FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO FISICO-QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA SEMENTE DE *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS AGRESTE – FABACEAE), ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CITOQUININA OXIDASE EM RAÍZES DE SUA PLÂNTULA

ÍDILA MARIA DA SILVA ARAUJO

CRATO-CE
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO FISICO-QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA SEMENTE DE *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS AGRESTE – FABACEAE), ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CITOQUININA OXIDASE EM RAÍZES DE SUA PLÂNTULA

IDILA MARIA DA SILVA ARAUJO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular, Área de concentração: Bioprospecção Molecular; Linha de Pesquisa: Biologia e Bioquímica Molecular.

Orientadora: Profª. Drª. Beatriz Tupinambá Freitas

CRATO-CE
2009

ARAUJO, Ídila Maria da Silva

Caracterização fisico-química e bioquímica da semente de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS Agreste – Fabaceae), isolamento, purificação e caracterização parcial de citoquinina oxidase em raízes de sua plântula/ Ídila M. S. Araujo - Crato, 2009.

131 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional do Cariri. Departamento de Ciências Biológicas.

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. Caracterização físico-química 3. Minerais 4. Síntese de Proteína 5. Cotilédone 6. Hipocótilo 7. Citoquinina oxidase I. Título

ÍDILA MARIA DA SILVA ARAUJO

CARACTERIZAÇÃO FISICO-QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA SEMENTE DE *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS AGRESTE), ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE CITOQUININA OXIDASE EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DESSA FABACEAE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisitos parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular, Área de concentração: Bioprospecção Molecular; Linha de Pesquisa: Biologia e Bioquímica Molecular.

Submetida e Aprovada em 15 de Setembro de 2009

Prof. Dra.Beatriz Tupinambá Freitas
Universidade Federal de Sergipe-UFS

Prof. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Ao meu amável e idolatrado *Senhor Jesus*,

fonte de força na minha vida

Aos meus pais,

José Adeildo Pereira de Araujo e *Maria de Fátima da Silva Araujo*,

pelo amor, ensinamentos e constante apoio durante esta jornada.

Aos meus irmãos, *Italo José da Silva Araujo* e *Icaro da Silva Araujo*,

pela família que formamos

Ao meu companheiro, *Antônio Carlos dos Santos Ferreira*,

pela amor e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, que nos dá força para enfrentar e vencer tantos obstáculos.

À *minha família*, pelos incentivos durante a minha carreira profissional, em especial aos meus pais, *José Adeildo* e *Maria de Fátima*, e os meus irmãos, *Italo Araújo* e *Icaro Araújo*, pelo exemplo de pessoas benevolentes e amorosas.

Ao *meu noivo*, *Antonio Carlos*, pelo amor, companheirismo e paciência.

À *Universidade Regional do Cariri*, ao *Departamento de Ciências Biológicas* e ao Corpo Funcional do *Curso de Bioprospecção Molecular*, pelo oferecimento deste curso, em especial a Secretária do curso, *Maria Andeciele Rolim*.

À minha orientadora e amiga *Drª Beatriz Tupinambá Freitas*, pela dedicação, ensinamentos, confiança e conhecimentos compartilhados durante o Mestrado. Além, do seu braço forte no erguimento de nosso laboratório. Ela é merecedora de nossa admiração pelas suas lutas.

Ao professor *José Carlos Marques Freitas* pela amizade, paciência, disponibilidade, sugestões e, sobretudo, pela ajuda fundamental na parte experimental desse trabalho.

À Drª *Ana Josicleide Maia* da Universidade Regional do Cariri pelas sugestões ofertadas durante defesa de qualificação do projeto. À Drª *Patricia Maria Guedes Paiva* da Universidade Federal de Pernambuco por se disponibilizar em

participar da examinação da dissertação, além do seu reforço na melhoria do trabalho.

À *Embrapa Arroz e Feijão*, na pessoa do Dr. *José Luíz Cabrera Diaz*, pelo fornecimento das sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS Agreste), material chave para execução desse trabalho.

À *Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa* (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo e ao *Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) pelo auxílio financeiro e por auxílios de pesquisa.

Aos *Laboratórios de Química Analítica do* Instituto *Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro* – IFRJ e de *Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado da Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro* – PUC/RJ pela determinação de minerais: zinco, sódio, alumínio, manganês, cobalto e potássio. À *Faculdade de Tecnologia Centec* – FATEC Cariri, na pessoa do Diretor *Raimundo de Sá Barreto Grangeiro* e Coordenadores dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos e de Saneamento Ambiental, por terem disponibilizado espaço, equipamentos e reagentes necessário para realização deste trabalho; e ao *Emanuel Oliveira Neto* pela análise de cinzas e proteínas. E, ao *Laboratório de Química de Produtos Naturais* por todo apoio na realização de parte dos experimentos desta dissertação. À *Faculdade Leão Sampaio*, na pessoa de Maria do Socorro (Corrinha) e Maria de Lourdes (Ude). À *Faculdade de Juazeiro do Norte* (FJN), na pessoa de *Marcylenne Santana* pela oferta de água destilada.

Ao irmão, *Filipe Gutierre Carvalho de Lima* e irmã, *Tarciana de Oliveira Guedes* (amigos e colegas do mestrado), pelo carinho, preocupação, cumplicidade, solidariedade em todos os momentos acadêmicos e de pesquisa. Por nossa louca amizade. Adddddooooorooooooooo!!!!

Aos colegas de Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, *Elizabeth Marques, Claudener Souza, Mário Eduardo, Ivaneide Taveira, Marcos Aurélio e Edson* pelo companheirismo e alegrias, ajuda imprescindível no desenvolvimento da pesquisa e pela união do nosso grupo de trabalho. Eita povo baãoooo, pau para toda obra!!!

Ao amigo, *Wiglaney Bezerra*, pelo seu apoio e inteligência. O homem das criações das engenhocas, tão necessárias na execução dos trabalhos. A Frase é "Pode deixar comigo!!!".

Aos *Mestres* da vida acadêmica, que inseriram uma parcela de contribuição no conhecimento adquirido até aqui, em especial a Profª *Maria Arlene Pessoa da Silva* pelo apoio e disponibilidade de ajudar nos momentos que mais precisamos.

Aos *Colegas do Mestrado* pelos momentos vividos e trocas de experiências durante as nossas jornadas no decorres do curso.

À *Marcylenne Santana*, pela sua presença, ajuda e amizade em todos os momentos, tanto acadêmico quanto pessoais. Obrigada por me escutar. No meu coração você sempre terá um lugar especial.

À *Alexandre Soares, Ana Paula Canuto* e *Maria de Fátima (Rose)*, pela nossa grande amizade que continuará em qualquer lugar do mundo, e também pela força recebida durante todo esse meu processo de vida pessoal e profissional, além da parcela de contribuição da execução desse trabalho.

Aos Amigos, *Ademar Maia, Ana Caroline Cavalcante (Carola), Altalita Tavares, Rivania Alves, Maria de Lourdes (Ude), Maria do Socorro (Corrinha)* pela força, momentos alegre e convivência diária corrida, além da amizade que sempre me brindou.

Ao meu amigo, *Tarcísio Marcos de Souza Gondim* pelo apoio, disponibilidade, estimulo constante para meu crescimento profissional, apesar da distância geográfica, esteve sempre presente. Também pelo exemplo de vida para mim, como profissional e pessoa.

À *Angélica Denoá* (Cunhadinha), *Débora Maria* (Irmã de coração), à minha afilhada *Iandra Santos* e meus compadres *Maria Lucineide* e *Valderi Jacó* pela amizade e apoio nas contribuições indiretas nesse trabalho.

À todos os *funcionários* desta Instituição, aqueles que não se negaram e/ou contribuíram direto ou indiretamente para que este sonho se tornasse realidade. Em especial à Silvana, Marcos, Jesus, Fernando, Lêda, Assis, Sr. Luiz.

“Existem HOMENS que LUTAM UM DIA E SÃO BONS; existem outros que LUTAM UM ANO E SÃO MELHORES; existem aqueles que LUTAM MUITOS ANOS E SÃO MUITO BONS. Porém, existem os que LUTAM TODA A VIDA. Estes são os IMPRESCINDÍVEIS."

BERTOLT BRECHE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, Safras 2000/2001 a 2007/2008. 32

Figura 2 – Desenvolvimento e germinação de semente. Esquema geral de eventos associados com as diferenças de fase de desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo de sementes, incluindo (A) ciclo celular, eventos metabólicos e de reparo e períodos em que a semente (embrião) é intolerante ou tolerante à dessecação; (B) padrão de expressão de genes em estádios específicos, por meio de uma reparação conceptual do acúmulo de sete conjuntos de mRNA que ocorrem durante o desenvolvimento da semente. Adaptada a partir de (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004). 35

Figura 3 – Estruturas da zeatina na conformação *trans* e *cis*. 41

Figura 4 – Degradação da citoquinina pela enzima citoquinina oxidase. 45

Figura 5 – Sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade mulatinho, cultivar BRS Agreste. 51

Figura 6 – Tratamento das amostras de sementes para as determinações de Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe, Cu^{2+}..... 56

Figura 7 – Espectrômetro de Massa, Elan 5000 (Perkin Elmer-Sciex), do laboratório de ICP-MS da PUC-Rio. 66

Figura 8 – Esquema de fracionamento do extrato protéico das sementes de *P. vulgaris* L., cv BRS Agreste. 71

Figura 9 – Procedimentos necessários para germinação de sementes de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste). A) Sementes intactas viáveis para germinação; B) Desinfestação da semente e teste de imersão em hipoclorito de sódio para detecção de sementes viáveis; C) Sementes com danos mecânicos (queimadas e enrugadas) confirmados após teste de imersão. D e E) Sementes aclimatadas em sacos de TNT disposto em potes plásticos para então germinação. F) Disposição dos potes com sementes para germinação em ambientes com temperatura e luminosidade controlada. G) Plântula em estádio de desenvolvimento. 76

Figura 10 – Germinação de sementes de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em substrato de germiculita. A) Germinação de sementes em caixas plásticas; B) Semente germinada em estádio de desenvolvimento I (radículas de até 3,0 cm). 77

Figura 11 – Esquema de extração de proteínas de cotilédones, hipocótilo, folhas e raízes de plântulas de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com diferentes dias de germinação. 79

Figura 12 – Varredura de absorção do complexo ferro-ortofenantrolina no intervalo de comprimento de onda entre 490 – 550 nm em solução com [Fe] = 0,20 ppm. 89

Figura 13 – Curva de Calibração Padrão do complexo Ferro-ortofenantrolina no intervalo de concentração de 0,20 – 5,0 ppm de ferro na amostra. 90

Figura 14 – Varredura de absorção do complexo cobre-dietietilcarbamato de sódio no intervalo de comprimento de onda entre 400 – 480 nm em solução com [Cu] = 1,0 ppm 91

Figura 15 – Curva de Calibração Padrão do complexo cobre-dietietilcarbamato de sódio no intervalo de concentração de 1,0 – 5,0 ppm de cobre na amostra. 92

Figura 16 – Quantidades relativas de proteínas do extrato bruto da farinha de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) e das frações protéicas precipitadas nos intervalos de saturação de 0-20%; 20-60% e 60 % com sulfato de amônio. 96

Figura 17 – I – Eletroforese do extrato bruto da farinha de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) e das frações protéicas precipitadas em diferentes intervalos de saturação com sulfato de amônio. No poço A estão os marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). No poço B está o extrato total de FF Phaseolus vulgaris. Poço C, D e E, fração com saturação de sulfato de amônio de 0 – 20 %, 20 – 60 % e 60 %, respectivamente 97

Figura 18 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de cotilédones de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia. 98

Figura 19 – I – Eletroforese das albuminas de cotilédones de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 ao 30º DG)..... 100

Figura 20 - Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de hipocótilo de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia. 101

Figura 21 – I – Eletroforese das albuminas de hipocótilo de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24º ao 30º DG). 102

Figura 22 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de folha de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia. 103

Figura 23 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de raízes de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia. 104

Figura 24 – I – Eletroforese das albuminas de folhas de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 a 30 DG). 105

Figura 25 – I – Eletroforese das albuminas de raizes de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 a 30 DG). 106

Figura 26 - Eluição do extrato bruto de raízes de plântulas de feijão no estádio I de desenvolvimento por meio do uso da coluna de Sephadex G-75. A fração não-retida foi eluida com Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 com adição de NaCl 0,15 M e sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM e a fração retida com o mesmo tampão com NaCl 1,5 M. 108

Figura 27 - Eluição do P (R I-1) da Sephadex G-75 por meio do uso da coluna em ConA-Sepharose. A fração não-retida na ConA foi eluida com Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 com adição de NaCl 0,15 M e sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM e a fração retida na ConA com o mesmo tampão com NaCl 1,5 M. 110

Figura 28 - Esquema da formação da base de Schiff. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades da atividade de citoquininas oxidases isoladas em diferentes tecidos de plantas 47

Tabela 2 – Parâmetros operacionais do ICP – MS. 67

Tabela 3 – Composição centesimal de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em base seca. 84

Tabela 4 – Composição mineral (mg.100 g^{-1}) de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em base seca. 87

Tabela 5 – Ensaio da atividade da CKO nos picos P (I ConA) e P (II ConA) purificados na coluna de ConA-Sepharose. 111

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS I

LISTA DE TABELAS VII

RESUMO 21

ABSTRACT 23

1. INTRODUÇÃO 25

2. REVISÃO DE LITERATURA 29

2.1. Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris L.*) 29

2.2. Desenvolvimento de Plantas e Mobilização de Proteínas 34

2.3. Citoquininas 39

2.3.1. Citoquininas oxidases na metabolização da citoquinina nos tecidos vegetais 44

3. MATERIAL E MÉTODOS 51

3.1. Material Vegetal 51

3.2. Caracterização Físico-Química da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste 52

3.2.1. Determinação de umidade 53

3.2.2. Determinação de proteínas a partir do teor de nitrogênio total 53

3.2.3. Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas) 55

3.2.4. Determinação de Minerais 55

3.2.4.1. Cálcio 57

3.2.4.2. Magnésio 59

3.2.4.3. Ferro 61

3.2.4.4. Cobre 63

3.2.4.1. Determinação de alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco 65

3.3. Caracterização Bioquímica da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste ... 69

3.3.1. Extração de proteínas 69

3.3.2. Fracionamento do extrato protéico 69

3.3.3. Dosagem de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas 72

3.3.4. Análise eletroforética do extrato bruto e das frações protéicas 72

3.4. Germinação 74

3.4.1. Extração de proteínas de plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento 78

3.5. Purificação Parcial da Citoquinina Oxidase 80

3.5.1. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 80

3.5.2. Purificação de proteínas a partir do P (R I-1) da CKO 82

3.5.3. Ensaio da atividade da citoquinina oxidase 82

4. Resultados e Discussão 84

4.1. Composição Centesimal da Semente de *P. vulgaris* L.,cv. BRS Agreste 84

4.2. Composição Mineral da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste 86

4.2.1. Cálcio e Magnésio 87

4.2.2. Ferro 89

4.2.3. Cobre 91

4.2.4. Teores de alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco por ICP-MS 93

4.3. Quantificação de Proteínas e Perfil Eletroforético do Extrato Bruto e das Frações Protéicas Precipitadas com Sulfato de Amônio 95

4.4. Dosagem e Perfil Eletroforético de Proteínas de Plântulas de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em Diferentes Estágios de Desenvolvimento..... 98

4.4.1. Cotilédones..... 98

4.4.2. Hipocótilo 100

4.4.3. Folhas e Raízes 103

4.5. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-75 e Determinação Protéica dos Extratos de Raízes de Plântulas de Feijão no Estádio I..... 106

4.6. Purificação do P (R I-1) da Sephadex G-75 em ConA-Sepharose e Determinação Protéica 109

4.7. Ensaio da Atividade da Citoquinina Oxidase nos Picos P (I ConA) e P (II ConA) Purificados na Coluna de ConA-Sepharose 111

