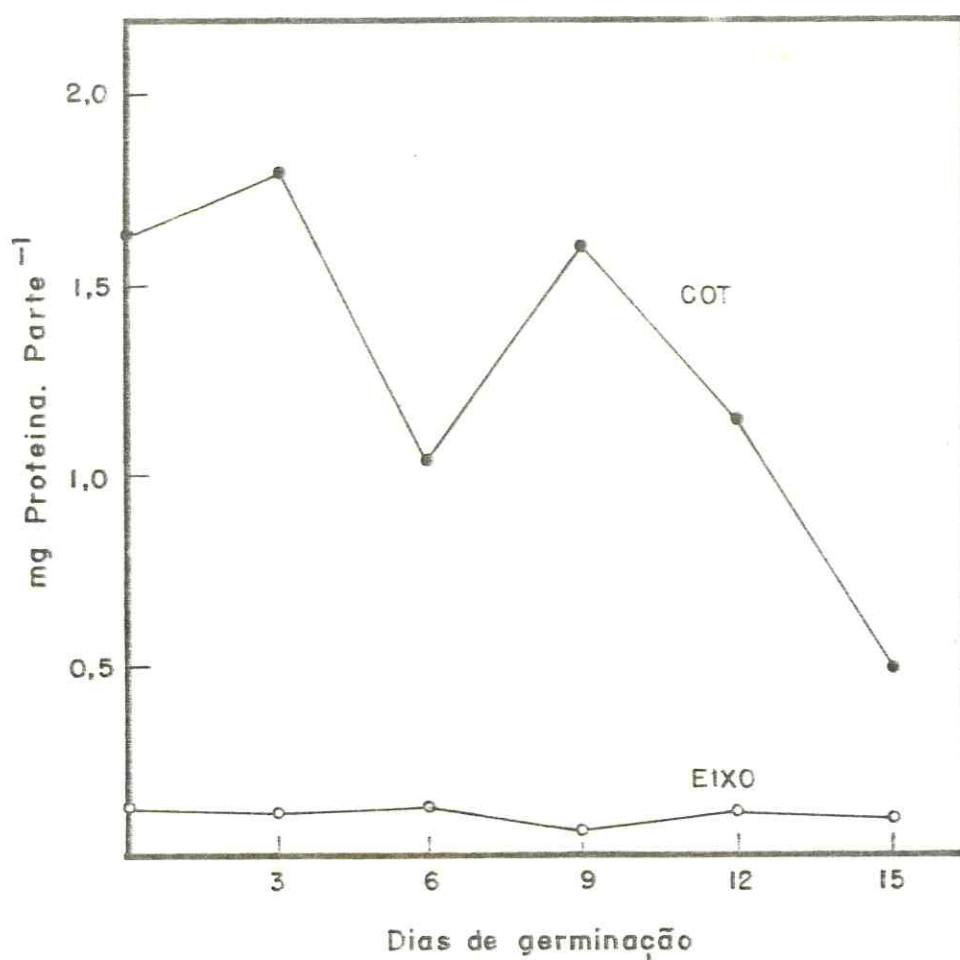


FIGURA 8 - Teor de proteína extraída a pH 5,0 de cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

Vigna unguiculata (L.) Walp (AINOUZ et. al., 1981) de modo que nos permitisse uma comparação com outra leguminosa já estudada.

Atividade azocaseinásica

Nos extratos brutos obtidos de cotilédones e eixos liofilizados de sementes quiescentes e germinantes foram feitas determinações de atividade usando-se azocaseína em pH 6,0. As mudanças observadas na atividade durante a germinação são mostradas na FIGURA 9. Essa atividade está presente em baixa concentração em cotilédones e eixos de sementes quiescentes. Durante a germinação observa-se um aumento de atividade nos cotilédones no terceiro dia em torno do dobro da apresentada por sementes quiescentes. Nos dias subseqüentes a atividade começa a decrescer rapidamente, sendo avaliada no 15º dia em torno de 14% do máximo da atividade alcançada. A atividade mostrou-se presente no eixo de sementes quiescentes e aumentou progressivamente até o nono dia de germinação, decrescendo até o 15º dia.

Os dados, quando relacionados com o teor de proteína total (Kjeldahl), mostram que a atividade decresce nos cotilédones quase que paralelamente com o decréscimo de proteína. Nos eixos a atividade é bem mais alta quando a proteína total é mais baixa, resultando em uma atividade específica mais alta.

GUERRA & NICOLÁS (1983) também observaram um aumento da atividade caseinolítica em cotilédones durante a germinação, alcançando um máximo de atividade no quinto dia, em sementes de lentilha, seguido de um decréscimo.

NIELSEN & LIENER (1984) usando azocaseína como substrato encontraram que a atividade azocaseinásica em cotilédones de Phaseolus vulgaris atinge um máximo com cinco dias de germinação e decresce progressivamente.

