



**43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia  
24 a 27 de Julho de 2006  
João Pessoa - PB**

---

**ATIVIDADE DE PROTEASE EM FOLHAS DE CAPIM-TANZÂNIA” ”**

**PATRICIA MENEZES SANTOS”2”; MILENA PROVAZI ”3”; GILBERTO BATISTA DE  
SOUZA”4”**

Projeto financiado pelo IFS

2 Pesquisadora. Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, CP 339, CEP 13560-970. E-mail: patricia@cppse.embrapa.br

3 Bolsista da FAPesq

4 Técnico de Nível Superior da Embrapa Pecuária Sudeste.

**RESUMO**

A determinação da atividade proteolítica de enzimas pode contribuir para o entendimento das relações entre fontes e drenos e dos mecanismos de resposta das plantas às condições de estresse. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a atividade de enzimas proteolíticas em folhas de capim-tanzânia. O experimento foi desenvolvido em casa-de-vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste (22°01' S; 47°53' W). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com oito tratamentos (0, 1, 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias após a desfolha) e três repetições. Logo após a desfolha, as duas folhas mais novas completamente expandidas dos perfilhos foram identificadas. Durante as coletas, as folhas identificadas foram separadas e armazenadas a -80oC. A atividade das proteases foi determinada utilizando-se a azocaseína como substrato. Não houve efeito do tempo após a desfolha sobre a atividade de proteases nas folhas (variação de 0,009 a 0,014 unidades/mg de massa fresca). A concentração de proteína, por outro lado, decresceu ao longo das coletas. A atividade específica das proteases aumentou a partir do sétimo dia após a desfolha, chegando a 4,342 unidades/mg de proteína na última coleta. Concluiu-se que a atividade proteolítica em folhas expandidas de capim-tanzânia não representa o curso de degradação de proteínas e que a atividade específica das proteases aumenta ao longo do processo de senescência foliar.

**PALAVRAS-CHAVE**

Senescência, proteína, enzimas, "Panicum maximum"

**PROTEASE ACTIVITY IN "PANICUM MAXIMUM" CV. TANZÂNIA LEAVES**

**ABSTRACT**

The determination of proteolytic activity of enzymes may contribute to the understanding of sink/sources relationships and of the mechanisms of plant adaptation to stress. The aim of this work was to characterise proteolytic activity in "Panicum maximum" cv. Tanzânia leaves. The experiment was held in a green house at Embrapa Southeast Cattle Research Center (22°01' S; 47°53' W). A complete block experimental design with eight treatments (0, 1, 2, 3, 5, 7, 14 and 21 days after defoliation) and three replicates was adopted. Immediately after defoliation, the two youngest completely expanded leaves were identified. After harvest, these leaves were stored at -80°C. Proteolytic activity of enzymes was determined using azocasein as substrate. There was no effect of days after defoliation on proteases activity (varied from 0,009 to 0,014 units/mg fresh weight). Protein concentration decreased from day

zero to day 21. Proteases specific activity increased after day seven and was 4,342 units/mg of protein on day 21. It was concluded that proteolytic activity of enzymes does not reflect protein degradation course in leaves of "Panicum maximum" cv. Tanzânia and that proteases specific activity increases as leaves senesce.

## KEYWORDS

Senescence, protein, enzymes, proteolytic activity b

## INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que catalisam reações em que proteínas são o substrato. A síntese e a degradação de proteínas são processos interdependentes e essenciais ao metabolismo celular. Esses processos estão envolvidos na reciclagem e em todas as mudanças quantitativas e qualitativas das proteínas dentro das células. A determinação da atividade proteolítica de enzimas pode contribuir, por exemplo, para o entendimento das relações entre fontes e drenos em estudos sobre reservas orgânicas e dos mecanismos de resposta das plantas às condições de estresse biótico e abiótico (Thornton & Bausenwein, 2000; Heing et al., 2004).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a atividade de enzimas proteolíticas em folhas de capim-tanzânia.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP. Foram utilizados 24 vasos de 5,0 L preenchidos com areia fina livre de material orgânico. Os vasos receberam, a cada dois dias, solução nutritiva completa contendo: 1,5 mol/m<sup>3</sup> de KNO<sup>3</sup>; 0,75 mol/m<sup>3</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,1 mol/m<sup>3</sup> de CaCl<sup>2</sup>; 0,75 mol/m<sup>3</sup> de MgSO<sup>4</sup>; 0,307 mol/m<sup>3</sup> de NaH<sup>2</sup>PO<sup>4</sup>; 0,026 mol/m<sup>3</sup> Na<sup>2</sup>HPO<sup>4</sup>; 50 mmol/m<sup>3</sup> de H<sup>3</sup>BO<sup>3</sup>; 10 mmol/m<sup>3</sup> de FeC<sup>6</sup>H<sup>5</sup>O<sup>7</sup>; 8,6 mmol/m<sup>3</sup> de MnSO<sup>4</sup>, 2 mmol/m<sup>3</sup> de ZnSO<sup>4</sup>, 1 mmol/m<sup>3</sup> de CuSO<sup>4</sup>.