5. CONCLUSÕES..... 114

6. BIBLIOGRAFIA..... 116

RESUMO

As citoquininas oxidases (CKO) são enzimas responsáveis pela oxidação de citoquininas, substâncias que, com o auxílio de auxinas, promovem a divisão celular das plantas. O estudo aprofundado sobre a resposta fisiológica de leguminosas aos níveis da razão CK/CKO em termos de produtividade e metabolismo celular parece levar a melhor manejo e rendimento de grãos, como também conhecimento dos processos de síntese de nutrientes e manutenção de características ligadas a senescência da planta. O objetivo deste estudo foi caracterizar físico-quimicamente e bioquimicamente sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS Agreste), isolar e purificar parcialmente citoquinina oxidase em raízes de plântulas dessa Fabaceae. Realizou-se caracterização físico-química da semente quanto aos teores de umidade, cinzas e proteína segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz, cálcio e magnésio por complexometria, ferro e cobre (espectrofotometria de absorção) e alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP – MS). A dosagem proteína (Bradford) e perfil eletroforético (PAGE-SDS) foi realizada no extrato da farinha de sementes e tecidos de plântulas de feijão (cotilédones, hipocótilo, raiz e folhas) com diferentes dias de germinação. O isolamento da CKO em raízes de plântulas de feijão foi realizado a partir da cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 e ConA-Sepharose. A identificação da CKO foi feita a partir da atividade biológica de desalquilação oxidativa da isopenteniladenina. As sementes da cv. BRS Agreste apresentaram teores de cinzas (4,78 g.100 g^{-1}), proteína (23,42 g.100 g^{-1}), cálcio (97,77 mg.100 g^{-1}), magnésio (110,62 mg.100 g^{-1}), ferro (1,09 mg.100 g^{-1}), cobre (1,29 mg.100 g^{-1}), alumínio (8,15 mg.100 g^{-1}), cobalto (0,10 mg.100 g^{-1}), potássio (511,74 g.100 g^{-1}), manganês (0,61 g.100 g^{-1}), sódio (51,51 g.100 g^{-1}) e zinco (1,49 mg.100 g^{-1}). A semente apresentou 24,95 mgP/gF de proteína solúveis de pesos MM entre 21,1 kDa e 97 kDa. Nas plântulas germinadas, pode-se verificar que o teor protéico varia de acordo com o tecido vegetal analisado e o tempo de germinação. Nos cotilédones, raízes e folhas a concentração protéica foi máxima aos 29 DG, havendo decréscimo após esse período. Ressalta-se que na raiz as variações foram

maiores. Nos hipocótilo, a maior concentração foi aos 24 DG. A cromatografia de afinidade do extrato de raízes de plântulas no estádio de desenvolvimento I em coluna de Sephadex G-75 possibilitou isolamento de pico ($P_{(R\ I-1)}$ com proteínas glicosiladas. A purificação do $P_{(R\ I-1)}$ na coluna de ConA-Sepharose foi eficiente na purificação parcial de dois picos que apresentam atividade biológica de CKO.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., caracterização físico-química, minerais, síntese de proteína, cotilédone, hipocótilo, citoquinina oxidase.

ABSTRACT

The oxidase cytokinin (CKO) are enzymes responsible for oxidation of cytokines, substances that, with the help of auxins, promote cell division in plants. The detailed study on the physiological response of legumes to the right levels of CK / CKO in terms of productivity and cellular metabolism appears to lead to better management and yield, as well as knowledge of procedures for the synthesis of nutrients and maintenance of features related to senescence plant. The objective of this study was to characterize physico-chemically and biochemically seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS Agreste), isolate and partially purify oxidase cytokinin in roots of seedlings of this Fabaceae. Was performed physicochemical characterization of the seed for the levels of moisture, ash and protein according Institute Adolfo Lutz methodology, calcium and magnesium by complexometry, iron and copper (absorption spectroscopy) and aluminum, cobalt, manganese, potassium, sodium and zinc by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP - MS). The protein determination (Bradford) and eletrophoresis profile (SDS-PAGE) was performed in the extract of locust and tissues of bean seedlings (cotyledons, hypocotyls, root and leaves) at different days of germination. The isolation of CKO in roots of bean seedlings was carried out from the affinity chromatography column of Sephadex G-75 and ConA-Sepharose. The identification of CKO was made from the biological activity of oxidative dealkylation of isopentenyladenine. The seeds of cv. BRS Agreste showed ash content (4.78 g.100 g-1), protein (23.42 g.100 g-1), calcium (97.77 mg.100 g-1), magnesium (110.62 mg .100 g-1), iron (1.09 mg.100 g-1), copper (1.29 mg.100 g-1), aluminum (8.15 mg.100 g-1), cobalt (0, 10 mg.100 g-1), potassium (511.74 g.100 g-1), manganese (0.61 g.100 g-1), sodium (51.51 g.100 g-1) and zinc (1.49 mg.100 g-1). The seed showed 24.95 mgP / gF soluble protein weight MM of 21.1 kDa and 97 kDa. In seedlings, it is found that the protein content varies with the plant tissue analyzed and the time of germination. In the cotyledons, roots and leaves protein concentration was maximum at 29 DG, with a decrease after this period. It is noteworthy that at the root of the changes were larger. In hypocotyls, the highest concentration was at 24 DG. Affinity chromatography of the extract of the

roots of seedlings at stage I on a column of Sephadex G-75 allowed the isolation of peak (P (R I-1) with glycated proteins. Purification of P (R I-1) in column of ConA-Sepharose was effective in partial purification of two peaks that exhibit biological activity of CKO.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., physico-chemical, minerals, protein synthesis, cotyledon, hypocotyl, oxidase cytokinin.

1. INTRODUÇÃO

As citoquininas são uma classe de hormônios vegetais específicos que desempenham um papel fundamental durante o ciclo celular, regulação do sistema meristemático e morfogêneses, atuando em diferentes processos ligados ao desenvolvimento da planta (DEY e HARBONE, 1997; WERNER *et al*., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2009). Foram descobertas durante a década de 1950 por sua capacidade de induzir a divisão da célula vegetal (MILLER *et al*., 1955). Além dessas funções, esse fitohormônio promove o rompimento da dominância apical, atraso da senescência foliar e amadurecimento dos cloroplastos.

A degradação das citoquininas, que em sua maioria são compostos purínicos com substituições no nitrogênio 6 por cadeias isoprenóides, é realizada por uma enzima denominada citoquinina oxidases (CKO) (EC 1.5.99.12). A CKO promove a oxidação de citoquininas gerando como produtos, adenina e um produto aldeídico resultante da quebra de sua cadeia lateral (HALL, 1973; LETHAM e PALN, 1983).

O mecanismo desta reação ainda é incerto, mas um intermediário iminopurina parece estar envolvido (BROWNLEE, HALL e WHITTY, 1975). A especificidade da citoquinina oxidase sugere que atua como regulador dos níveis de citoquininas nos tecidos vegetais, mas a significância real fisiológica desta enzima no desenvolvimento das plantas ainda não foi estabelecida.

Nas plantas, as moléculas de CKO se encontram em sua forma livre ou conjugadas com aminoácidos, nucleosídeos ou nucleotídeos. Seus principais pontos de síntese são os ápices radiculares e frutos em desenvolvimento.

Recentemente foi reportada uma técnica de isolamento de CKO de cultura de "callus" de *Phaseolus vulgaris* L. utilizando-se uma coluna de afinidade com a lectina de *Canavalian ensiformis* (ConA) imobilizada (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986). De acordo com esta técnica, a ConA reconhece e liga-se as glicosilações de CKO de *P. vulgaris* L., uma vez que esta lectina apresenta uma afinidade por resíduos de glicose/manose e seus derivados.

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é planta originária do Novo Mundo e cultivada, atualmente, em todos os continentes, sobretudo para a produção de sementes seca (FONSECA *et al*., 2002). É uma leguminosa que constitui um excelente alimento, fornecendo nutrientes essenciais ao ser humano, como proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. Representa a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda e constitui um produto de destacada importância nutricional, econômica e social, além de ser um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro (SOARES, 1996).

Os programas de melhoramento genético do feijoeiro visam obter variedades que apresentem alta produtividade, aliada a resistência às doenças, com produção de sementes possuindo forma, tamanho, cor e brilho aceitáveis no

mercado. Além disso, os grãos de feijão devem possuir características culinárias e nutricionais desejáveis, como facilidade de cocção, boa palatabilidade, textura macia do tegumento, capacidade de produzir caldo claro e denso após o cozimento, maior teor de proteínas e minerais (MESQUITA *et al.*, 2007).

Os nutrientes minerais têm funções específicas e essenciais no metabolismo da planta, podendo realizar uma variedade de funções. Algumas destas funções são pouco correlacionadas com a quantidade requerida ou com propriedades físico-químicas. Um nutriente mineral pode funcionar como constituinte de uma estrutura orgânica, como ativador de reações enzimáticas, ou como transportador de cargas e osmorregulador (GARCIA, 2006).

O estudo aprofundado sobre a resposta fisiológica de leguminosas aos níveis da razão CK/CKO em termos de produtividade e metabolismo celular parece levar a melhor manejo e rendimento de grãos, como também conhecimento dos processos de síntese de nutrientes e manutenção de características ligadas a senescência da planta (DEY e HARBONE, 1997).

Devido a escassez de estudos, objetivou-se neste trabalho a caracterização fisico-química e bioquímica da semente de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS Agreste), isolar, purificar e caracterizar parcialmente citoquinina oxidase em raízes de sua plântula. Para tanto elegeu-se como objetivos específicos: a) Caracterizar físico-quimicamente a semente de feijão comum, cv. BRS Agreste, quanto aos teores de umidade, proteína, cinzas e minerais; b) dosar o teor protéico e

determinar perfil eletroforético da semente de feijão comum e de plântulas com diferentes dias de germinação, nas condições de ambiente refrigerado; e, c) isolar, purificar e caracterizar parcialmente a CKO em raízes de plântulas de feijão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris L.*)

O feijão é uma leguminosa utilizada como planta domesticada em períodos remotos, por civilizações inca, egípcia, grega, hebraica e romana (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2009a; KAPLAN, 1965). Sua origem e domesticação suportam diversas hipóteses da existência de centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como cultivadas, porém a sua origem exata não é bem sabida. Evidências de comparações de morfologia, distribuição geográfica, ecologia, genética e achados arqueológicos tem indicado que espécies selvagens são progenitoras de feijões comuns americanos (GENTRY, 1969)

Os feijoeiros do tipo selvagens foram encontrados na América Central, no México e na Guatemala, enquanto que tipos domesticados foram datados de cerca de 7.000 a.C., no México e disseminados, posteriormente, para os Andes na América do Sul (BURKART e BRÜCHER, 1953; BRÜCHER, 1969; GENTRY, 1969; MIRANDA-COLÍN, 1967, 1979). Por outro lado, achados arqueológicos mais antigos, cerca de 10.000 a.C., sugerem que o feijão teria sido domesticado na América do Sul, mais precisamente no Peru, e transportado para a América do Norte (KAPLAN, LYNCH e SMITH, 1973; EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2009a).

O gênero *Phaseolus* pertencente à família Fabaceae, compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.); o feijão de lima (*P. lunatus* L.); o feijão Ayocote (*P. coccineus* L.); o feijão tepari (*P. acutifolius* L.); e o *P. polyanthus* L.. A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é a mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*, colocando o Brasil como o segundo pólo produtor mundial dessa espécie. Entretanto considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México (YOKOYAMA, 2003).

O feijão comum é uma planta anual, de dias curtos e baixas altitudes, porém encontrada nas mais diversas condições em vários países do mundo. A importância da sua utilização e produção, esta em ser um dos alimentos básicos da população brasileira, além de ser um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar de enorme parcela da população mundial (ANTUNUES *et al*., 1995; GONÇALVES e SOUZA, 1998; VILLAVICENCIO, MANCINI-FILHO e DELINCEÉ, 2000), e excelente fonte de carboidratos e fibras, apresenta baixo teor de lipídios, sódio e não contém colesterol, além de possuir vitaminas (ROSTON, 1990; GEIL e ANDERSON, 1994; BRIGIDE, 2002) e minerais (BARAMPAMA e SIMARD, 1993a; BEEBE *et al*., 2000; CÁRDENAS, 2006; RIBEIRO *et al*., 2008).

O feijão comum é amplamente consumido no México, América Central, América do Sul e nos países Africanos e Indianos, nos quais a proteína animal é limitada por razões econômicas, religiosas e culturais (WELCH *et al*., 2000; COSTA *et al*., 2006). No Brasil o consumo atual de feijão é de cerca de 16 kg/hab/ano,

existindo preferências de cor, tipo de grão e qualidade culinária em algumas regiões do País (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2009b).

São inúmeras linhagens de feijão cultivadas no Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul, em certas regiões da Santa Catarina e Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, à preferência é pelo feijão preto. Em São Paulo e em algumas regiões de Minas Gerais são cultivados, de preferência, feijão de cor mulatinho, roxinho e o pardo (MOURA, 1998). Já no Estado de Goiás são cultivadas várias variedades de feijões, mas predomina o tipo carioca. Complementando, em Minas Gerais são recomendados alguns cultivares com esse tipo de grão, como Pérola, Aporé, Carioca MG, Rudá e IAC-Carioca (RAMALHO e ABREU, 2002).

Segundo dados do IBGE (2009), o Brasil produziu cerca de 3.460.067 toneladas de grãos de feijão em uma área de 3.779.449 hectares, com rendimentos de 915 $Kg.ha^{-1}$ de grãos (Figura 1). Entretanto, ocorrem perdas desses grãos a cada colheita, devido, entre outros fatores, ao ataque de pragas, mudanças edafoclimáticas, além da ocorrência de alterações das características físico-químicas, por transformações estruturais de seus componentes.

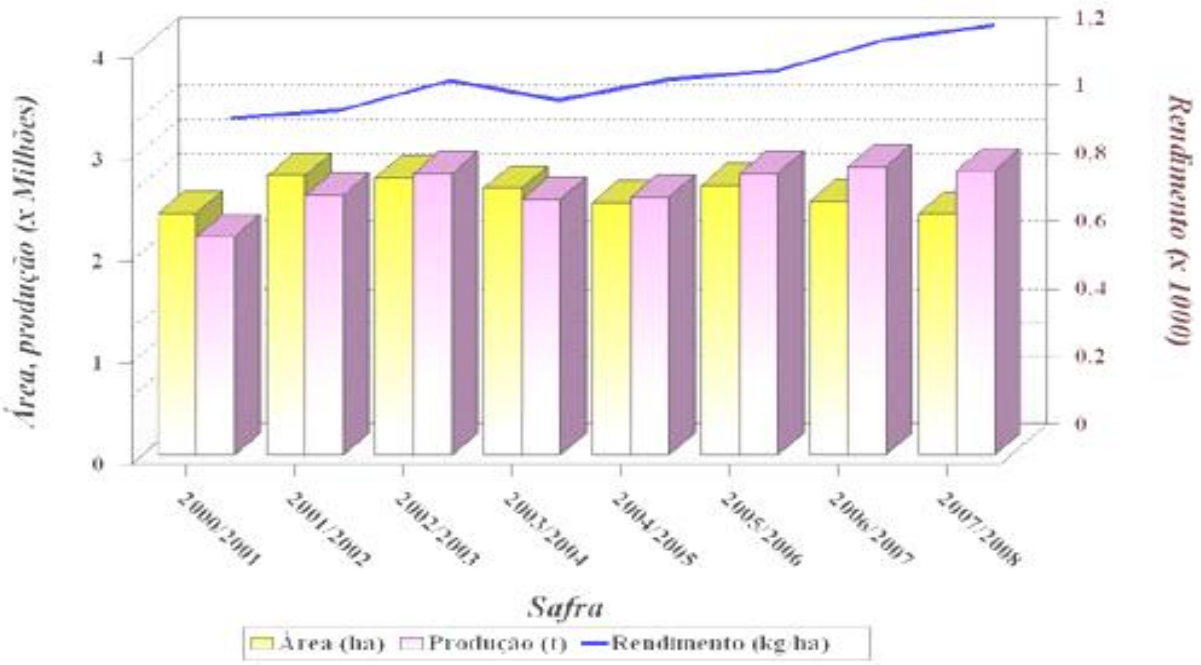


Figura 1 – Desenvolvimento da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, Safras 2000/2001 a 2007/2008.
Fonte: Silva (2004).