Considerando-se a atividade azocaseinásica como re-

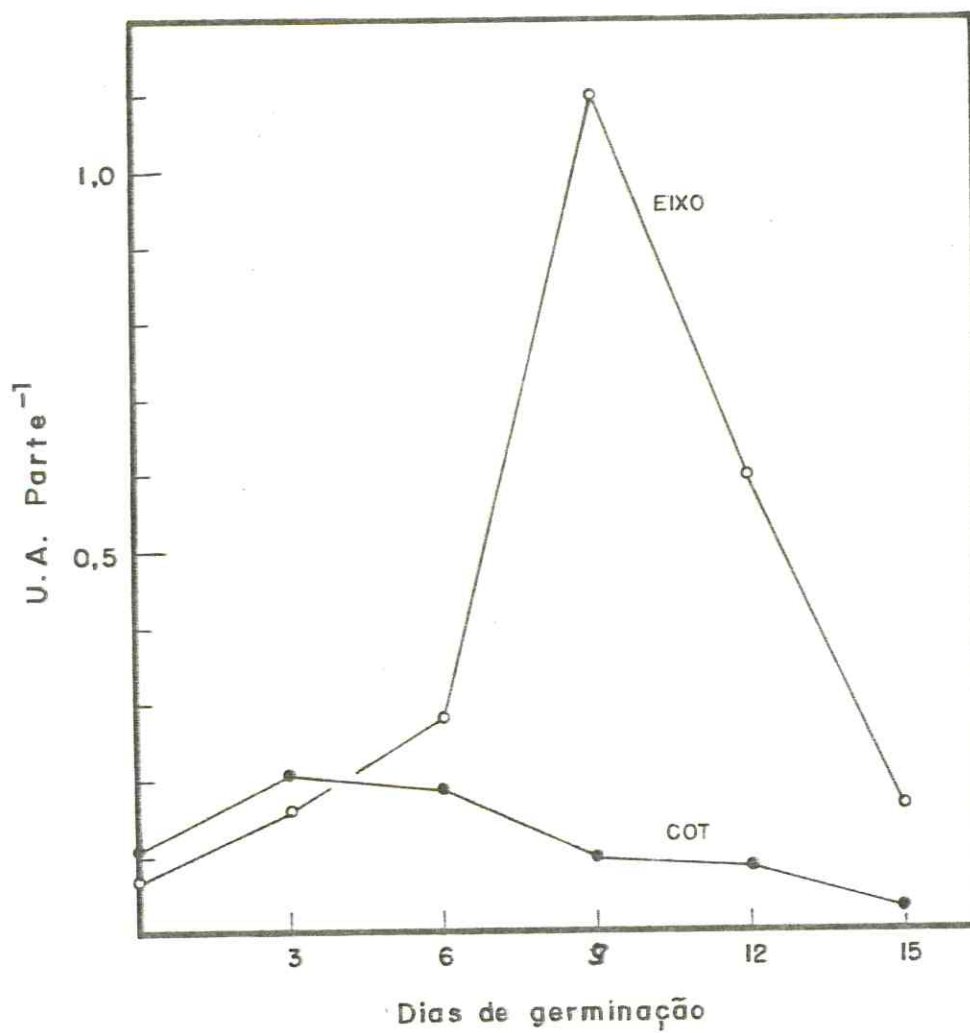


FIGURA 9 - Atividade azocaseinásica em cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

sultante da ação de endopeptidases, podemos dizer que tais enzimas são mais ativas nos eixos, ou na planta em desenvolvimento, do que nos cotilédones. Entretanto, o método de avaliação usando extratos brutos apresenta desvantagens e permanece aberta a questão de quantas enzimas contribuem para a hidrólise da azocaseína.

Atividade LPA-ásica

A atividade enzimática obtida quando do emprego de L-leucina-p-nitroanilida como substrato e, como fonte de enzima, o Pico I eluído de Sephadex G-25 após filtração do extrato obtido em pH 7,6 está apresentada na FIGURA 10.

Nos cotilédones a atividade aumenta até o nono dia, decresce no 12º dia, apresentando o mesmo valor no 15º dia de germinação. Nos eixos observa-se um ligeiro acréscimo do terceiro ao sexto dia, mantendo-se praticamente constante até o final da experiência.

Comparando-se os dados da FIGURA 10 com aqueles de proteína total (FIGURA 6) verifica-se que nos cotilédones a atividade LPA-ásica em pH 7,0 aumenta enquanto o teor de proteína decresce.

A atividade LPA-ásica aqui apresentada mostrou-se diferente nos cotilédones, quando comparamos com os dados de NOWAK & MIERZWINSKA (1977) em centeio, mas em relação aos de AINOZ et. al. (1981) para Vigna unguiculata (L.) Walp foram semelhantes. Entretanto, quando essa mesma atividade foi examinada com relação a ervilhas germinadas (BEEVERS & SPLITTSTOESSER, 1967), tanto para eixos como para cotilédones os nossos resultados foram bastante diferentes.