Os vasos foram dispostos na casa-de-vegetação de acordo com o delineamento em blocos ao acaso com oito tratamentos (coleta 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias após a desfolha) e três repetições. O plantio foi feito no dia 28 de outubro de 2005. No dia zero (30 de novembro de 2005), 50% da aérea foliar das plantas foi removida. Logo após a desfolha, as duas folhas mais novas completamente expandidas dos perfilhos com mais de três folhas foram identificadas e marcadas com fios de arame coloridos. Durante as coletas, as folhas identificadas no dia zero foram separadas (lâmina e bainha), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

A atividade das proteases foi determinada utilizando-se a azocaseína como substrato, seguindo a metodologia descrita por Weckmann & Martin (1984) e adaptada por Santos et al. (2005). No momento da análise, aproximadamente 2 g de massa fresca de folhas foram transferidos para almofariz de porcelana e macerados com nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 300 mg de PVPP e 6,0 ml da solução tampão TES-KOH à amostra. O extrato foi centrifugado a 15000g e 5°C por 15 minutos. Após a centrifugação, os tubos de reação foram preparados com 200 µL do sobrenadante e 500 µL de solução tampão de citrato-fosfato com azocaseína, em tubo do tipo "ependorf" de 1,5 mL. Ao final do período de incubação, realizada em banho-maria a 37°C por 2 horas, a reação foi interrompida por meio da adição de 700 µL de solução de TCA a 20% (m/v). Em seguida, os tubos foram mantidos por 20 min a 5°C em banho de gelo e o material foi centrifugado a 12000g por 15 min. Por fim, 1,0 ml do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio, adicionou-se 0,2 ml de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup> e fez-se a leitura do valor de absorvância a 440 nm. Nos brancos, o substrato (solução tampão de citrato-fosfato + azocaseína) foi incubado e, depois de retirar os tubos do banho-maria, colocou-se o TCA e em seguida o homogenato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida com a quantidade necessária para elevar em uma unidade a leitura de absorvância a 440nm por hora de incubação.

A concentração de proteína no extrato das folhas de capim-tanzânia foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se kit de ensaio de proteínas (Bio-Rad Protein Assay).

Os resultados foram analisados com o auxílio do pacote estatístico SAS (2001). A análise da variância foi feita utilizando-se o procedimento GLM. Para as variáveis atividade e atividade específica de proteases a análise de variância foi feita após a transformação dos dados a fim de ajustar o modelo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito do tempo após a desfolha sobre a atividade de proteases nas folhas de capim-tanzânia avaliadas, que variou de 0,009 a 0,014 unidades/mg de massa fresca de folhas durante o período experimental. A concentração de proteína nas folhas, por outro lado, decresceu ao longo das coletas (Figura 1) e variou de 0,187 a 0,023 "g/mL", observados aos três e 21 dias após a desfolha, respectivamente. A atividade proteolítica das folhas capim-tanzânia, portanto, não refletiu o curso de degradação protéica observado.

A atividade específica das proteases aumentou a partir do sétimo dia após a desfolha, chegando a 4,342 unidades/mg de proteína na última coleta (21 dias após a desfolha) (Figura 1). O aumento da atividade específica das proteases deve ser atribuído, principalmente, à redução da concentração de proteína (Figura 2), uma vez que a atividade proteolítica nas folhas se manteve praticamente constante ao longo do experimento.

O processo de senescência foliar é organizado e apresenta vários mecanismos de controle (Hörtensteiner & Feller, 2001). A alocação de compostos em diferentes compartimentos celulares (cloroplasto, vacúolo, estroma, etc.) e a diversidade de proteínas e enzimas envolvidas no processo indicam que existem várias vias de degradação protéica.

Weckmann & Martin (1984) também não encontraram relação entre a degradação de proteína e a atividade de proteases em "Nicotiana rustica" e sugeriram que essa fosse uma estratégia para aumentar a eficiência de mobilização do nitrogênio, uma vez que ao final do processo de senescência há um acúmulo de enzimas proteolíticas em relação ao conteúdo de proteínas das folhas.

## CONCLUSÕES

A atividade proteolítica em folhas expandidas de capim-tanzânia não representa o curso de degradação de proteínas. A atividade específica das proteases aumenta ao longo do processo de senescência foliar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HIENG, B.; UGRINOVIC, K.; SUSTAR-VOZLIC, J.; KIDRIC, M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of "Phaseolus vulgaris" L. cultivars differing in sensitivity. "Journal of Plant Physiology", v. 161, p.519-530, 2004.
2. HÖRTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. "Journal of Experimental Botany", v.53, p.927-937, 2002.
3. SAS Institute 2000. "SAS/INSIGHT User's Guide". versão 8.2, versão para Windows Cary, NC, USA.
4. THORNTON, B.; BAUSENWEIN, U. Seasonal protease activity in storage tissue of the deciduous grass *Molinia caerulea*. "New Phytologist", v.146, p.75-81, 2000.
5. WECKENMANN, D.; MARTIN, P. Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of "Nicotiana rustica" in light and dark. "Physiologia Plantarum", v. 60, p. 333 – 340, 1984.