Diversos trabalhos de melhoramento genético têm sido desenvolvidos com o objetivo de obter cultivares de feijão com melhores características agronômicas, buscando a alta produtividade e melhor adaptação nas regiões de cultivo (SINGH, 1995). Peloso e colaboradores (PELOSO *et al.*, 2002), descreveram que, nos últimos 16 anos, os Centros de Tecnologia de Feijão, por meio de reuniões anuais, discutiram os resultados da rede de avaliação de linhagens e lançaram 34 novas cultivares de feijão, homologadas pelas Comissões Regionais de Avaliação e Recomendação de Cultivares CRCs/MA. Destas, 20 foram desenvolvidas pelo programa melhoramento genético do feijoeiro comum da Embrapa. O mercado geográfico de recomendação destas cultivares é diversificado por estados da

federação, e levando-se em consideração as vantagens comparativas que apresentam e que as levaram a serem recomendadas, podendo serem citadas: Macanudo, Minuano, Macotaço, Ouro Negro, Diamante Negro, Xamego e Guapo Brilhante, do grupo preto; Aporé, Pérola, Rudá e Princesa, do grupo comercial carioca; Safira do grupo roxo; Corrrente e Bambuí do grupo mulatinho.

Recentemente, foi lançada uma nova cultivar do grupo mulatinho, o BRS Agreste. Esta cultivar foi desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão para atender cultivo nos Estados de Sergipe, Alagoas, Bahia, Goiás e Distrito Federal, o que possibilita aos agricultores ofertar um produto de melhor qualidade ao consumidor final e auferir melhores rendimentos com a cultura. A BRS Agreste apresenta ciclo semi-precoce, com 75 a 85 dias da emergência à completa maturação, cor da flor branca, cor da vagem na maturação amarelo levemente avermelhada e cor do grão bege sem brilho, tamanho de grão uniformes com massa média de 100 grãos de 25 gramas, teor de proteína de 21% e tempo médio de cozimento de 32 minutos. Todavia estudos ainda devem ser realizados a fim de elucidar sua composição nutricional, interferências de fatores modificam seu desenvolvimento morfofisiológico e expressão dos seus constituintes (MELO *et al.*, 2008).

2.2. Desenvolvimento de Plantas e Mobilização de Proteínas

O ciclo de vida em plantas superiores compreende o desenvolvimento de semente seguido por sua germinação e período pós-germinativo, e o desenvolvimento por meio do crescimento da planta. Para tanto, diversos eventos específicos estão envolvidos nesse processo, como processos fisiológicos e morfológicos (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004).

Diversos estudos sobre os mecanismos regulatórios que controlam os processos morfofisiológicos das plantas só passaram a serem descritos depois do surgimento de técnicas genéticas e moleculares (BEWLEY e BLACK, 1994; GOLDBERG, DE PAIVA e YADEGARI, 1994; HARADA, 1997; RAGHAVAN, 1997). Desse modo, a análise de mudanças nos padrões da expressão de genes que ocorrem durante o desenvolvimento da semente e o crescimento pós-germinativo tem contribuído com indícios sobre os programas regulatórios que controlam ambos os períodos (Figura 2) (PENG e HARBERD, 2002; NAMBARA e MARION-POLL, 2003).

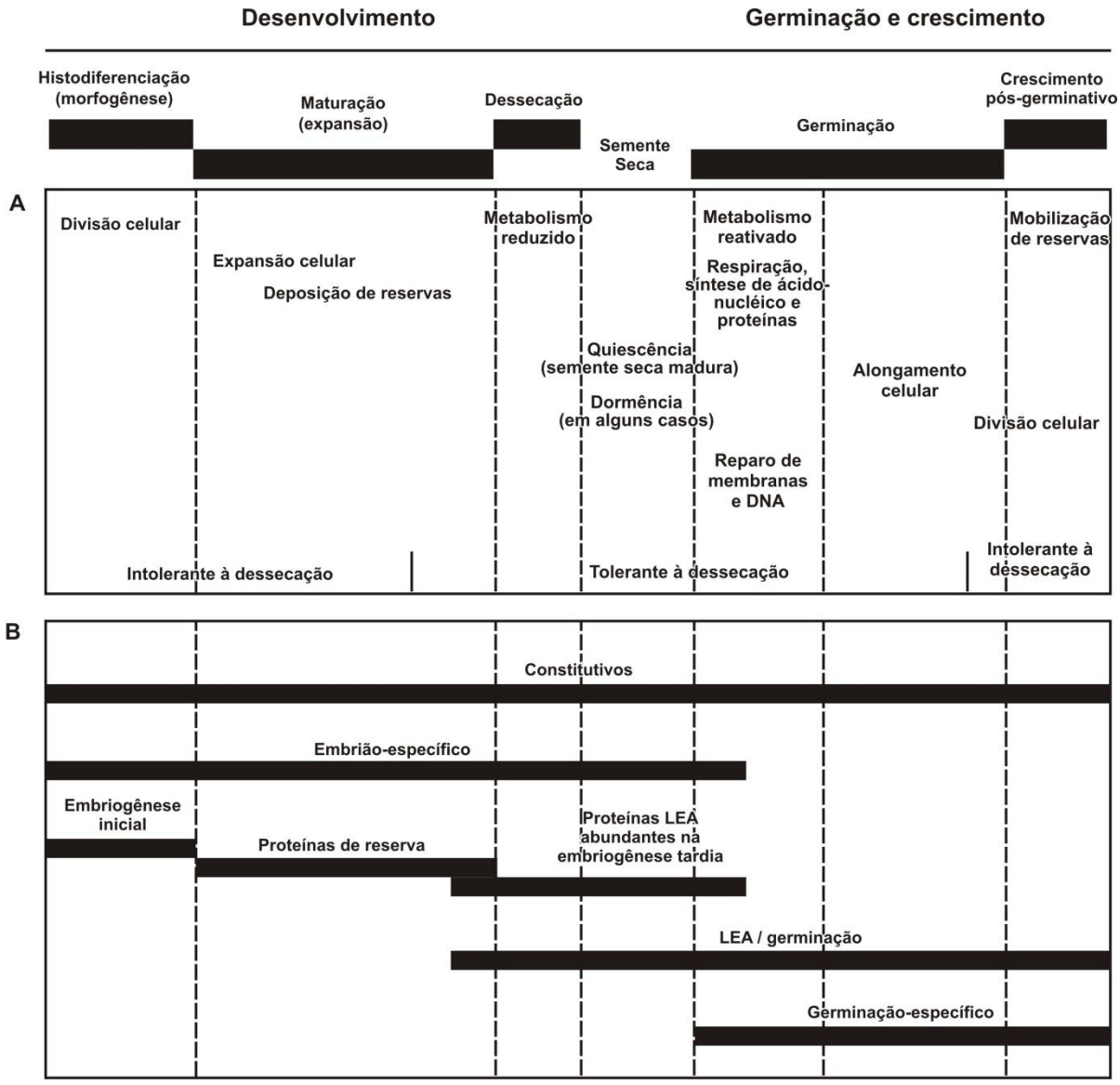


Figura 2 – Desenvolvimento e germinação de semente. Esquema geral de eventos associados com as diferenças de fase de desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo de sementes, incluindo (A) ciclo celular, eventos metabólicos e de reparo e períodos em que a semente (embrião) é intolerante ou tolerante à dessecação; (B) padrão de expressão de genes em estádios específicos, por meio de uma reparação conceptual do acúmulo de sete conjuntos de mRNA que ocorrem durante o desenvolvimento da semente. Adaptada a partir de (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004).

Ao longo das últimas décadas, diversas espécies tornaram-se modelos para estudos da biologia da semente. Como exemplo, a semente de *Lycopersicon esculentum* Mill (tomate) que tem sido usada para estudar a fisiologia e bioquímica do desenvolvimento de sementes, germinação e a dormência (DE CASTRO e HILHORST, 2000). Ao mesmo tempo, a compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento e germinação de sementes contribuirá para o controle do desenvolvimento, principalmente nos níveis molecular e hormonal (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004).

Na maioria das sementes, o desenvolvimento pode ser dividido em três fases confluentes, descritos na Figura 2. A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido ao início primário da divisão celular e ao aumento rápido do peso fresco da semente inteira e do conteúdo de água. Durante essa etapa, a histodiferenciação e a morfogênese da semente acontecem à medida que o zigoto unicelular se submete a divisões mitóticas extensivas, e as células resultantes se diferenciam para dar forma ao plano básico do corpo do embrião (YADEGARI e GOLDBERG, 1997). Concomitantemente, há a formação do endosperma. A divisão de células acaba relativamente cedo no desenvolvimento da semente. Depois disso há uma fase intermediária de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão de células e deposição de reservas como proteínas, lipídios e carboidratos, nos tecidos de armazenamento (cotilédones, endosperma ou megagametófito).

Finalmente, o desenvolvimento da semente termina com uma fase pré-programada da secagem de maturação ou dessecação. Nesse estado, a semente pode sobreviver aos estresses ambientais e, a menos que esteja dormente, recomeçará a atividade metabólica, o crescimento e o desenvolvimento quando as circunstâncias condutoras à germinação e o crescimento forem fornecidas (BEWLEY e BLACK, 1994).

Uma vez fornecidas as condições para desenvolvimento da semente, sua germinação acorrerá a partir da emergência de parte da planta do solo ou da formação de uma plântula vigorosa sobre algum tipo de substrato (BORGHETTI, 2004). Labouriau (1983) considera a semente germinada quando uma das partes do embrião emerge de dentro dos envoltórios, acompanhada de algum sinal de metabolismo ativo, como a curvatura da radícula.

Bewley e Black (1994) e Obroucheva (2000) descrevem que o processo germinativo pode se estender de horas a dias, dependendo da espécie em estudo. Afirmam ainda que quando sementes viáveis secas absorvem água, uma corrente de eventos é iniciada, resultando na emergência da radícula. Na embebição, o metabolismo rapidamente recomeça. Respiração, síntese e consumo de ATP, síntese de fitohormônio, ativação de enzimas e organelas e síntese de RNAs e proteínas são atividades celulares fundamentais intimamente ligadas à germinação e à preparação para o crescimento subseqüente.

Com o início da embebição da semente, o ciclo celular é ativado, assim como a síntese de proteínas, que tem a função de dar suporte à manutenção do crescimento do embrião, normalmente suportando o crescimento da plântula até que ela se torne autótrofa (BEWLEY, 1997; BUCKERIDGE *et al.*, 2004). A síntese de β-tubulina, uma proteína presente durante a divisão e a expansão celular, ocorre no embrião de sementes de tomate (CASTRO *et al.*, 2000) e café (DA SILVA, 2000). Síntese de proteínas relacionadas com o crescimento do embrião funciona como uma preparação inicial para o crescimento da radícula durante a germinação e, após a protrusão, no estabelecimento da plântula (MELO, 2005), porém as reservas protéicas, segundo Mickey (1994), não tem efeito sobre o crescimento da plântula, pois os seus aminoácidos são convertidos geralmente a amidas após a hidrólise do composto.

Diversos experimentos estão sendo voltados para o estudo do funcionamento desses processos bioquímicos e fisiológicos que culminam no desenvolvimento da planta, porém ainda não permitem uma abordagem integrada de todos eles. Por enquanto, a maioria do que se encontra na literatura compreende experimentos isolados em que sementes são submetidas, por exemplo, à ação de um fitormônio, e seus efeitos mediados pela dosagem da atividade enzimática e das proteínas correspondentes pelo aumento de transcrição de genes, dentre outros (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Diversos fitohormônios estão relacionados com a modulação celular de maneira a promover o crescimento da plântula ou alongamento embrionário (DEY e

HARBONE, 1997). Estas substâncias são produzidas em células específicas de todos os tecidos da planta e distribuídas aos vários órgãos via xilema, para controle do metabolismo e expressão gênica. Entre estas substâncias, que vão desde moléculas bem simples, como etileno, até grandes moléculas orgânicas, como as giberelinas, incluem-se as citoquininas (HELDT, 1997).

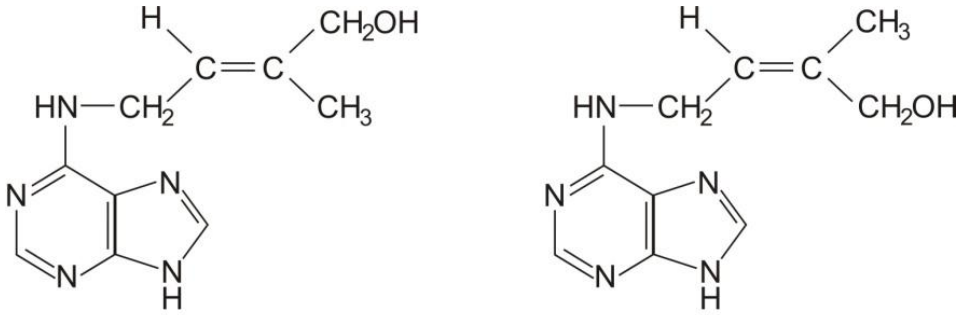
2.3. Citoquininas

As citoquininas são fitohormônios vegetais derivados da adenina que estimulam, através da ativação de replicação e transcrição, a divisão celular e retardo da senescência em vegetais, sendo considerados indicadores para classe de reguladores de crescimentos e foram descobertas durante as pesquisas dos fatores que estimulam a citocinese das células vegetais (MOK, MOK e ARMOSTRONG, 1978).

Haberlandt (1913) descobriu que um composto encontrado no floema tinha a capacidade de estimular a divisão celular. Mais tarde, Johannes Van Overbeek descobriu que o endosperma leitoso de coco também tinha essa habilidade, demonstrando também que várias outras espécies de plantas possuíam compostos que estimulavam a divisão celular (VAN-OVERBEEK, CONKLIN e BLAKESLEE, 1941). Em 1954, Jablonski e Skoog (1954) estendeu o trabalho de Haberlandt mostrando que nos tecidos vasculares continham compostos que

promoviam a divisão celular. Nas décadas de 1940 e 1950, Miller *et al*. (1955), pesquisadores da Universidade de Winsconsin (EUA) testaram inúmeras substâncias com capacidade para iniciar e manter a proliferação de células de medula de fumo em cultura. Eles observaram que a base adenina do ácido nucléico possuía um pequeno efeito promotor então, testaram a possibilidade de que ácidos estimulariam a divisão celular nesses tecidos. Inesperadamente, foi observado que o DNA autoclavado do esperma de arenque apresentava um forte efeito na promoção da divisão celular. Esse efeito decorria da presença de uma pequena molécula no DNA, denominada de cinetina, um derivado da adenina, 6-furfurilaminopurina.

Estudos mais recentes revelaram que a cinetina foi importante para demonstrar que a divisão celular pode ser induzida por uma simples substância química. Diversas citoquininas foram descobertas em quase todas as plantas superiores, bem como musgos, fungos, bactérias, e também no tRNA de muitos procariotos e eucariotos. Hoje existem mais de 200 citoquininas naturais e sintéticas. A citoquinina mais comum, a zeatina, tem um resíduo isopreno hidroxilado na posição trans, ligado ao nitrogênio amino da adenina. Nos vegetais superiores, a zeatina ocorre tanto na configuração cis e trans, formas essas que podem ser interconvertidas por uma enzima chamada de zeatina isomerase (Figura 3) (MOK, MOK e ARMOSTRONG, 1978).



***trans*-Zeatina** ***cis*-Zeatina**

6-(4-Hidroxi-3-metilbut-2-enilamino)purine

Figura 3 – Estruturas da zeatina na conformação *trans* e *cis*.

Concentrações de citoquininas são mais elevadas nas regiões meristemáticas e áreas de potencial de crescimento contínuo, tais como raízes, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes (ARTECA, 1996; MAUSETH, 1991; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1992; SALISBURY e ROSS, 1992). Estas parecem se mover pelo xilema até a parte aérea, juntamente com a água e os sais minerais. Entretanto as raízes não são as únicas partes capazes de sintetizar citoquininas. Por exemplo, os embriões jovens de milho sintetizam citoquininas, assim, como as folhas jovens em desenvolvimento, frutos jovens e possivelmente muitos outros tecidos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Embora tenham sido descobertas como fatores da divisão celular, as citiquininas podem atuar em diversos eventos fisiológicos em que a resposta irá variar consoante o tipo de citoquinina e espécies de plantas (DAVIES, 1995; MAUSETH, 1991; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1992; SALISBURY e ROSS,

1992). Elas estimulam a morfogêneses (formação de gemas) em cultura de tecidos, estimulam o crescimento das gemas laterais da dominância apical, aumentam a expansão foliar resultante do alargamento da célula, pode aumentar a abertura estomática em algumas espécies, promove a conversão de etioplastes em cloroplastos através da estimulação da síntese de clorofila, retarda a senescência, estimulam ou inibem uma variedade de processos fisiológicos, metabólicos, bioquímicos e de desenvolvimento quando aplicadas às plantas superiores, sendo cada vez mais evidente que as endógenas exercem importante função na regulação destes eventos (MAUSETH, 1991; MOK, 1994, WERNER *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, foi depositada a patente de uma citoquinina vegetal descoberta por Tomas Werner e Thomas Schmulling (19/02/2008). Em seu registro, consta como efeitos desta substância: crescimento de raízes e/ou potencialização da formação de raízes laterais ou adventícias e/ou alteração do geotropismo das raízes pela ativação da expressão de uma citoquinina vegetal (SCHMULLING e WERNER, 2008). No âmbito da patente, estão incluídos, além das seqüências de ácidos nucléicos codificadores da citoquinina, vetores e células transgênicas que contenham tais seqüências. As citoquininas, na patente, estão relacionadas com aumento de rendimento, vigor, modificação da razão folhas/raízes entre outras características. Esta patente está descrita como regulador do crescimento da planta ou herbicida.