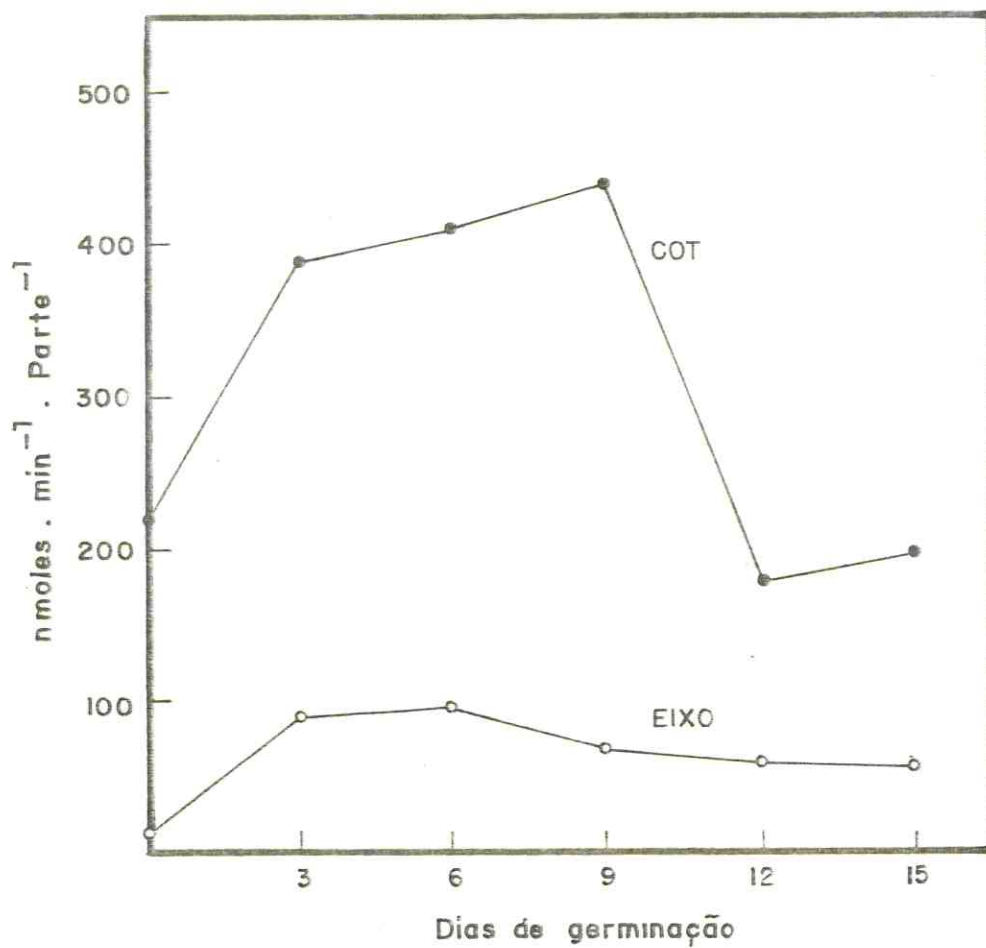


FIGURA 10 - Atividade LPA-ásica em cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

Atividade BAPA-ásica

A FIGURA 11 mostra os dados encontrados quando foram usados como substrato α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida e como fonte de enzima o Pico I eluído por filtração em gel de Sephadex G-25, dos extratos obtidos em pH 7,6.

Os cotilédones apresentaram atividade mais alta do que os eixos, aumentando progressivamente até o nono dia de germinação e decrescendo até o 15º dia, quando ainda apresenta atividade mais alta do que no dia zero. Os eixos apresentaram atividade mais baixa que sofre um ligeiro aumento no decorrer da germinação.

Os dados encontrados para a atividade BAPA-ásica em cotilédones de sementes de cunhã (Clitoria ternatea L.) até 15 dias de germinação estão semelhantes aos encontrados por CRUMP & MURRAY (1979), para Phaseolus vulgaris e próximos aos resultados obtidos por KLOTH & SPLITTSTOESSER (1983) para cotilédones e eixos de Cucurbita moschata. Entretanto, quando essa mesma atividade foi examinada em relação a cotilédones germinados de Vigna unguiculata (L.) Walp (AINOUZ et. al., 1981), os nossos resultados foram diferentes.

Embora sejam consideradas arilamidases, as enzimas que hidrolisam os derivados p-nitroanilida, em cunhã, a atividade LPA-ásica detectada em cotilédones e eixos é bem mais alta do que a atividade BAPA-ásica.

Atividade carboxipeptidásica

Extratos de cotilédones e eixos liofilizados preparados em pH 5,0 em presença de DTT, foram submetidos a filtração em gel de Sephadex G-25 e o Pico I foi usado como fonte de enzima. A filtração em gel tem por fim eliminar os compostos de baixo peso molecular que interferem na determinação da atividade com TNBS. A atividade carboxipeptidásica