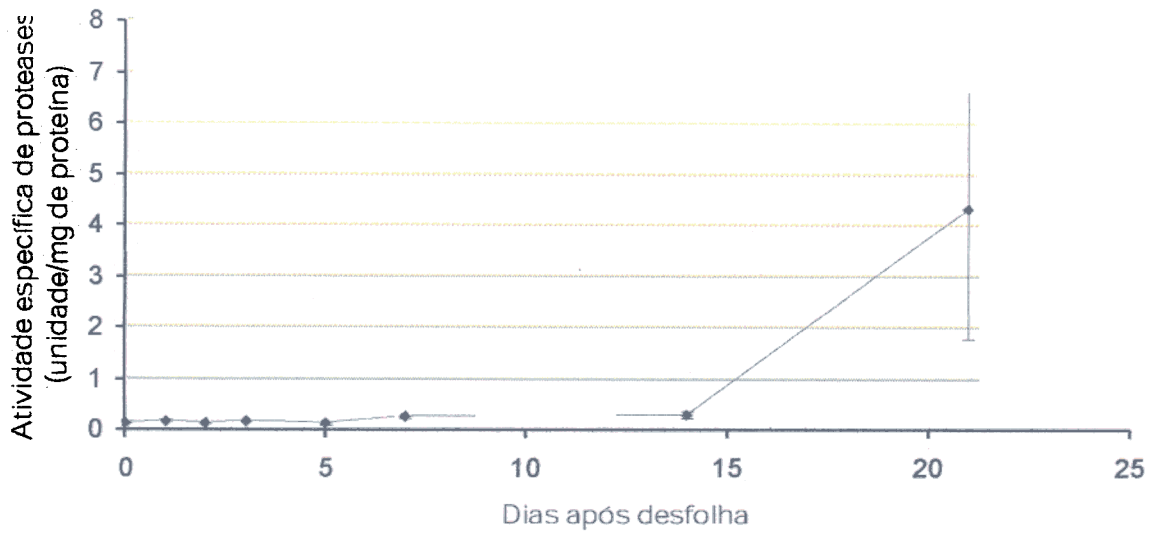


Figura 1. Atividade específica de proteases (unidade/mg de proteína) em extratos de folhas expandidas de capim-tanzânia após a desfolha.

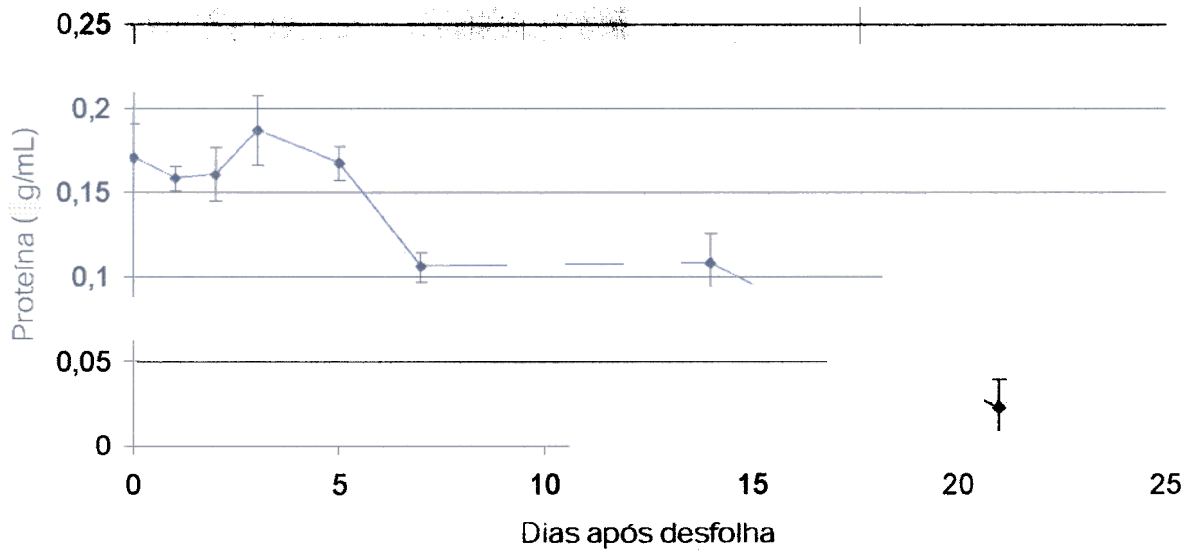


Figura 2. Concentração de proteína em extratos de folhas expandidas de capim-tanzânia após a desfolha.