O crescimento da planta está ligado ao balanço citoquininas/auxinas. Enquanto as citoquininas induzem a divisão celular, as auxinas induzem a

elongação das células promovendo o crescimento de brotos. Células vegetais já diferenciadas normalmente param de se multiplicar. Adicionando-se citoquininas e auxinas estas células diferenciadas podem ser induzidas a recomeçarem a se multiplicar formando massas disformes de células, os “callus”. Em cultura de tecidos, a razão citoquininas/auxinas é utilizada para induzir estas células na formação de brotos (maior proporção de citoquininas) ou raízes (maior proporção de auxinas). O uso de citoquininas em escala comercial como estimuladores de crescimento vegetal é difundido, p. ex. FARTUM® DRY FOLIAR e AGROKELP (TORRES, CALDAS e BUSO, 1998).

A metabolização das citoquininas nos tecidos vegetais é realizada rapidamente a partir da sua conversão em suas respectivas formas nucleosídea e nucleotídea. Tais interconversões provavelmente envolvam enzimas comuns ao metabolismo das purinas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Dietrich *et al*. (1995) demonstraram uma correlação temporal entre o decréscimo dos níveis de citoquinina e o aumento dos níveis de citoquinina oxidase nos núcleos desenvolvedores do milho. Tal fato leva a crer que uma das funções da citoquinina oxidase (CKO) pode ser destruir a citoquininas endógenas no momento preciso de seu desenvolvimento.

2.3.1. Citoquininas oxidases na metabolização da citoquinina nos tecidos vegetais

A degradação citoquinina é um importante processo nos componente da rede metabólica que controla os níveis de metabólitos de citoquinina e sua distribuição nos sistemas vegetais. A existência, em tecidos vegetais de máquinas enzimáticas capaz de degradar citoquinina aos produtos inativos foi demonstrada nos primeiros estudos do metabolismo de citoquinina (ARMSTRONG, 1994).

As citoquininas são seletivamente inativada a partir da clivagem oxidativa da sua cadeia lateral, por uma enzima que catalisa sua degradação, denominada citoquinina oxidase (HARE e VAN STADEN, 1994). Pesquisas recentes indicam que essa enzima utiliza um aceptor de elétrons que não oxigênio (BILYEU *et al.*, 2001; GALUSKA *et al.*, 2001; LASKEY *et al.*, 2003) e foi reclassificada pelo Comitê de Nomenclatura de União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em 2001 de enzimas citoquinina desidrogenase (CE 1.5.99.12). A reação catalisada por essa enzima é mostrado esquematicamente na (Figura 4) (GALUSKA *et al.*, 2001).

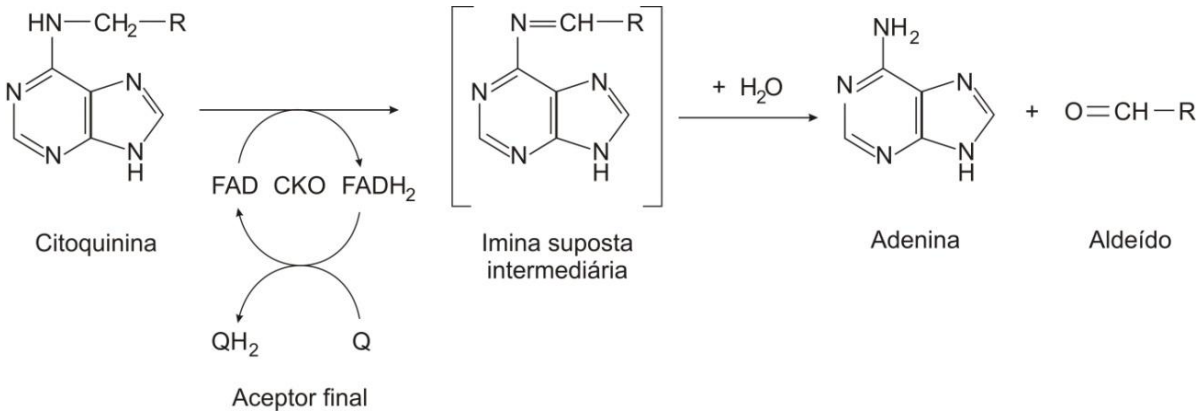


Figura 4 – Degradação da citoquinina pela enzima citoquinina oxidase.

A CKO foi publicada como um membro da familia oxidorredutase após ter sido clonada do milho. Ela mostrou-se conter um co-fator FAD (Flavina Adenina Dinucleotideo) e ligação covalente com flavina (MORRIS *et al.*, 1999; BILYEU *et al.*, 2001). O FAD da CKO quando reduzido a $FADH_2$, oxida a imina secundária da cadeia lateral da citoquinina, que passa a imina intermediária. Esta imina formada sofre hidrólise, promovendo a liberação de uma amina. Assim, a citoquinina é convertida em adenina e com a quebra da sua cadeia lateral um grupo aldeído correspondente também é resultante (HARE e VAN STANDEN, 1994; GALUSKA *et al.*, 2000, 2001; MOK e MOK, 2001).

Muitos tecidos vegetais possuem a enzima citoquinina oxidase, a qual cliva a cadeia lateral da zeatina (ambas *cis* e *trans*), mas não cliva seus derivados o-glicosídeos. A CKO inativa irreversivelmente as citoquininas, podendo ser importante na regulação ou limitação dos efeitos da citoquinina. A atividade da enzima é

induzida por altas concentrações de citoquinina devido, pelo menos em parte, ao aumento dos níveis do RNA de um subgrupo de genes.

As citoquininas oxidases ter sido discutida em várias espécies vegetais, incluindo *Vinca rósea* L. (SCOTT *et al*., 1982; McGRAW e HORGAN, 1983), feijão (*Phaseolus vulgaris L.* e *lunatus*) (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986; KAMÍNEK e ARMSTRONG, 1990), trigo (*Triticum aestivum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (PACES, WERSTIUK e HALL, 1971; MOTYKA e KAMÍNEK, 1992), caryophyllus dianthuns, soja (*Glycine Max* L.), arroz (*Oriza sativa* L.) e milho (*Zea mays* L.). Todas estas citoquininas oxidases de plantas têm preferência à substratos semelhante a isoprenóides (iP) e zeatina (Z), mas mostram pouca ou nenhuma reatividade com citoquininas de cadeia aromática. Todas apresentam atividade reforçada com a presença de cobre, além de imidazol. Entretanto, estas enzimas apresentam variação significativa na atividade específica e peso molecular. Isto pode estar relacionado com a ocorrência de espécies não-glicosiladas e glicosiladas da proteína, entre e dentro das espécies.

Os pesos moleculares das citocininas oxidases descritas em diversas fontes vegetais têm sido estimados por filtração em gel (Tabela 1). Os valores registrados variam de 25.100 para as enzimas de tecido tumoral da coroa de *V. rósea* L., a aproximadamente 90.000 para a enzima de embriões de *Z. mays* e inclui um valor intermediário de 40.000 reportados para a enzima de gérmen de trigo. O peso molecular da citocinina oxidase de grãos de milho foi estimada pela Eletroforese de gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-

PAGE), e o valor obtido por este método (78 kDa) é razoável de acordo com as estimativas provenientes de filtração em gel (88 kDa e 94 kDa) (MOK e MOK, 1994).

Tabela 1 – Propriedades da atividade de citoquininas oxidases isoladas em diferentes tecidos de plantas

Planta de Origem	pH ótimo	Peso Molecular	Afinidade por ConA[1]
Tecidos de "callus" de *Nicotiana tabacum*	9,0	–	–
Tecidos de "callus" de *Phaseolus vulgaris*	6,5	67.000	Sim
Tecidos de "callus" de *Phaseolus lunatus*	8,4	60.000	Não
Gérmen de *Triticum aestivum*	7,5	40.000	Sim
Tecido tumoral da coroa de *V. rósea* L.	7,0	25.100	–
Grãos de Zea mays	–	<67.000	Sim

1/ Concanavalina A.

A CKO de diversas plantas foram descritas como glicoproteínas, uma vez que foi evidenciados afinidade das mesmas para a lectina Concanavalina A (ConA) (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986). A CKO de *Z. mays* L. e germe de trigo também foram reportados por se ligar a lectina ConA. No entanto, a afinidade por ConA não é uma propriedade universal para todas as CKO. A citoquinina oxidase de tecido de "callus" de *P. lunatus* L., cv Kingston não é reconhecida por ConA. Desse

modo, a enzima dessa cultivar de feijão não é glicosilada, ou o seu padrão de glicosilação é significativamente diferente das outras atividades citoquinina oxidase até os presentes estudos (BILYEU *et al*., 2001). Chatfield e Armstrong (1986), mostraram que cerca de 20 % da citoquinina oxidase de *P. vulgaris* L. não se liga à coluna de ConA, podendo se tratar de proteínas não-glicosiladas, isoformas ou mesmo produto de degradação obtidos durante os procedimentos de isolamento.

Em *Arabidopis,* a CKO é codificada por uma família multigênica, cujos membros apresentam padrões distintos de expressão. Curiosamente, vários genes possuem sinais secretores putativos, sugerindo que pelo menos algumas dessas enzimas possam ser extracelulares (SCHMÜLLING *et al*., 2003).

Um gene que codifica a CKO foi primeiramente identificado em milho. Dietrich *et al*. (1995), Houba-Herin *et al*. (1999) e Morris *et al*. (1999), demonstraram uma correlação temporal entre o decréscimo dos níveis de citoquinina (CK) e o aumento dos níveis de citoquinina oxidase nos núcleos desenvolvedores do milho.

Outro papel alternativo para a CKO de milho pode ser a proteção contra a invasão de patógenos já que os mesmos são, sabidamente, capazes de produzir CK (MILLS e VAN STADEN, 1978; ANGRA, MANDAHAR e GULATI, 1990).

A caracterização molecular e bioquímica de CKO de milho foi feita por (BILYEU et al., 2001). A expressão de CKO de milho em *Pichia pastoris* (Guilliem) levou à produção de grandes quantidades de CKO recombinante e possibilitou os estudos estruturais e de cinética. Estes estudos revelaram que a potencialidade da

ação das CKO parece ser característica das diferentes variedades de plantas. Em uma variedade de *P. lunatus* L., a *trans*-zeatina se mostrou 3x mais efetiva que a diidrozeatina e 30x mais efetiva que a *cis*-zeatina. As atividades de N^6-isopentiladenina e $N^6(\Delta^2$-isopentenil) adenina foram bem similares. No entanto, numa variedade de *P. vulgaris* L. a diidrozeatina foi pelo menos 30x mais ativa que ambas *trans* e *cis*-zeatina, e a N^6-isopentiladenina foi 100x mais ativa que $N^6(\Delta^2$-isopentenil) adenina (MOK, MOK e ARMOSTRONG, 1978).

Cinco diferentes substratos foram utilizados em estudos de cinética das reações de CKO de milho (*Zea mays* L.). As correlações entre a cinética de tais reações e a estrutura cristalina da CKO foram estabelecidas e os estudos indicaram que a enzima reconhece as citoquininas *a priori*, interagindo com o resíduo adenina e, a partir daí, acomodando os vários tipos de cadeias laterais. As clivagens catalíticas de todas as citoquininas estudadas ocorreram com a formação inicial de um intermediário único, um complexo binário entre a imina correspondente à citoquinina e a enzima reduzida (POPELKOVÁ *et al.*, 2006).

Assumindo que existem duas espécies da citoquinina oxidase de *Zea mays* L., o estudo demonstrou que, para as citoquininas que rapidamente reduzem o co-fator flavina, isopenteniladenina e *trans*-zeatina, a interação com a citoquinina oxidase produz um complexo onde o derivado imina da citoquinina está firmemente ligado próximo à flavina, no topo de seu anel isoaloxazina. A N-metilação da isopenteniladenina afeta profundamente a reatividade das citoquininas com a enzima, o resultado é que ambas as espécies enzimáticas atuam diferentemente no

processo de clivagem deste substrato. A clivagem da N-metil-isopenteniladenina ocorre lentamente através de um mecanismo diferente que resulta na produção de uma imina. Este estudo demonstra claramente a importância da estrutura da citoquinina oxidase no estabelecimento das rotas metabólicas das citoquininas.

A relação entre citoquinina oxidase e produção de grãos de arroz foi demonstrada por Ashikari *et al*. (2005), a expressão reduzida de citoquinina oxidase em linhagens isogênicas de arroz (*Oriza sativa* L.) provoca a acumulação de citoquininas em meristemas inflorescentes e aumenta o número de órgãos reprodutivos aumentando, assim, o rendimento de grãos.

Chatfield e Armstrong (1986) demonstraram a relação entre o aumento de níveis de citoquinina exógenas em cultura de “callus” de *P. vulgaris* L. e elevados níveis de atividade de citoquinina oxidase. Este aumento da atividade enzimática ocorre rapidamente e parece necessitar de RNA e síntese protéica. Tais diferenças de potências das citoquininas em espécies tão próximas foram também explicadas por Mok *et al*. (1982) quando demonstraram que, em *P. vulgaris* L., citoquininas que têm cadeias laterais insaturadas não têm tanta efetividade na promoção de crescimento de “callus” graças à sua susceptibilidade à citoquinina oxidase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade mulatinho, cultivar BRS Agreste obtidas de Ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU) do Programa de Melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no Município de Santo Antônio de Goiás, GO, na safra agrícola de fevereiro/2008.

As sementes apresentavam cor bege sem brilho, uniformidade de coloração e tamanho de grão, massa média de 100 grãos de 25 gramas (Figura 5).

Figura 5 – Sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade mulatinho, cultivar BRS Agreste.

Os grãos da cultivar BRS Agreste foram armazenados em sacos Kraft sob temperatura de ar refrigerado em torno de 21 °C e umidade relativa de 20 %. Parte do material foi submetida a caracterização físico-química e bioquímica, e parte levada à germinação para posterior identificação e isolamento da citoquinina oxidase.

Para o preparo da farinha de *P. vulgaris* L., as sementes foram trituradas em multiprocessador e armazenadas em frascos hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente até uso posterior nas análises de físico-química e caracterização bioquímica.

3.2. Caracterização Físico-Química da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste

A caracterização físico-química das sementes desta cultivar de feijão mulatinho foi conduzida nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, em algumas análises se fez necessária parceria com os Laboratórios de Bromatologia de Alimentos da Faculdade de Tecnologia Centec – FATEC Cariri, Química Analítica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ e de Química Analítica da Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC/RJ.

3.2.1. Determinação de umidade

Para a determinação de umidade, cápsulas previamente taradas, contendo amostras de 5,0159 ± 0,0320 g de farinha de sementes de *P. vulgaris* foram colocadas em estufa a 105 ºC por 24 horas. Após este tempo foram colocadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, sendo então pesadas. O teor de umidade foi feito em quadruplicada e calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, e expresso em mg/100g de massa seca, baseado no método (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976).

3.2.2. Determinação de proteínas a partir do teor de nitrogênio total

A determinação foi feita pelo método Macro Kjedhal segundo metodologia (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976). Foram pesadas em balança analítica 1,0267 ± 0,2520 g de amostra e transferidas para balão de Kjeldahl, adicionando 40 mL de solução digestora (sulfato de cobre, sulfato de zinco, ácido sulfúrico P. A. nas proporções 1:10:60 – m/m/v). A mistura foi levada para aquecimento em bloco digestor, a princípio lentamente, mantendo a temperatura de 50 ºC por 1 hora. Em seguida, elevada a temperatura gradativamente até atingir 350 – 400 ºC. Quando a fase líquida se tornou límpida e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, a mistura foi retirada do aquecimento, deixada esfriar e foram adicionados em torno de 100 mL de água destilada.