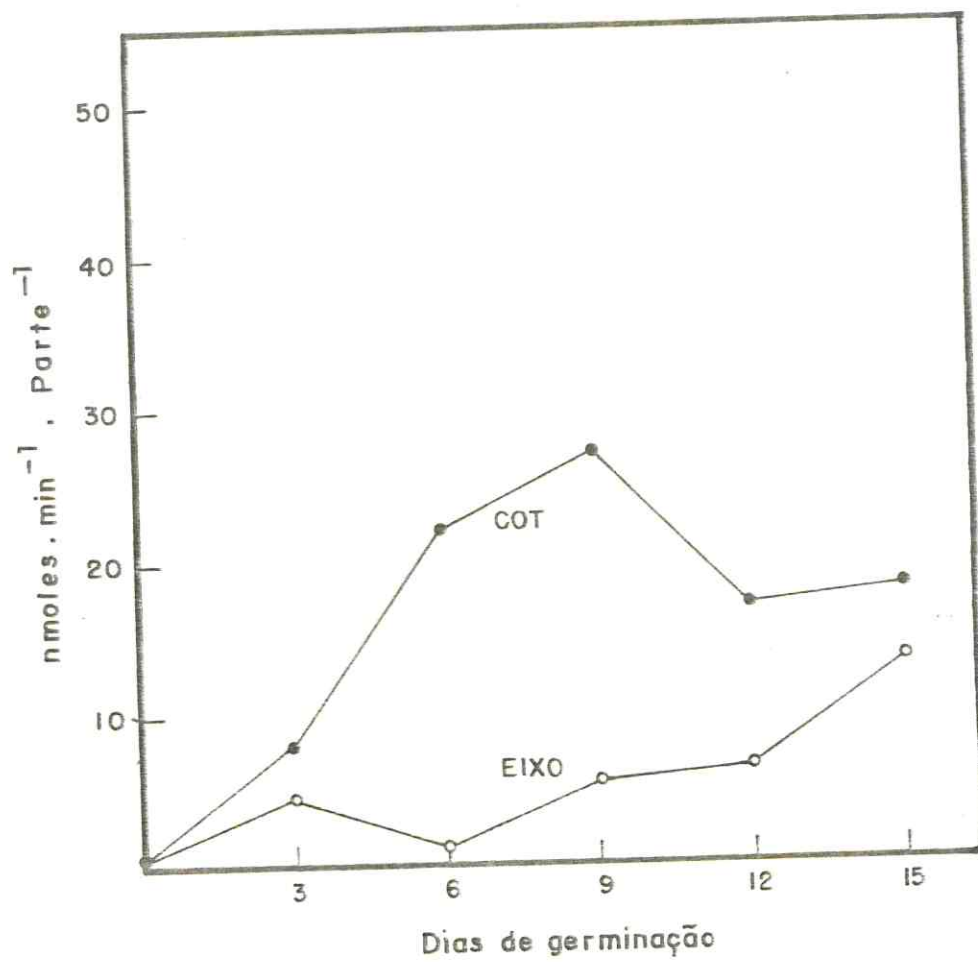


FIGURA 11 - Atividade BAPA-ásica em cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

foi avaliada pela medida da alanina resultante da hidrólise de CBZ-fenilalanil-alanina, considerado um substrato marcador para este grupo de enzimas em plantas.

A atividade carboxipeptidásica (FIGURA 12) aumenta tanto nos cotilédones como nos eixos até o nono dia de germinação, decresce no 12º dia, permanecendo no mesmo nível no 15º dia. Observa-se portanto uma variação paralela entre a atividade nos cotilédones e nos eixos.

Os resultados, quando analisados com relação ao trabalho de TULLY & BEEVERS (1978) apresentam um comportamento aproximado com relação a atividade carboxipeptidásica (CBZ-fenilalanil-alanina) nos eixos. Um comportamento semelhante foi encontrado para eixos e cotilédones quando comparamos os nossos resultados com aqueles obtidos para Vigna unguiculata (L.) Walp (AINOUZ & PONTE FREITAS, 1984) e para Phaseolus vulgaris (MIKKONEN, 1986). Entretanto, quando comparamos com os resultados de MIKOLA & KOLEHMAINEN (1972), em cevada germinante, verificamos que os nossos são diferentes tanto para cotilédones como para eixos.

Filtração em gel de Sephadex G-100

A proteína precipitada, com sulfato de amônio até 90% de saturação, a partir de extrato de farinha de sementes quiescentes em pH 7,6, foi submetida a filtração em gel de Sephadex G-100 (FIGURA 13). O teor de proteína mostra um pico mais alto seguido por um decréscimo, enquanto que por absorvância em 280 nm observa-se a presença de três picos. Os picos de mais baixas massas moleculares, observados em 280 nm, parecem ser devidos a pigmentos existentes no extrato.

Os efluentes da coluna foram testados para as atividades LPA-ásica (pH 7,0) e BAPA-ásica (pH 7,6) mostrando-se a primeira muito mais alta em sementes de cunhã, como acontece para outras sementes.

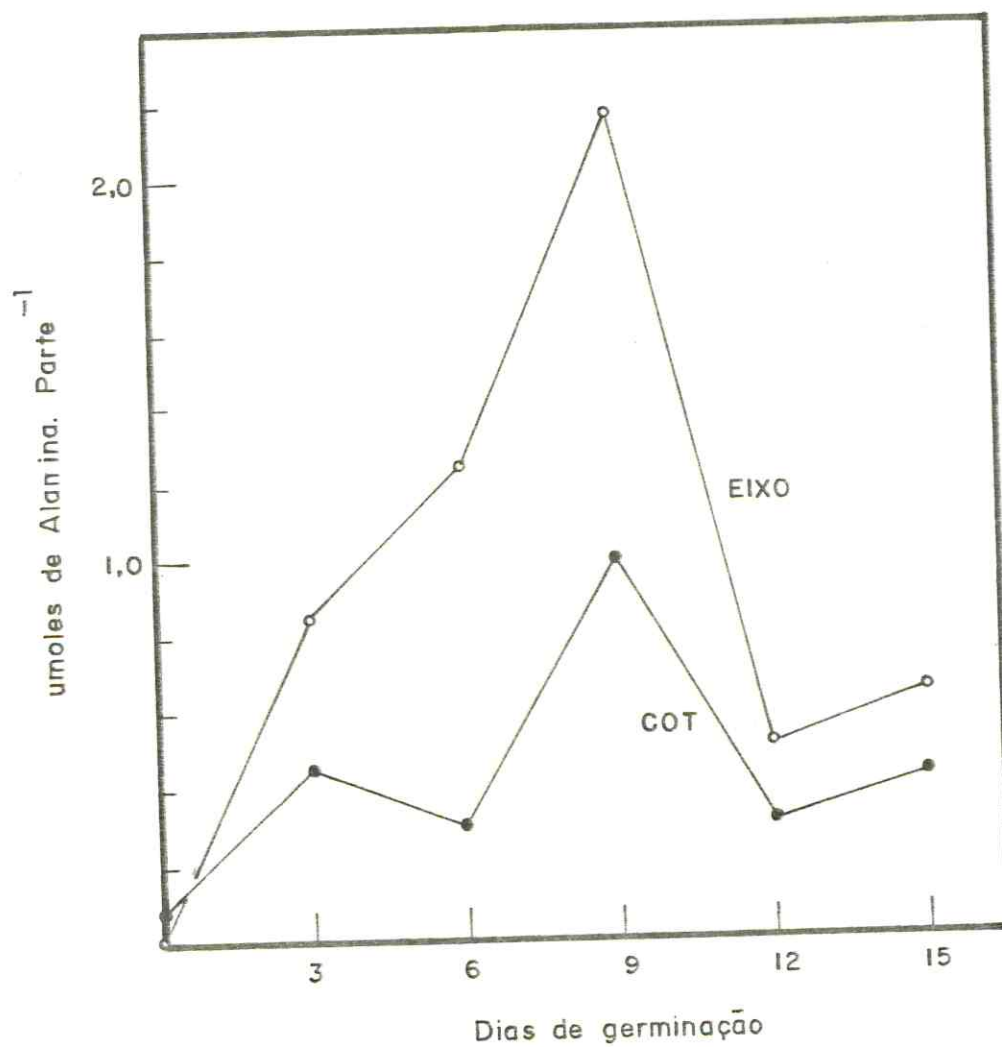


FIGURA 12 - Atividade carboxipeptidásica em cotilédones (●—●) e eixos (○—○) durante a germinação.