Foi acoplado ao destilador o erlenmeyer contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N com 3 gotas de indicador vermelho de metila. Foi conectado o balão de Kjeldahl ao destilador e adicionados imediatamente 100 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 50 % até a obtenção de solução de cor negra, em seguida foram adicionados 0,5 g de zinco em pó e 5 gotas de fenolftaleína. Procedeu-se a destilação, deixando-se destilar cerca de 2/3 do volume inicial. Recolhido o volume necessário para a completa destilação da amônia, foi titulado o excesso de H_2SO_4 0,1 N com solução de NaOH 0,1 N até a viragem do indicador vermelho de metila para a cor amarela palha. Uma prova em branco foi feita apenas com os reagentes.

As análises do teor de proteína foram feitas quadruplicadas e o percentual calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\% \boldsymbol{P} = \frac{\left[\left(\boldsymbol{V_{H_2SO_4}} \times \boldsymbol{N_{H_2SO_4}}\right) - \left(\boldsymbol{V_{NaOH}} \times \boldsymbol{N_{NaOH}}\right)\right] \times \mathbf{0{,}0014} \times \mathbf{100} \times \mathbf{6{,}25}}{\boldsymbol{Pa}} \qquad (3.1),$$

onde:

$(V_{H_2SO_4}\text{-}V_{NaOH})$= Mililitros de H_2SO_4 0,1 N - Mililitros gastos de NaOH 0,1N

0,0014 = Fator do nitrogênio

6,25 = fator de conversão da relação de $\frac{\text{nitrogênio}}{\text{proteína}}$ de acordo com o produto

Pa = Peso da amostra em gramas

3.2.3. Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas)

Na determinação do teor de cinzas foram utilizados cadinhos de porcelana previamente tarados contendo 15,0037 ± 0,0074 g de farinha de *P. vulgaris* foram colocados em mufla a 550 ºC até incineração completa do material orgânico. Em seguida os cadinhos foram mantidos em dessecador contendo sílica-gel onde permaneceram até atingirem a temperatura ambiente. Os cadinhos contendo as amostras incineradas foram pesados e o teor de cinzas, calculado pela relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra, sendo o resultado expresso em mg/100 g de massa seca, segundo método (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976). Foram feitas quadruplicadas das análises.

3.2.4. Determinação de Minerais

Para determinação dos minerais presentes na farinha de sementes de *P. vulgaris* L. foram utilizadas as cinzas provenientes da incineração da amostra. O procedimento do tratamento das amostras está descrito no fluxograma (Figura 6).

Na obtenção da solução clorídrica inicialmente as cinzas contidas no cadinho foram transferidas para erlenmeyer, e lavadas com ácido clorídrico (HCl) concentrado P.A. Foi efetuado tratamento com 10 mL de água régia (1 ácido nítrico (HNO_3) concentrado P.A : 3 HCl concentrado P.A – v/v), e o erlenmeyer colocado em

placa de aquecimento e levado à secura. Em seguida foram adicionados 10,0 mL de HCl concentrado P.A e a solução foi novamente levada à secura.

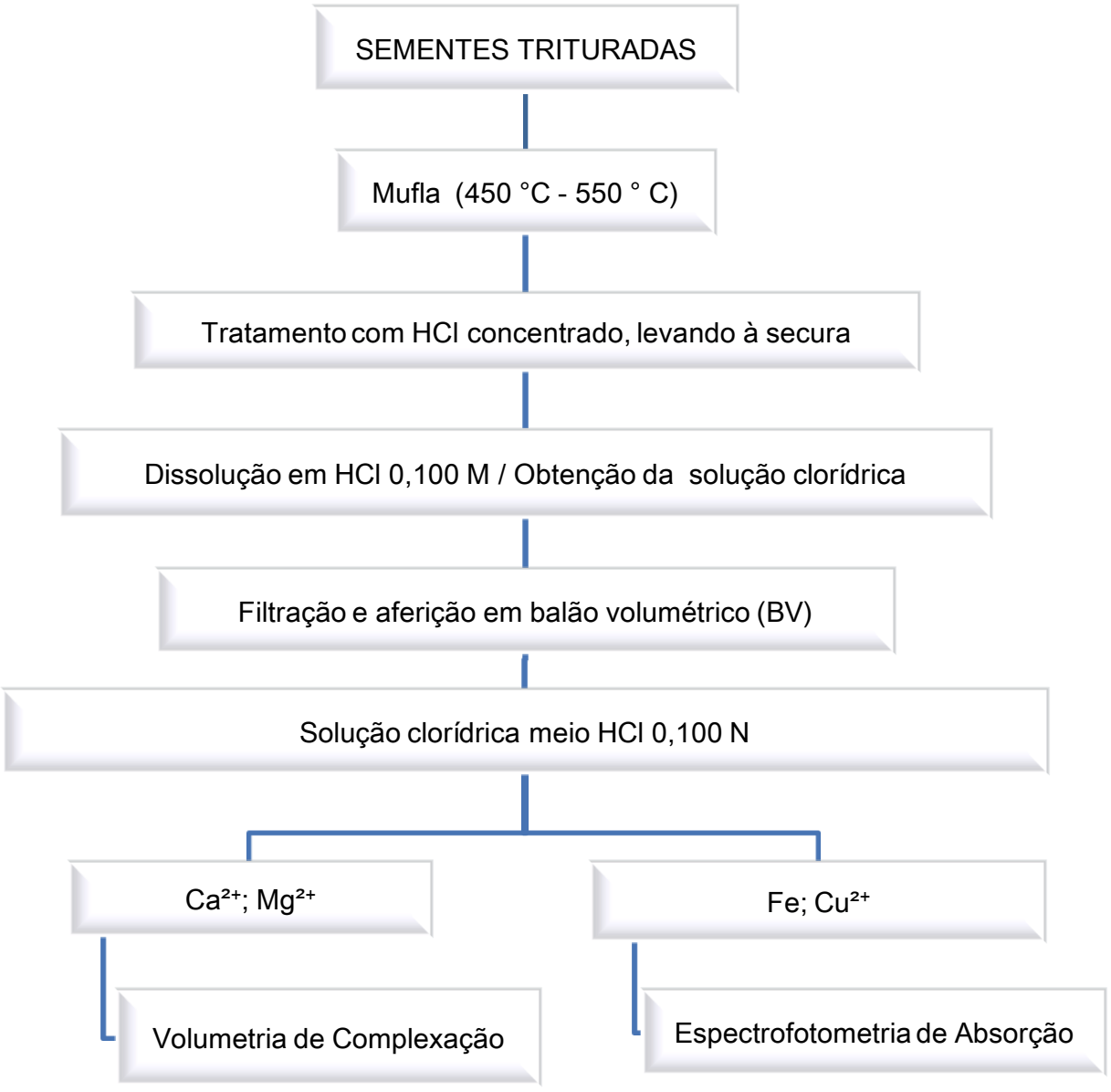


Figura 6 – Tratamento das amostras de sementes para as determinações de Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe, Cu^{2+}.

Este tratamento foi repetido por três vezes. Após a última secura foi adicionado HCl 0,1 N (≈ 50,0 mL), e mantido leve aquecimento para dissolução de todo o resíduo. Feito isto, o conteúdo filtrado com papel filtro ativado foi transferido quantitativamente para BV de 250 mL e avolumado à marca com HCl 0,1 N.

Alíquotas desta solução foram utilizadas para determinação de cálcio e magnésio pelo método de volumetria de complexação; ferro e cobre por espectrofotometria de absorção.

3.2.4.1. Cálcio

Para determinação de cálcio foram tomadas alíquotas de 10,00 mL de solução clorídrica transferindo a erlenmeyer. Foi adicionado 1,0 mL de solução de NaOH (2,0 M) gota a gota, sob agitação até pH_3O^+ do meio ≈ 12. Posteriormente foram adicionados 0,05 g de tioacetamida, homogeneizado e avolumado até a marca de 50 mL com água. A solução foi levada para chapa aquecedora, aquecendo até temperatura entre 60 °C – 80 °C. A solução foi filtrada com papel filtro ativado, e avolumada à 100 mL com água. A solução resultante foi resfriada em água gelada até a temperatura do meio se manter em torno de 26° – 27 °C e, nestas condições, foi adicionado 1,0 mL de calcon até ser obtida intensa coloração vermelhada. Finalmente, foi efetuada titulação contra ácido etilenodiamino tetra-acético (E.D.T.A.) de molaridade conhecida em triplicata até aparecimento de coloração azul.

O volume de E.D.T.A. gasto nas titulações foi reportado e utilizado para quantificar o teor de cálcio na amostra, seguindo as fórmulas abaixo:

$$\% \, \boldsymbol{Ca^{+2}} = \frac{\boldsymbol{V_{(E.D.T.A)} \times M_{(E.D.T.A)} \times PM_{(Ca^{+2})}}}{\boldsymbol{m_{\substack{amostra \\ Total}} \times \frac{V_a}{V_{(BV)}}}} \times \mathbf{100} \qquad (3.2),$$

onde:

V_{EDTA}= Volume de EDTA gasto na amostra – Volume de EDTA gasto no branco (mL)

$M_{(E.D.T.A)}$= Molaridade do E .D.T.A

$PM_{(Ca^{2+})}$= Peso Molecular do Cálcio em (g)=0,04008 g

$m_{\substack{amostra \\ Total}}$= massa da mostra *in natura* (g).

V_a= Volume de alíquota de amostra tomada para análise (mL)

$V_{(BV)}$= Volume do balão de aferição da solução clorídrica (mL).

$$\boldsymbol{n^o de\ ppm\ de\ Ca^{+2}} = \% \, \boldsymbol{Ca^{+2} x\ 10^4} \qquad (3.3)$$

$$\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{100\ g}}\ \boldsymbol{de\ Ca^{+2}} = \frac{\boldsymbol{n^o de\ ppm\ de\ Ca^{+2}}}{\mathbf{10}} \qquad (3.4)$$

3.2.4.2. Magnésio

A determinação do teor de magnésio partiu da análise de determinação conjugada de cálcio e magnésio. O teor de magnésio foi obtido da diferença entre o teor de cálcio e magnésio conjugados, e a quantificação de cálcio na amostra, determinada anteriormente.

Para tanto, foi tomada alíquota de 10,00 mL de solução clorídrica, transferida a erlenmeyer e adicionados imediatamente 10,0 mL da solução de Tampão Amoniacal (pH_3O^+ = 10), sob agitação até que pH_3O^+ do meio ≈ 10. Foram adicionados 0,05 g de tioacetamida para eliminação de interferentes, homogeneizado e avolumado até 50,00 mL com água. A solução foi levada para chapa aquecedora até obtenção da temperatura de 60 °C – 80 °C. A solução foi filtrada com papel filtro ativado e o precipitado lavado com 10 mL de tampão amoniacal (pH_3O^+ = 10), completando o volume de 100,00 mL com água. O pH_3O^+ foi mantido em 10 e a temperatura do sistema em torno de 50 °C – 60 °C. Nestas condições foi adicionado 1,0 mL de preto de eriocromo (EBT) (0,1 %) até obter uma intensa coloração vermelha. A solução foi titulada contra E.D.T.A. de molaridade conhecida em triplicata até aparecimento de coloração azul.

O volume de E.D.T.A. gasto nas titulações foi reportado e utilizado para quantificar o teor de cálcio e magnésio conjugados na amostra. A quantidade magnésio foi determinada a partir das fórmulas abaixo:

$$V_{(Ca^{+2};Mg^{+2})} = V_{(Ca^{+2})} + V_{(Mg^{+2})} \qquad (3.5)$$

$$V_{Mg^{+2}} = [V_{(Ca^{+2};\, Mg^{+2})} - V_{B_{(Ca^{+2};\, Mg^{+2})}}] - [V_{(Ca^{+2})} - V_{B_{(Ca^{+2})}}] \quad (3.6)$$

$$\%\, \boldsymbol{Mg^{+2}} = \frac{\boldsymbol{V_{(E.D.T.A)} \times M_{(E.D.T.A)} \times PM_{(Mg^{+2})}}}{\boldsymbol{m_{\substack{amostra \\ Total}} \times \frac{V_a}{V_{(BV)}}}} \times \mathbf{100} \quad (3.7),$$

Onde:

V_{EDTA}= Volume de Mg^{+2}.

$M_{(E.D.T.A)}$= Molaridade do E .D.T.A

$PM_{(Mg^{+2})}$= Peso Molecular do Magnésio em (g) = 0,024305 g/mol^{-1}

$m_{\substack{amostra \\ Total}}$= massa da mostra *in natura* (g).

V_a= Volume de alíquota tomada para análise (mL).

$V_{(BV)}$= Volume do balão de aferição da solução clorídrica (mL).

$$\boldsymbol{n^o de\ ppm\ de\ Mg^{+2}} = \%\, \boldsymbol{Mg^{+2} x\ 10^4} \quad (3.8)$$

$$\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{100\ g}}\ \boldsymbol{de\ Mg^{+2}} = \frac{\boldsymbol{n^o de\ ppm\ de\ Mg^{+2}}}{\mathbf{10}} \quad (3.9)$$

3.2.4.3. Ferro

Para determinação de ferro na amostra foi utilizado o método ortofenantrolina por espectrofotometria. Para isso, foram preparadas inicialmente soluções estoques de ferro (10 e 100 ppm de ferro) que foram utilizadas na construção da curva de calibração que abrangeu um intervalo de 0,00 ppm – 0,20 ppm – 0,40 ppm – 0,60 ppm – 0,80 ppm – 1,00 ppm – 2,00 ppm – 4,00 ppm – 5,00 ppm de Ferro, sendo verificado o comprimento de onda (λ) ótimo para a absorção.

Para obtenção dos pontos da curva de calibração, a partir de alíquotas de soluções estoque de 10 ppm e de 100 ppm de Fe diluídas com HCl 1,0 N, foram preparados 5,00 mL das soluções de concentrações desejadas.

A cada uma das soluções padrão foram adicionados 5,00 mL de tampão acético (pH_3O^+ = 3,60); 5,00 mL de cloridrato de hidróxiamonium (10 %); 5,00 mL de orto-fenantrolina (0,5 %). As misturas foram homogeneizadas, e deixadas em repouso durante 3 horas. Decorrido o tempo, as alíquotas contidas nos tubos de ensaio foram transferidas aos respectivos B.V. 50,00 mL aferindo a marca pela adição de água.

A verificação do λ máximo para a absorção do complexo foi efetuado a partir da solução mais diluída (0,20 ppm de Fe), com a varredura feita no intervalo de comprimento de onda (490 – 550 nm), com acréscimos de 5 nm.

A preparação da amostra para verificação do seu teor de ferro partiu da tomada de alíquota de 5,00 mL da solução clorídrica obtida das cinzas, transferida para tubo de ensaio. Foram adicionados 5,00 mL do tampão acético (pH_3O^+ = 3,60), 5,00 mL do cloridrato de hidroxiamonium (10 %), 5,0 mL de orto-fenantrolina (0,5 %), homogeneizados, deixando em repouso por 3 horas. O teste em "branco" foi preparado seguindo os mesmos passos de preparação da amostra, porém substituindo a amostra por HCl 0,1 N. Após o tempo necessário, a amostra foi levada ao volume de 50,00 mL com água destilada. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda determinado na varredura. A concentração de ferro na amostra foi calculada a partir da equação da reta obtida na curva de calibração. A ordenada do gráfico plotado foi a absorbância lida e a abscissa, a concentração dos padrões expressa em $\frac{\mu g}{mL}, representada\ por\ C$. Nessas condições, segue-se:

$$\boldsymbol{nº\ ppm\ de\ Fe} = \frac{\boldsymbol{mFe}}{\boldsymbol{m_{\frac{amostra}{total}} \times \frac{V_a}{V_{BV}}}} \qquad (3.10)$$

$$\boldsymbol{mFe} = \boldsymbol{V_a \times C} \qquad (3.11)$$

Então,

$$\boldsymbol{nº ppm\ de\ Fe} = \frac{\boldsymbol{V_a \times C}}{\boldsymbol{m_{\frac{amostra}{total}} \times \frac{V_a}{V_{BV}}}} \qquad (3.12)$$

$$\boldsymbol{\frac{mg}{100\ g}\ de\ Fe} = \frac{\boldsymbol{nº\ de\ ppm\ de\ Fe}}{\boldsymbol{10}} \qquad (3.13)$$

Onde:

V_a = Volume de alíquota de amostra tomada para análise (mL).

$V_{(BV)}$ = Volume do balão de aferição da solução clorídrica (mL).

3.2.4.4. Cobre

O método espectrofotométrico foi utilizado para quantificar o teor de cobre na amostra. Para tanto a curva padrão de calibração de cobre foi construída com pontos que abrangeram concentrações de 1,00 a 5,00 ppm de Cu^{2+} com acréscimos de uma unidade. Na construção dos pontos foram tomados 10,00 mL dos padrões (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ppm de Cu^{+2}) e transferidos para proveta de 25,00 mL. Adicionou-se 2,5 mL de tampão amoniacal (pH_3O^+ = 8,5), 2,50 mL de dietietilcarbamato de sódio $(C_2H_5)_2NCS_2Na$ (1 %) e 10,0 mL de clorofórmio ($CHCl_3$) O sistema foi homogeneizado e deixado em repouso até verificação de boa separação de fases. A fase aquosa foi descartada e efetuadas 3 lavagens com 5 mL de água, descartadas as águas de lavagem. A fase clorofórmica foi filtrada em papel filtro ativado e coletada para leitura no espectrofotômetro.

A determinação do λ (nm) de máxima absorção foi realizada a partir da solução mais diluída (1,00 ppm de Cu^{2+}) em varredura de faixa de comprimento de onda entre 400 nm e 480 nm, com acréscimos de 5 nm.

Para a amostra de feijão procedeu-se da mesma maneira, utilizando a solução clorídrica feita a partir das cinzas da amostra. A concentração de cobre na amostra foi obtida a partir da equação da reta obtida na curva de calibração. A ordenada do gráfico plotado foi a absorbância lida e a abscissa, a concentração dos padrões expressa em $\frac{\mu g}{mL}, representada\ por\ C$. Desse modo, segue-se:

$$\boldsymbol{n^{\underline{o}}\ ppm\ de\ Cu^{2+}} = \frac{\boldsymbol{mCu^{2+}}}{\boldsymbol{m_{\substack{amostra\\total}} \times \frac{V_a}{V_{BV}}}} \qquad (3.14)$$

$$\boldsymbol{mCu^{2+}} = \boldsymbol{V_a \times C} \qquad (3.15)$$

Então,

$$\boldsymbol{n^{o}ppm\ de\ Cu^{2+}} = \frac{\boldsymbol{V_a \times C}}{\boldsymbol{m_{\substack{amostra\\total}} \times \frac{V_a}{V_{BV}}}} \qquad (3.16)$$

$$\boldsymbol{\frac{mg}{100\ g}\ de\ Cu^{2+}} = \frac{\boldsymbol{n^{o}\ de\ ppm\ de\ Cu^{2+}}}{\boldsymbol{10}} \qquad (3.17)$$

Onde:

V_a = Volume de alíquota de amostra tomada para análise (mL).

$V_{(BV)}$ = Volume do balão de aferição da solução clorídrica (mL).

3.2.4.1. Determinação de alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco

O método utilizado para quantificar os teores de alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco foi a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP – MS).

Para tanto, inicialmente procedeu-se o preparo da amostra, pesando-se 10,0017 g de farinha de feijão comum BRS Agreste. Esta foi submetida à extração de todo conteúdo lipídico, mesmo que não significativo, com dois ciclos de 60 mL de hexano e posteriormente com cetona. Após esse procedimento as amostras foram transferidas para cápsulas de porcelanas e submetidas à aquecimento de 400 ºC por 3 horas em forno microondas.

O material incinerado foi resfriado e tratado com ácido nítrico (HNO_3) concentrado e 8 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 % m/m. A mistura foi aquecida em bico de busen até eliminação da solução e branqueamento da amostra. Em seguida levou-se o material para mufla a temperaturas entre 480 e 520 ºC, até a cinzas. Ao final do processo (aproximadamente 1,5 dia), transferiu-se para becker de 25 mL e preparou-se solução clorídrica com retomadas de três volumes de 1 mL de HCl concentrado sob aquecimento, sendo que cada volume foi adicionado após a secura do adicionado anteriormente. Feito isto, dissolveu-se o resíduo com 50 mL de HCl 0,1 N, filtrou-se com papel filtro ativado transferiu-se quantitativamente para B.V.

de 100 mL, avolumado à marca com HCl 0,1 N. Foi preparado um “branco” com todos os reagentes na mesmas quantidades e seguido o mesmo procedimento.

Para a determinação do teor dos minerais, foi utilizado o equipamento espectrômetro de massa Elan-5000 (Perkin Elmer Sciex) do laboratório de ICP-MS da PUC-Rio, conforme Figura 7.

Figura 7 – Espectrômetro de Massa, Elan 5000 (Perkin Elmer-Sciex), do laboratório de ICP-MS da PUC-Rio.

Na introdução da amostra foi empregada câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Camberwell, Austrália) em conjunto com nebulizador concêntrico tipo Meinhard, operando com bomba peristáltica (modelo Minipulse, Gilson, França).

Este sistema proporcionou maiores intensidades nos sinais analíticos (tipicamente 20-30% mais altas) e menor tempo para rinsagem. O argônio utilizado foi de 99,99 % de pureza (AGA). O instrumento foi otimizado a cada dia de trabalho ("daily performance") para máxima sensibilidade para íons M^+, e mínimo sinais para M^{2+}, MO^+ e sinal de fundo (background) em m/z = 220, usando volume de 20 mL. Os parâmetros operacionais utilizados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros operacionais do ICP – MS.

Parâmetro	Ajuste
Potência da radiofrequencia (W)	1400
Vazão de Ar plasma (L. min^{-1})	15
Vazão de Ar auxiliar (L. min^{-1})	1
Vazão de Ar carreador (L. min^{-1})	0,8
Taxa de aspiração total (mL.min^{-1})	1
Diâmetro do injetor (mm)	2,0
Cones: amostrador e skimmer	Pt
Forma de medida	Peak-hop
Resolução (u)	0,8
Dwell time (ms)	100
Número de replicatas	3

u: unidade de massa atômica

Para a determinação dos elementos foi utilizada a calibração externa quantitativa que consiste na confecção de curvas analíticas individuais para cada elemento. As mesmas foram produzidas, de maneira convencional, pela aspiração de soluções multielementares com concentrações conhecidas e variáveis dos análitos e registro das suas intensidades normalizadas em relação ao padrão interno. As soluções analíticas foram preparadas a partir dos padrões multielementares Merck-IV (Nr. 11355.0100, contendo os elementos: Al, Co, K, Mn, Na e Zn) e ajuste final da concentração de HNO_3 para 0,5 % (v/v) com HNO_3 (bi-subdestilado). Elementos quimicamente incompatíveis com a solução de calibração acima mencionada foram preparados em soluções separadas.

Os comprimentos de onda para medida dos seis análitos foram escolhidos analisando-se as linhas livres de interferentes espectrais para cada elemento em estudo. Os comprimentos de onda fixados foram: Al, 167,08 nm; Co, 228,62 nm; K, 766,49 nm; Mn, 279,08 nm; Na, 589,59 nm e Zn, 213,856 nm. As análises foram realizadas em quadruplicatas e as médias obtidas foram expressas em mg/100 g de amostra acompanhadas dos desvio padrão.

3.3. Caracterização Bioquímica da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste

3.3.1. Extração de proteínas

As proteínas presentes nas sementes de *P. vulgaris* L. foram extraídas em solução tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) – cloreto de manganês ($MnCl_2$) – cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 5,0 mM, na relação de 1:10 (farinha/tampão, p/v). A mistura foi mantida sob agitação constante por 1 h a temperatura ambiente. Após, foi centrifugada a 4.000 rpm durante 5 min, obtendo-se assim resíduo, que foi descartado e do sobrenadante denominado de extrato bruto, do qual foi reservada uma amostra para ser utilizada nos testes de dosagem de proteína e eletroforese.

3.3.2. Fracionamento do extrato protéico

O sobrenadante obtido como no item 3.3.1 foi submetido a purificação parcial através de fracionamento com sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) nas faixas de 0-20% e 20-60% de saturação, segundo procedimento e massas determinadas na tabela de "Ammonnium Sulfate Table" descrito por Green e Hughs (1955).

O sal foi adicionado lentamente sob constante agitação ao extrato e, após a adição, a suspensão foi deixada em repouso por 1 hora em temperatura ambiente. O material foi centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos sendo que cada fração

obtida, ou seja, o material precipitado (F 0-20 % e F 20-60 %) e sobrenadante (F 60 %) foram dialisados exaustivamente contra água destilada para retirada do sal, então liofilizados e armazenados para serem utilizado nos testes posteriores (**Figura 8**).

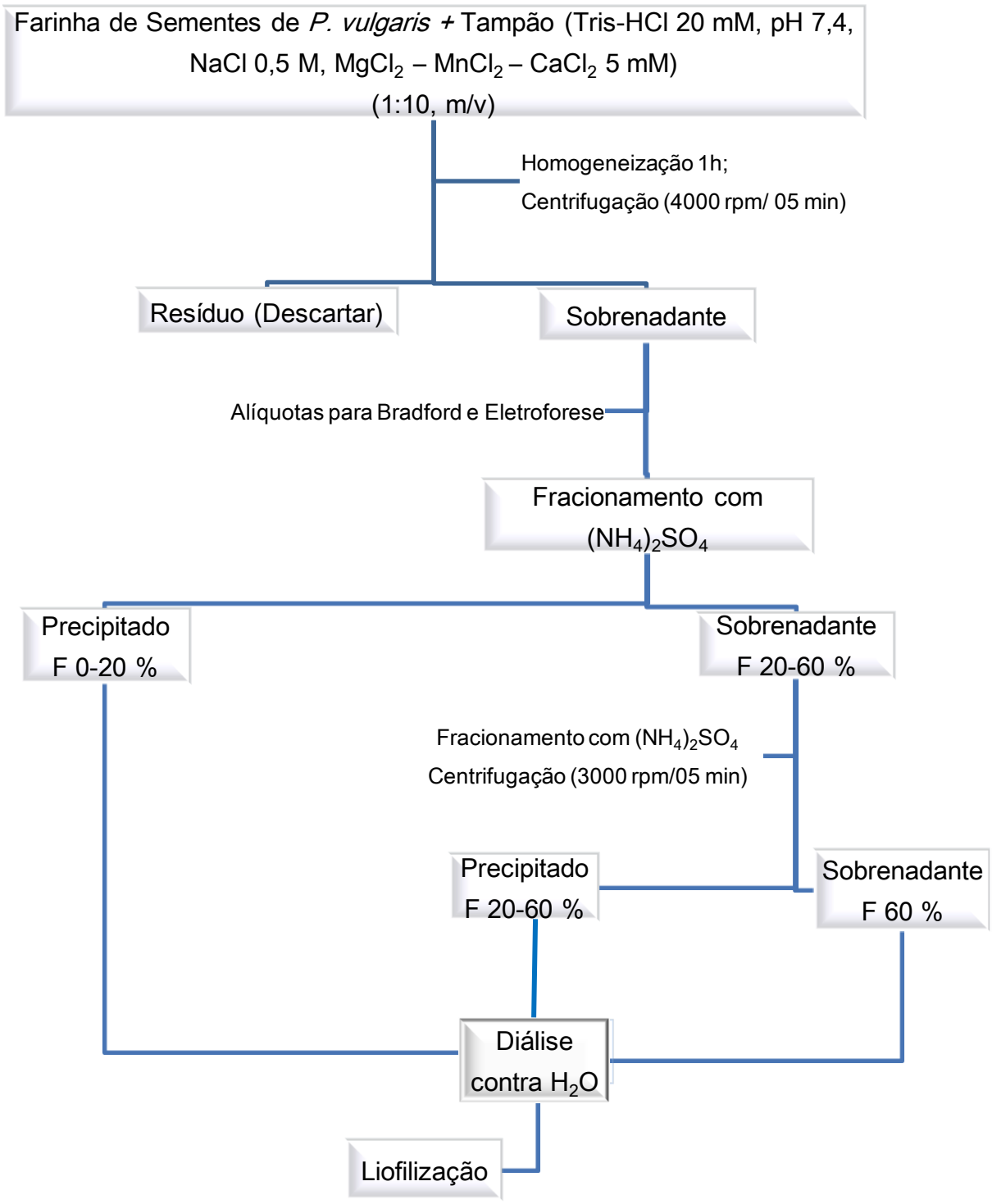


Figura 8 – Esquema de fracionamento do extrato protéico das sementes de *P. vulgaris* L., cv BRS Agreste.

3.3.3. Dosagem de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de (BRADFORD, 1976) que consiste em técnica para a determinação de proteínas totais utilizando o corante de “Coomassie Brilliant Blue” G-250.

A concentração de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas de sementes de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste foram avaliadas utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão. Foram adicionados 100 µL da amostra a 2,5 mL da solução de Bradford. Para o preparo deste reagente, foram utilizados 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G, 50 mL de etanol 95 % e 100 mL de ácido fosfórico 85 %. Posteriormente, esta solução foi diluída, completando-se seu volume para um litro com água destilada. As determinações foram feitas em triplicatas e a absorbância medida em 595 nm após 3 minutos do início da reação em espectrofotômetro Nova 2100 UV. Paralelamente à dosagem de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas, foi feita uma curva padrão de soroalbumina bovina. A concentração de proteínas em μg/mL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva padrão.

3.3.4. Análise eletroforética do extrato bruto e das frações protéicas

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do extrato bruto e das frações protéicas de sementes de *P.*

vulgaris L. foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso em géis de separação em placas. O gel de poliacrilamida continha proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 %. O gel de separação (12,5 % de poliacrilamida) foi preparado em tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,8 contendo SDS 0,1 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (10 %). O gel superior ou de aplicação (stacking gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 5 % em tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfato de amônio (10 %) e TEMED concentrado. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas EPS 301 miniVE (Amershan Biosciences).

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra na proporção 4:1 (Tris-HCl 12,0 mM pH 6,8, contendo glicerol (5 %), 0,02 % de azul de bromofenol, 0,4 % de SDS e 2-mercaptoetanol 2,88 mM) e aquecidas a 100 ºC por 5,0 minutos. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 2,5 mM, pH 8,3, contendo glicina 19,2 mM e 0,01 % de SDS. A corrida eletroforética foi feita em posição vertical e corrente constante (40 mA) e 200 V durante 1,5 horas. Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare) utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). O volume aplicado de amostra em casa poço foi 8 μ L e de marcadores foi de 5 μL.

Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,1 % em solução aquosa de sulfato de amônia a 16 % e ácido fosfórico 0,29 M durante 12 horas. O excesso de corante foi retirado com água destilada,

permitindo a visualização das bandas protéicas a olho nu. As massas aparentes das proteínas serão determinadas por comparações de suas mobilidades eletroforéticas em relação àquelas de proteínas padrões.

3.4. Germinação

As sementes foram pré-selecionadas para germinação de acordo com a sua integridade física, sendo excluídas as mal formadas. Foi efetuado tratamento com de hipoclorito de sódio 4 %, durante 10 minutos e, em seguida, enxaguadas exaustivamente com água destilada até pH_3O^+ = 7,0. Após este tratamento foram descartadas as sementes que se apresentaram “queimadas” ou “enrugadas” por apresentarem danos mecânicos (Figura 9).

Após o tratamento acima descrito as sementes foram colocadas para germinar em sacos de TNT de 30 x 18 cm (divididos em 10 raias de 3,0 cm, nas quais eram dispostas as sementes), desinfetados com hipoclorito de sódio 4 %, durante 1 hora, enxaguados com água destilada até a remoção total do hipoclorito, e umedecidos com carbonato de sódio (1,05 %). As sementes, em número de 10 por saquinho, foram dispostas uma a uma centralizadas em cada raia a aproximadamente 9,0 cm da borda superior do saquinho. Após semeadura, os saquinhos contendo as sementes foram dispostos verticalmente dentro de um recipiente plástico de 10,90 x 11,15 cm, contendo 100 mL de água destilada utilizada

para o umedecimento do TNT. O recipiente plástico foi previamente tratado com uma solução de hipoclorito de sódio (4 %), por 1 hora.