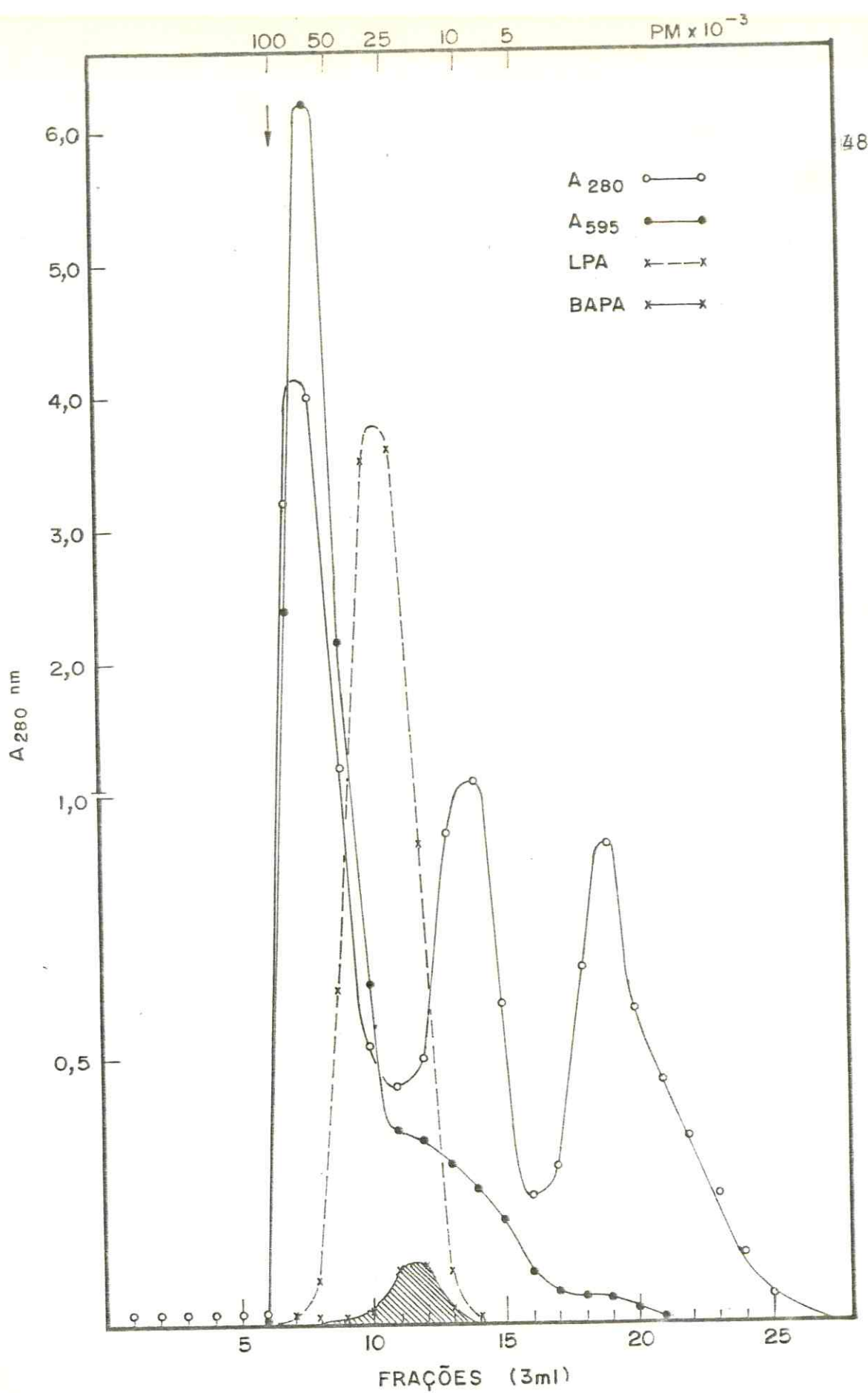


FIGURA 13 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração precipitada, do extrato de farinha de sementes quiescentes, com sulfato de amônio até 90% de saturação.

Aparentemente as atividades enzimáticas detectadas estão implicadas na mobilização das proteínas de reserva nos primeiros estágios da germinação. Devemos considerar que os substratos usados nos ensaios não são os mesmos que as enzimas utilizam in vivo e assim nós não podemos concluir que pa pel essas enzimas representam de fato nos primeiros estágios da germinação.

Observa-se na literatura uma grande dificuldade de comparação entre os dados referentes às atividades proteolíticas encontradas em diferentes plantas pelos diversos autores. Isto pode ser atribuído à utilização de diferentes metodologias na avaliação das atividades, metodologias essas até hoje consideradas impróprias. No nosso caso, quando comparamos os dados de Clitoria ternatea L. com os de Vigna unguiculata (L.) Walp verifica-se um deslocamento temporal dos máximos de atividade, que pode ser explicado pela diferença entre as fases de germinação das duas leguminosas.

5 - CONCLUSÕES

01. As sementes de cunhã (Clitoria ternatea L.) apresentam um alto teor de proteína (ca. 43%).
02. A curva de solubilização de proteínas, em função do pH do meio de extração, mostra que as proteínas são mais solúveis em pH 9,0.
03. No decorrer da germinação o teor de proteína total, determinado pelo método de Kjeldahl, decresce nos cotilédones a partir do terceiro dia, enquanto cresce nos eixos. As proteínas dos cotilédones se apresentam mais solúveis do que as proteínas dos eixos nos valores de pH 5,0 e 7,6.
04. A variação do peso seco dos cotilédones e eixos é semelhante à de qualquer semente, enquanto o peso dos cotilédones decresce o dos eixos aumenta até o 15º dia de germinação.
05. A variação de peso fresco mostra-se diferente da apresentada por algumas sementes, uma vez que o peso fresco dos cotilédones aumentou durante todo o período de germinação estudado.
06. Extratos de cotilédones e eixos de sementes quiescentes e germinantes são capazes de hidrolisar os seguintes substratos: azocaseína (pH 6,0), CBZ-fenilalanilalanina (pH 5,2), LPA (pH 7,0) e BAPA (pH 7,6).
07. A atividade azocaseinásica, considerada como indicação da presença de endopeptidases, é relativamente baixa nos cotilédones e bem mais alta nos eixos no nono dia de germinação.
08. A atividade carboxipeptidásica apresenta um máximo no nono dia de germinação tanto em cotilédones como nos eixos, sendo mais alta nos eixos.