Posteriormente, 35 desses recipientes contendo os saquinhos com as sementes foram colocados para germinar no frio sob fotoperíodo de 12 h com luz contínua guarnecida por duas lâmpadas luz do dia, fluorescentes de 20 W, a temperatura de 19 ± 1,6 °C e umidade relativa do ar em torno de 67 %. A coleta foi realizada em amostras entre 24 aos 30 dias de germinação (DG). Cada amostra consistiu de 1 lote com 5 repetições de 10 sementes cada.

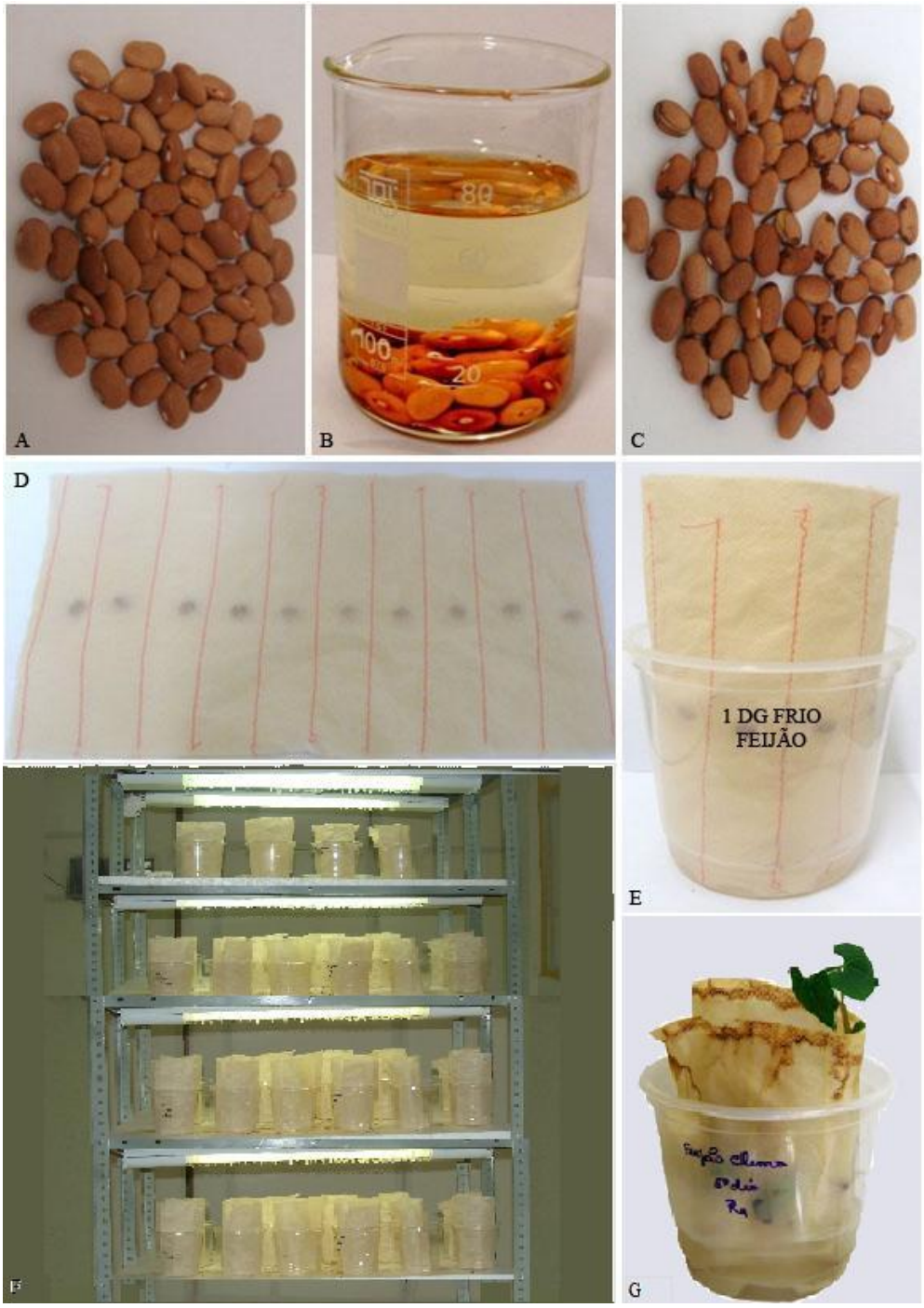


Figura 9 – Procedimentos necessários para germinação de sementes de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste). A) Sementes intactas viáveis para germinação; B) Desinfestação da semente e teste de imersão em hipoclorito de sódio para detecção de sementes viáveis; C) Sementes com danos mecânicos (queimadas e enrugadas) confirmados após teste de imersão. D e E) Sementes aclimatadas em sacos de TNT disposto em potes plásticos para então germinação. F) Disposição dos potes com sementes para germinação em ambientes com temperatura e luminosidade controlada. G) Plântula em estádio de desenvolvimento.

Outras sementes foram semeadas em caixas plásticas com dimensões de 66 x 33 x 4,0 cm com 200 células, sendo utilizado na germinação substrato inerte (Vermiculita Expandida – Tipo B, Vd = 100 L) irrigado com água destilada até atingir 60% da sua capacidade de retenção. As sementes permaneceram nas mesmas condições das germinadas em potes plásticos, porém o critério adotado para coleta de plântulas foi o de estádios de desenvolvimentos. Foram coletas amostras de plântulas em estádios de desenvolvimento I (radículas de até 3,0 cm) (Figura 10). Estas amostras foram utilizadas para o isolamento e caracterização de citoquininas oxidases, verificando se há expressão dessa enzima no início de desenvolvimento da planta.

Figura 10 – Germinação de sementes de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em substrato de germiculita. A) Germinação de sementes em caixas plásticas; B) Semente germinada em estádio de desenvolvimento I (radículas de até 3,0 cm).

3.4.1. Extração de proteínas de plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento

Para preparação dos extratos, foram coletadas plântulas obtidas de sementes de *P. vulgaris* L. em diferentes dias de germinação nas condições de frio em potes de plásticos com água.

O material coletado foi separado em cotilédones, hipocótilo, folhas e sistema radicular. Em seguida as amostras tecidos foram pesados, congelados à 4 °C, liofilizados, macerados em almofariz e armazenados até sua utilização.

A extração das proteínas dos tecidos vegetais foi feita em água destilada, variando a proporção de acordo com o tipo de material vegetal, durante duas horas com agitação constante. A proporção (m/v) de água utilizado na extração de proteínas nos cotilédones foi de 1:15; hipocótilo, 1:30; folhas, 1:43 e raiz, 1:75. Após a extração, os homogenatos foram centrifugados (3000 rpm/05 min), obtendo-se então os extratos brutos. A quantificação das proteínas e o estudo do perfil eletroforético dos extratos brutos foram obtidos utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente na extração de proteínas da farinha da semente de feijão. Todos os processos de extração protéica de cotilédones, hipocótilos, folhas e raízes, estão esquematizados na Figura 11.

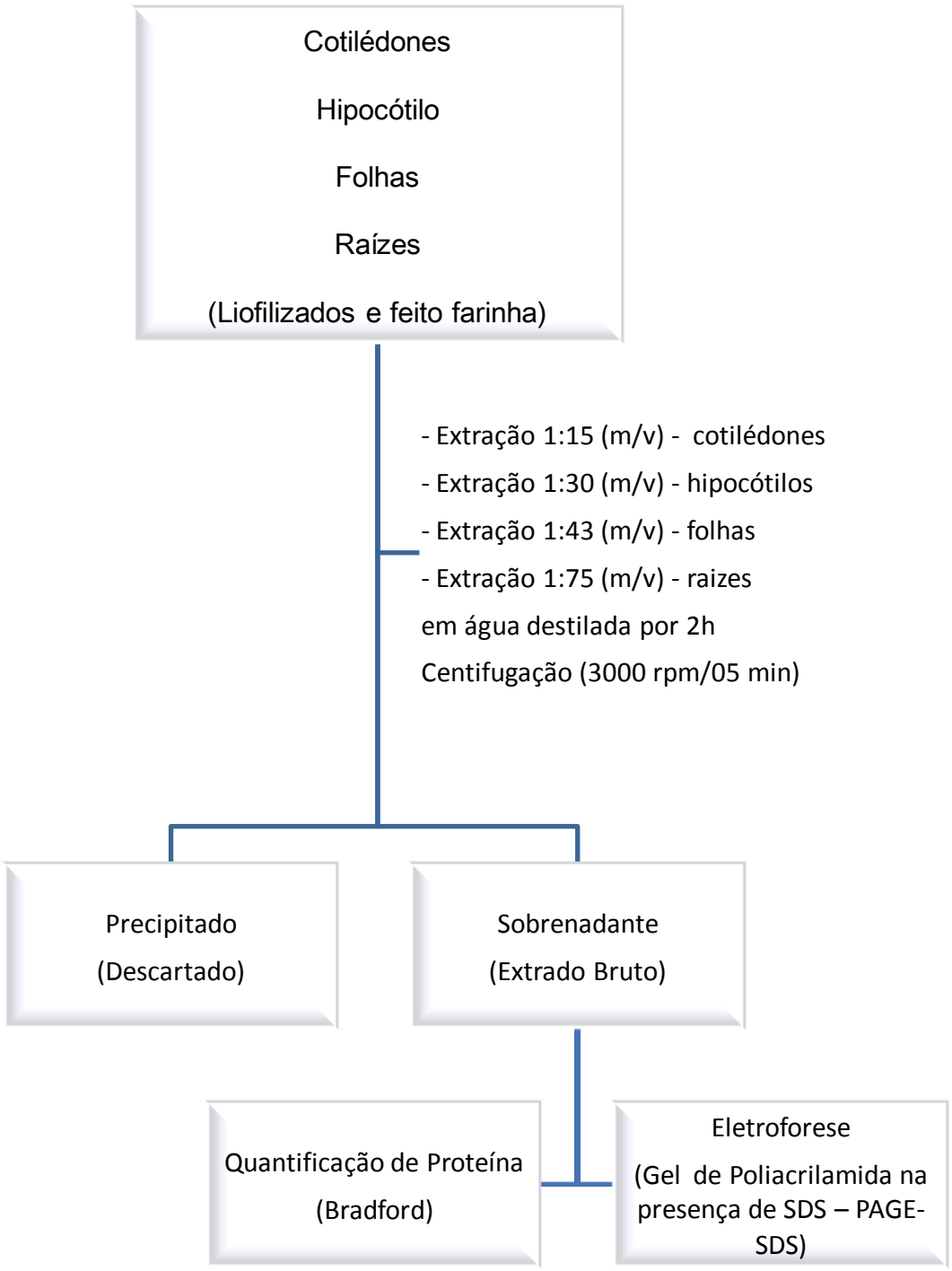


Figura 11 – Esquema de extração de proteínas de cotilédones, hipocótilo, folhas e raízes de plântulas de feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com diferentes dias de germinação.

Para as sementes germinadas em substratos de vermiculita, procedeu-se seleção de plântulas quanto ao estádio de desenvolvimento, obedecendo o critério já descrito anteriormente. Nestas, foi separada o sistema radicular, que foi denominado de R I (raízes de plântulas em estádio I). Esse material foi pesado “in natura”, marcerado e submetido à extração protéica em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, $MgCl_2$ – $MnCl_2$ – $CaCl_2$ 5,0 mM, na proporção 1:10 (farinha/tampão, p/v), com homogeneização durante 1 hora sob agitação constante. Após a extração, o homogenato foi centrifugado (3000 rpm/05 min), obtendo-se então o extrato bruto R I. Este extrato foi utilizado para dosagem do teor protéico e aplicação em coluna cromatográfica para isolamento e purificação de CKO. Preferiu-se utilizar material “in natura” em precaução à oxidação de possíveis CKO na amostra.

3.5. Purificação Parcial da Citoquinina Oxidase

3.5.1. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75

A quantidade de 1,0 mL de extrato de raízes de plântulas de feijão no estádio I (R I) a base de Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e os sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM, foi aplicada em coluna de Sephadex G-75 com (10,1 x 0,93 cm; 27,5 mL) previamente equilibrada com o mesmo tampão, permanecendo em contato com a coluna o período de 1 hora.

Após adsorção das proteínas com o gel, iniciou-se o processo de eluição exaustiva da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse próxima de zero, resultando na obtenção de frações protéicas. As frações foram coletadas com um fluxo de 40 mL/h, coletando-se 1,5 mL por tubo, e lida em espectrômetro Nova 2100 UV. Quando a leitura não mais foi sensível às frações, foi feito teste da atividade hemaglutinante (AH) no pico evidenciado pela leitura (amostra do pico não-retido + amostra de sangue na proporção 1:1 (v/v)). Aplicou-se o mesmo tampão, porém com concentração salina maior (NaCl 1,5 M) para a remoção de proteínas aderidas a matriz cromatográfica, constituindo os picos retidos ($P_{(R\ I-2)}$). Procedeu-se nova leitura das frações obtidas com a eluição da coluna com NaCl 1,5 M, no mesmo comprimento de onda anterior, até a perda da sensibilidade da leitura pelo espectrofotômetro. As frações que apresentaram as maiores concentrações protéicas evidenciadas na leitura, foram dialisadas no mesmo tampão de equilíbrio da coluna para promover a estabilidade do sítio de ligação de possíveis lectinas.

Apenas as frações representantes dos ($P_{(R\ I-1)}$) foram utilizados. As frações foram reunidas (6 tubos, 9,0 mL) e concentradas em diálise contra polietileno glicol (PEG) 6000 a 30 % por 24 horas e estocadas a temperatura de 5º C. Esses picos também foram submetidos a dosagem de proteínas.

3.5.2. Purificação de proteínas a partir do $P_{(R\ I-1)}$ da CKO

O pico $P_{(R\ I)}$, obtidos da cromatografia em Sephadex G-75, já concentrados até o volume de 2,2 mL, foram aplicados (volume de aplicação 1 mL) em coluna de afinidade de ConA-Sepharose (7,0 x 0,93 cm; 12 mL) equilibrada com Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e os sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM. A coluna foi então exaustivamente lavada com esse tampão. O fluxo da coluna foi de 40 mL/h, coletando-se 1,5 mL por tubo. Após remoção dos materiais não-ligantes a coluna através de eluição com o tampão de equilíbrio, as proteínas glicosiladas retidas na matriz da coluna foram eluídas com o tampão de eluição acrescido de NaCl 1,5 M. A absorbância a 280 nm foi determinada como descrito anteriormente. As frações constituintes dos picos obtidos foram concentradas em diálise contra PEG 6000 a 30 % e estocadas a 5 º C. Estes também foram submetidos a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976).

3.5.3. Ensaio da atividade da citoquinina oxidase

Para detecção de citoquinina oxidase, 1 mL da amostra concentrada do pico retido na coluna ConA-Sepharose do $P_{(R\ I)}$ foi adicionado a solução de 200 µL imidazol (0,2 M; pH 6,5), 100 µL de cloreto de cobre ($CuCl_2$) 2 mM, 400 µL água e 16 µL de isopenteniladenina. A reação catalítica foi iniciada pela adição da enzima, e a reação foi incubada a 30°C por 1 hora no escuro. Essa reação foi paralisada pela

adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 40 % (m/v) e 200 µL da solução 4-dimetilamino benzaldeído 0,03 % (m/v). Deixou-se desenvolver a cor em temperatura ambiente por 10 minutos e procedeu-se leitura no espectrofotômetro Nova 2100 UV em comprimento de onda de 352 nm. O teste em branco foi preparado da mesma maneira, porém com omissão da isopenteniladenina na amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição Centesimal da Semente de *P. vulgaris* L.,cv. BRS Agreste

Os resultados de composição centesimal do feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) encontram-se na Tabela 3 e são comparáveis com outras cultivares de feijão comum (ANTUNUES et al., 1995; MESQUITA, 2005; CÁRDENAS, LEONEL, e COSTA, 2008).

Tabela 3 – Composição centesimal de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em base seca.

Componentes	Feijão Comum (BRS Agreste)[1,2]	Caracterização Feijão Comum [3,4]		
		(ANTUNUES *et al.*, 1995)	(MESQUITA, 2005)	(CÁRDENAS, LEONEL e COSTA, 2008)
Umidade	9,4841 ± 0,3301	(-)	13,76 – 18,26	10,69 – 15,38
Cinzas	4,7844 ± 0,1030	3,58 – 4,20	2,97 – 4,87	3,36 – 4,22
Proteínas	23,4204 ± 0,0242	23,37 – 25,77	22,34 – 36,28	22,57 – 24,42

1/ *Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste analisada neste estudo.