09. As atividades LPA-ásica e BAPA-ásica, consideradas arilamidásicas, mostram-se mais altas nos cotilédones, apresentando um máximo no nono dia de germinação.
10. Os dados do presente trabalho sugerem que as atividades estudadas estão ligadas à mobilização de reserva protéica.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L. Preliminary studies of Vigna sinensis. An. Acad. Brasil. Ci, 42, 97-101 (1970).
- AINOUZ, I.L., BENEVIDES, N.M.B., and FREITAS, A.L.P. Proteolytic activities in seeds of Vigna unguiculata (L.) Walp cv. seridó. Biol. Plant. (Praha), 23(2), 133-140 (1981).
- AINOUZ, I.L. and PONTE FREITAS, A.L. Atividade carboxipeptídica durante a germinação de sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. seridó. II Reunião Regional do Nordeste, SBBq, Natal, RN. 1984.
- ASHTON, M.F. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol, 27, 95-117 (1976).
- ASHTON, F.M. and DAHMEN, W.J. Purification and characterization of a dipeptidase from Cucurbita maxima cotyledons. Phytochem., 7, 189-197 (1968).
- AZEVEDO, A.R. Estudio del valor nutritivo del heno de cunha (Clitoria ternatea L.) en cuatro periodos de recoleccion. Tese de doutorado. Madrid, Febrero. 1983.
- BASHA, S.M.M. and BEEVERS, L. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of Pisum sativum. Planta, 124, 77-87 (1975).
- BAUMGARTNER, B. and CHRISPEELS, M.J. Purification and characterization of vicilin-peptide-hydrolase the major endopeptidase in the cotyledons of mung bean seedlings. Eur. J. Biochem., 77, 223-233 (1977).
- BEEVERS, L. and SPLITTSTOESSER, W.E. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. J. Exp. Bot., 19, 698-711 (1968).
- BEWLEY, J.D. and BLACK, M. Physiology and Biochemistry of Seed in Relation to Germination. Vol. I. Springer-Verlag, New York. 1978.

- BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. Imprensa Oficial. Fortaleza, Ceará. 2ª ed. 1960.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976).
- CHRISPEELS, M.J. and BOULTER, D. Control of storage protein metabolism in cotyledons of germinating mung beans. Role of endopeptidase. Plant Physiol., 55, 1031-1077 (1975).
- COLLINS, D.M. and WILSON, A.T. Metabolism of the axis and cotyledons of Phaseolus vulgaris seeds during early germination. Phytochem, 11, 1931-1935 (1972).
- CRUMP, J.A. and MURRAY, D.R. Proteolysis in cotyledon cells of Phaseolus vulgaris. Changes in multiple hydrolase activities following germination. Aust. J. Plant Physiol., 6, 467-474 (1979).
- DALLING, M.J. Ed. Plant Proteolytic Enzymes. Vols. I e II. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 1986.
- 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).
- DOI, E., KOMORI, N., MATOBA, T., and MORITA, Y. Some properties of carboxypeptidases in germinating rice seeds and rice leaves. Agric. Biol. Chem., 44(1), 77-83 (1980a).
- DOI, E., KOMORI, N., MATOBA, T., and MORITA, Y. Purification and some properties of a carboxypeptidase in rice brain. Agric. Biol. Chem., 44 (1), 85-92 (1980b).
- DOI, E. SHIBATA, D., MATOBA, T., and YONEZAWA, D. Evidence for a presence of two types of acid proteinases in germinating seeds of rice. Agric. Biol. Chem., 44 (2), 435-436 (1980c).
- DOI, E., SHIBATA, D., MATOBA, T., and YONEZAWA, D. Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. Agric. Biol. Chem., 44 (4), 741-747 (1980d).

- ELLEMAN, T.C. Aminopeptidases of peas. Biochem. J., 141, 113-118 (1974).
- ERLANGER, B.F., NICHOLAS, K., and WILLIAMS, C. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271-278 (1961).
- GUERRA, H. and NICHOLAS, G. Changes in nitrogen fractions and proteolytic activities in the cotyledons of germinating lentils. Rev. Esp. Fisiol., 39, 277-283 (1983).
- HARVEY, B.M.R. and OAKS, A. Characteristics of an acid protease from maize endosperm. Plant Physiol., 53, 449-452 (1974).
- HILLER, A., PLAZIN, J., and VANSLYKE, D. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. J. Biol. Chem., 176 (3), 1401-1420 (1948).
- IHLE, J.N. and DURE, L. The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. I. Purification and properties of a carboxypeptidase from germinating cotyledons. J. Biol. Chem., 247, 5034-5040 (1972a).
- IHLE, J.N. and DURE, L. The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. II. Catalytic properties of cotton carboxypeptidase. J. Biol. Chem., 247, 5041-5047 (1972b).
- JOSHI, S.S., SHRISVASTAVA, R.K. and SHRISVASTAVA, D.K. Chemical examination of Clitoria ternatea seeds. J. Amer. Chem. Oil Soc., 58 (6), 714-715 (1981).
- KATIYAR, R.C., RANYHAN, S.K. and SHUKLA, K.S. Yield and nutritive value of Clitoria ternatea. A wild perennial legume for sheep. Indian J. Dairy Sci., 23 (2), 79-81 (1970).
- KLOTH, R.H. and SPLITTSTOESSER, W.E. Proteolytic activities in germinating seeds of Cucurbita moschata. J. Seed Technol., 8 (1), 15-24 (1983).
- KOLEHMAINEN, L. and MIKOLA, J. Partial purification and enzymatic properties of an aminopeptidase from barley. Arch. Biochem. Biophys., 145, 633-642 (1971).

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970).
- MIKKONEN, A. Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean, Phaseolus vulgaris. Physiol. Plant., 68, 282-286 (1986).
- MIKOLA, J. Proteinases, peptidases, and inhibitors of endogenous proteinases in germinating seeds in Seed Proteins. J. Daussant, J. Mossé, J. Vaughan, Eds. Academic Press, New York, 1983.
- MIKOLA, J. and KOLEHMAINEN, L. Localization and activity of various peptidases in germinating barley. Planta, 104, 164-177 (1972).
- MIKOLA, L. Germinating barley grains contain five acid carboxypeptidases with complementary substrate specificities. Biochim. Biophys. Acta, 747, 241-252 (1983).
- MILLERD, A. Biochemistry of legume seed protein. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 53-72 (1975).
- MINAMIKAWA, T. Hydrolytic enzyme activities and degradation of storage components in cotyledons of germinating Phaseolus mungo seeds. Bot. Mag., 92, 1-12 (1979).
- MOELLER, M. ROBBINS, G.S., BURGER, W.C. and PRENTICE, N. A carboxypeptidase from germinated barley and its action on casein. J. Agric. Food Chem., 18, 886-890 (1970).
- MOREIRA, R.A. and CAVADA, B.S. Lectin from Canavalia brasiliensis (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. Biol. Plant. (Praha), 26 (2), 113-120 (1984).
- NIELSEN, S.S. and LIENER, I.E. Degradation of the major storage protein of Phaseolus vulgaris during germination. Plant Physiol., 74, 494-498 (1984).
- NOWAK, J. and MIERZWINSKA, T. Activity of proteolytic enzymes in rye seeds of different ages. Z. Pflanzenphysiol., 86, 15-22 (1978).
- OOTA, Y. FUJII, R. and OSAWA, S. Changes in chemical constituents during the germination of a bean, Vigna sesquipedalis. J. Biochem. (Japan), 40, 649-661 (1953).

- PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. Phytochem., 17, 1473-1480 (1978).
- PRISCO, J.T., AINOZ, I.L., and MELO, S.C. Changes in nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 33, 18-21 (1975).
- READ, S.M. and NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem., 116, 53-64 (1981).
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 173-196 (1973).
- RYAN, A.C. and WALKER-SIMMONS. Plant proteinases in Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol. 6. Abraham Marcus, Ed. Academic Press, London, 1981.
- SALMIA, A. Peptidases, proteinases and proteinases inhibitors in resting and germinating seeds of Scots pine Pinus sylvestris. Academic Dissertation. Department of Botany. University of Helsinki. Publication n^o 7. Helsinki. 1981.
- SHUTOV, A.D. and VAINTRAUB, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. Phytochem., 26 (6), 1557-1566 (1987).
- SOPANEN, T. Purification and partial characterization of a dipeptidase from barley. Plant Physiol., 57, 867-871 (1976).
- SOPANEN, T. and MIKOLA, J. Purification and partial characterization of barley leucine aminopeptidase. Plant Physiol., 55, 809-914 (1975).
- SPENCER, D. The physiological role of storage proteins in seeds. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 304, 275-285 (1984)
- St. ANGELO, A.J., ORY, R.L., and HANSEN, H.J. Purification of acid proteinase from Cannabis sativa L. Phytochem., 8, 1873-1877 (1969).
- STOREY, R.D. and WAGNER, F.W. Plant proteinases: a need for uniformity. Phytochem., 25 (12), 2701-2709 (1986).

- TRIEBOLD, H.O. Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products. D. Van Nostrand Company Inc. New York. 1946.
- TULLY, R.E. and BEEVERS, H. Protein bodies of castor bean endosperm (isolation, fractionation and the characterization of protein components). Plant Physiol., 58, 710-716 (1976).
- VISURI, K., MIKOLA, J. and ENARI, T.M. Isolation and partial characterization of a carboxypeptidase from barley. Eur. J. Biochem., 7, 193-199 (1969).
- WILSON, K.A. Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in germinating dicot seeds in Plant Proteolytic Enzymes. Vol. II. Michael J. Dalling, Ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 1986.

Arq. Biol. Tecnol. 30(1), abr., 1987

H6

NITROGENOUS COMPOUNDS IN Clitoria ternatea L. DURING GERMINATION

Ainouz

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Caixa Postal, 1065, Fortaleza, CE

Clitoria ternatea L. (streaky bean) has been studied in relation to lipid compounds, although no studies have been carried out concerning nitrogenous compounds. In view of the high protein content of the seeds (ca. 45%), the whole plant has been suggested as an alternative feed in the Northeast of Brazil. However, studies on its nitrogenous compounds are required to a better use of this leguminous plant.

In the present work we report results on the dry weight, total nitrogen content, extracted protein, and proteolytic activity in cotyledons and seedlings up to fifteen days of germination in the dark at 26°C. The total nitrogen was estimated by Kjeldahl method; the protein was extracted with Na-K-phosphate buffer pH 7.6; and the extracts after gel filtration on Sephadex G-25 were used for proteolytic activity determination (LPA-ase and BAPA-ase activities).

The dry weight of the cotyledons decreased gradually and that of the seedlings increased up to the 15th day. The total nitrogen content of the cotyledons increased up to the 3rd day and then decreased to a constant value until the 15th day, while that of the seedlings increased slowly up to the end of the period under study. The levels of soluble protein were constant in the seedlings and decreased in the cotyledons. There was no change in the proteolytic activity of the cotyledons or seedlings toward the substrates used.

Supported by CNPq and UFC.