2/ Valores expressos em média (g/100 g) ± desvio padrão de quatro determinações independentes em relação à massa "in natura".

3/Valores mínimo e máximo obtidos em cultivares de feijão comum segundo caracterização de Antunes et al.(1995), Mesquita (2005) e Cárdenas, Leonel e Costa (2008).

4/ Valores expressos em g/100 g de Massa seca (MS)

(-) Análise não realizada.

De acordo com Barampama e Simard (1993a) a composição centesimal do feijão varia de acordo com o local do plantio, os fatores ambientais e a cultivar. Os dados expostos na Tabela 3 reforçam a afirmação dos referidos autores supracitados.

O teor de umidade da cultivar BRS Agreste foi de 9,4841 %, estando abaixo do valores reportados por Mesquita (2005), Cárdenas, Leonel e Costa (2008), que ao avaliarem diferentes cultivares de feijão comum encontraram valores de umidade que variaram de 13,76 – 18,26 % e 10,69 – 15,38 %, respectivamente. Estas variações são provavelmente decorrentes da diferença de cultivar e das condições de cultivo. Segundo Bunch (1959) e Fonseca *et al*. (2004), a umidade é um fator importantíssimo na manutenção da qualidade de sementes, devendo ocorrer um teor de umidade adequado ao armazenamento que varie de 13 a 14 %.

O teor de cinzas (4,7844 ± 0,1030 g/100 g) está de acordo com os resultados observados por Antunues *et al*. (1995), Mesquita (2005) e Cárdenas, Leonel e Costa (2008) que obtiveram valores entre 2,97 e 4,87 g/100 g, em diversas cultivares de feijão comum. Barampama e Simard (1993a), reportaram teores maiores e menores que a faixa citada nesse trabalho para a cultivar BRS Agreste, indicando que essas diferenças estão relacionadas às condições de cultivo, climáticas e fertilidade do solo.

O conteúdo protéico obtido neste estudo (23,4204 ± 0,0242 g/100 g) foi superior ao encontrado Melo (2008), 21 g/100 g e por Marquez, Barros e Lajolo

(1996), 20,5 g/100 g. No entanto, outros autores que estudaram o feijão comum encontraram maiores variações no percentual protéico (22,43 a 36,28 g/100 g) (ANTUNUES *et al.*, 1995; MESQUITA, 2005; PIRES, 2002; CÁRDENAS, LEONEL e COSTA, 2008). Osborn (1988) reportou que o percentual de proteínas de feijão varia entre 16 e 33%. De acordo com Pereira e Costa (2002), a variação no teor de proteínas, pode ser inerente a diferenças entre linhagens, condições de plantio e/ou armazenamento. Ainda Castellón *et al.* (2003) complementam que essas diferenças em sementes sugerem que o melhoramento genético induz mudanças neste parâmetro bioquímico.

4.2. Composição Mineral da Semente de *P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste

A composição mineral do feijão comum (*P. vulgaris* L., cv. BRS Agreste) encontra-se apresentada na Tabela 4, com valores expressos em mg.100 g^{-1} de amostra seca.

Tabela 4 – Composição mineral (mg.100 g^{-1}) de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em base seca.

Componentes	Feijão Comum (BRS Agreste)[1,2]
Cálcio	97,77 ± 4,2032
Magnésio	110,62 ± 2,6849
Ferro	1,09 ± 0,0329
Cobre	1,29 ± 0,1489
Alumínio	8,15 ± 5,0912
Cobalto	0,10 ± 0,012
Potássio	511,74 ± 2,6163
Manganês	0,61 ± 0,5235
Sódio	51,51 ± 3,1820
Zinco	1,49 ± 0,8485

1/ mg.100 g^{-1} de massa seca "in natura"

2/ Valores expressos em média ± desvio padrão de quatro determinações independentes.

4.2.1. Cálcio e Magnésio

A cultivar BRS Agreste apresentou índice de cálcio e magnésio de (97,77 ± 4,2032 mg.100 g^{-1} e 110,62 ± 2,6849 mg.100 g^{-1}), respectivamente (Tabela 4).

O teor de cálcio nos grãos de feijão pode variar de acordo com a cultivar. No Brasil, valores entre 122,53 a 207,41 mg.100 g^{-1} de matéria seca (MS) foram constatados em onze variedades de feijão (PIRES et al., 2005) e entre 220 a 280 mg.100 g^{-1} de MS foram observados em seis linhagens (ESTEVES, 2000). O valor obtido para o teor de cálcio na variedade de feijão estudada foi superior aos citados

por Barampama e Simard (1993b) que ao estudar quatro variedades de feijão cultivadas em quatro diferentes regiões encontraram valores de teores de cálcio entre 24,8 e 72,6 mg.100 g^{-1} de feijão seco.

O valor encontrado para o teor de magnésio (100,62 mg.100 g^{-1}) na cultivar estudada foi inferior as faixas encontrada na literatura (158,20 a 340 mg.100 g^{-1}) (OLIVEIRA, 1997; MOURA, 1998; ESTEVES, 2000; PIRES et al., 2005; MESQUITA et al., 2007).

De acordo com Bonato et al. (1998), o cálcio e o magnésio possuem papéis importantes no desenvolvimento das plantas. O cálcio é responsável pela estabilidade da membrana e integridade das células vegetais, podendo também modular a ativação de várias enzimas direta ou indiretamente. Estes autores complementam que, embora o cálcio esteja envolvido na divisão celular, a parada do crescimento na ausência de cálcio no meio externo é, primariamente, o resultado da inibição na elongação da planta. O magnésio tem função essencial como elemento de ligação para a agregação das subunidades do ribossomo, processo este necessário para a síntese de proteína, atividade da RNA polimerase e formação do RNA do núcleo. Também é um mineral requerido por enzimas ou fortemente promove reações enzimáticas, como a modulação da RuBP carboxilase (ribulose 1,5 bisfosfato oxidase/carboxilase – Rubisco) no estroma do cloroplasto vegetais.

4.2.2. Ferro

A varredura da solução estoque de 0,20 ppm de Fe complexado com ortofenantrolina (Figura 12) apresentou maior absorbância em λ = 510 nm.

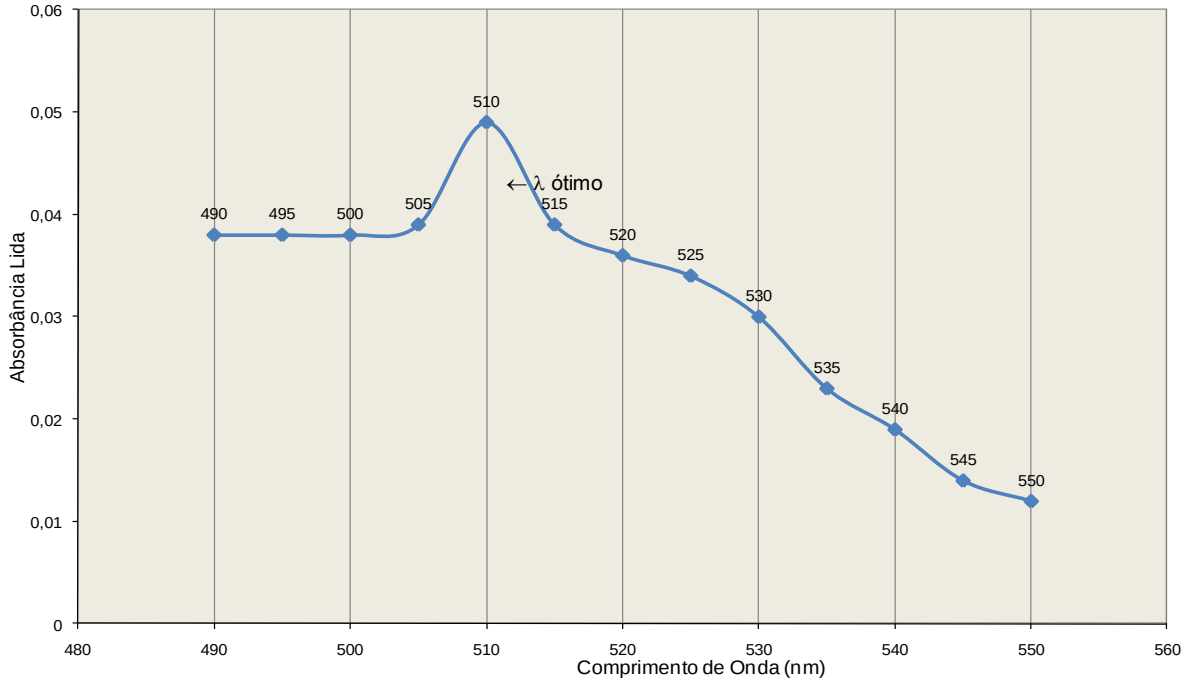


Figura 12 – Varredura de absorção do complexo ferro-ortofenantrolina no intervalo de comprimento de onda entre 490 – 550 nm em solução com [Fe] = 0,20 ppm.

A curva de calibração padrão obtida com as soluções de diferentes concentrações de ferro está apresentada na Figura 13. A curva gerou a equação da reta $y = 0{,}1871x - 0{,}0001$, que foi utilizada para cálculo da concentração de ferro encontrada na amostra.

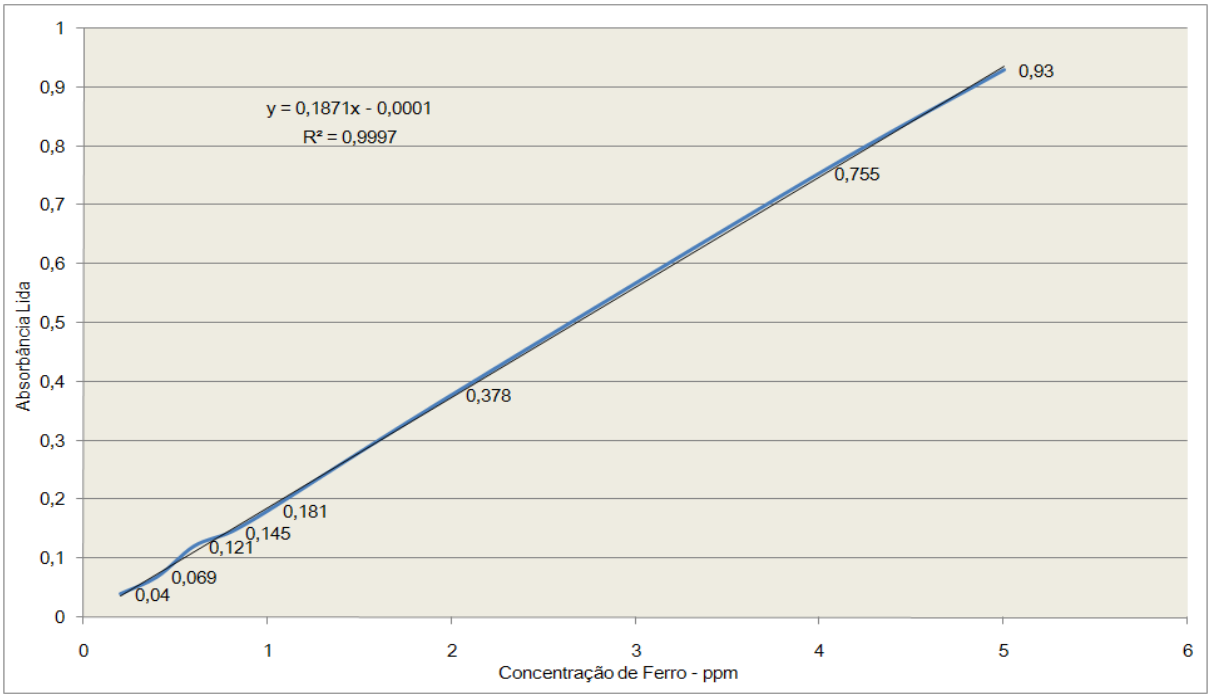


Figura 13 – Curva de Calibração Padrão do complexo Ferro-ortofenantrolina no intervalo de concentração de 0,20 – 5,0 ppm de ferro na amostra.

A concentração de ferro obtida da amostra foi de 1,09 ± 0,0329 mg.100 g^{-1} (Tabela 4) , valor esse inferior aos reportados por Pires *et al*. (2005), 4,46 a 6,40 mg.100 g^{-1}; Cárdenas (2006), 4,81 a 9,16 mg.100 g^{-1}; e Corrêa (2007), 4,68 a 8,06 mg.100 g^{-1} do elemento ferro em diferentes variedades de feijão seco. Outros autores, Maldonado e Sammám (2000), verificaram que os teores de ferro variaram entre 8,81 (feijão carioca) e 76,03 mg.100 g^{-1} de matéria seca, para diferentes variedades estudadas. Oliveira (1997), estudando uma variedade de feijão vermelho cozido e seco encontrou teores de ferro de 7,70 mg.100 g^{-1} de amostra.

O ferro possui grande capacidade redox o que o torna importante nos processos de oxirredução no metabolismo da planta. Participa na reação de uma

grande quantidade de enzimas. Somente com a deficiência severa desse mineral há inibição da divisão celular, e conseqüentemente redução no crescimento foliar. Ele é requerido na síntese protéica e o número de ribossomos (sítio de síntese de proteínas) é reduzido nas células das folhas deficientes em Ferro. A deficiência afeta mais a síntese de proteína no cloroplasto do que no citoplasma (BONATO *et al.*, 1998).

4.2.3. Cobre

A varredura da solução estoque de 1,00 ppm de cobre apresentou maior absorbância em λ = 435 nm (Figura 14).

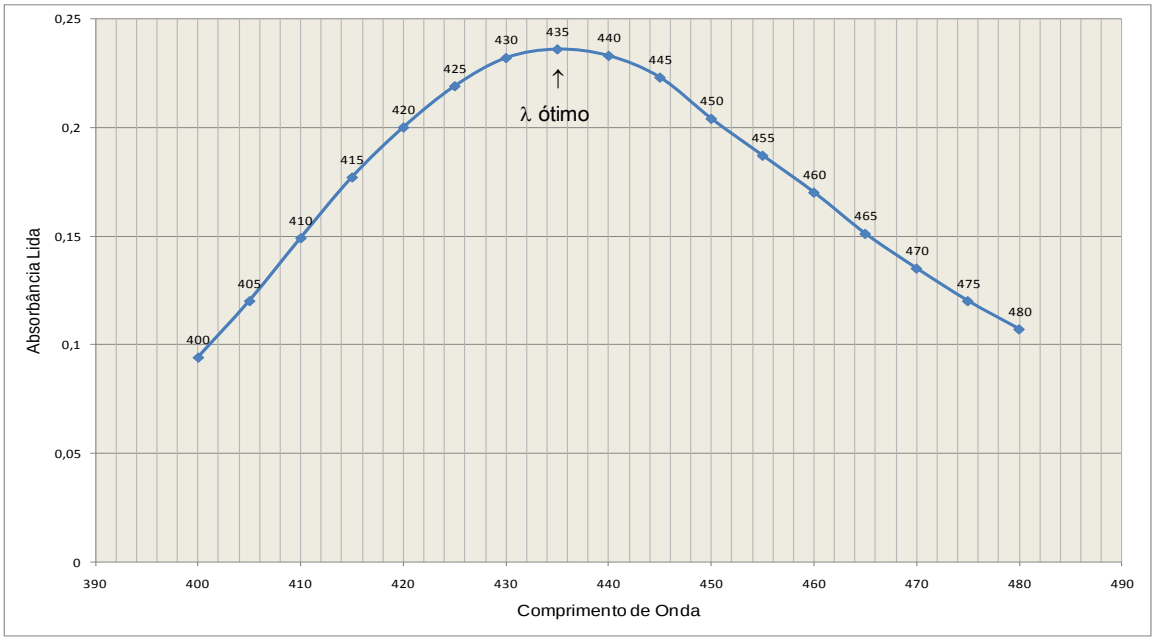


Figura 14 – Varredura de absorção do complexo cobre-dietietilcarbamato de sódio no intervalo de comprimento de onda entre 400 – 480 nm em solução com [Cu] = 1,0 ppm

A curva de calibração padrão obtida com as soluções de diferentes concentrações de cobre gerou a equação da reta $y = 0{,}243x - 0{,}0158$, que foi utilizada para cálculo da concentração de cobre encontrada na amostra (Figura 15).

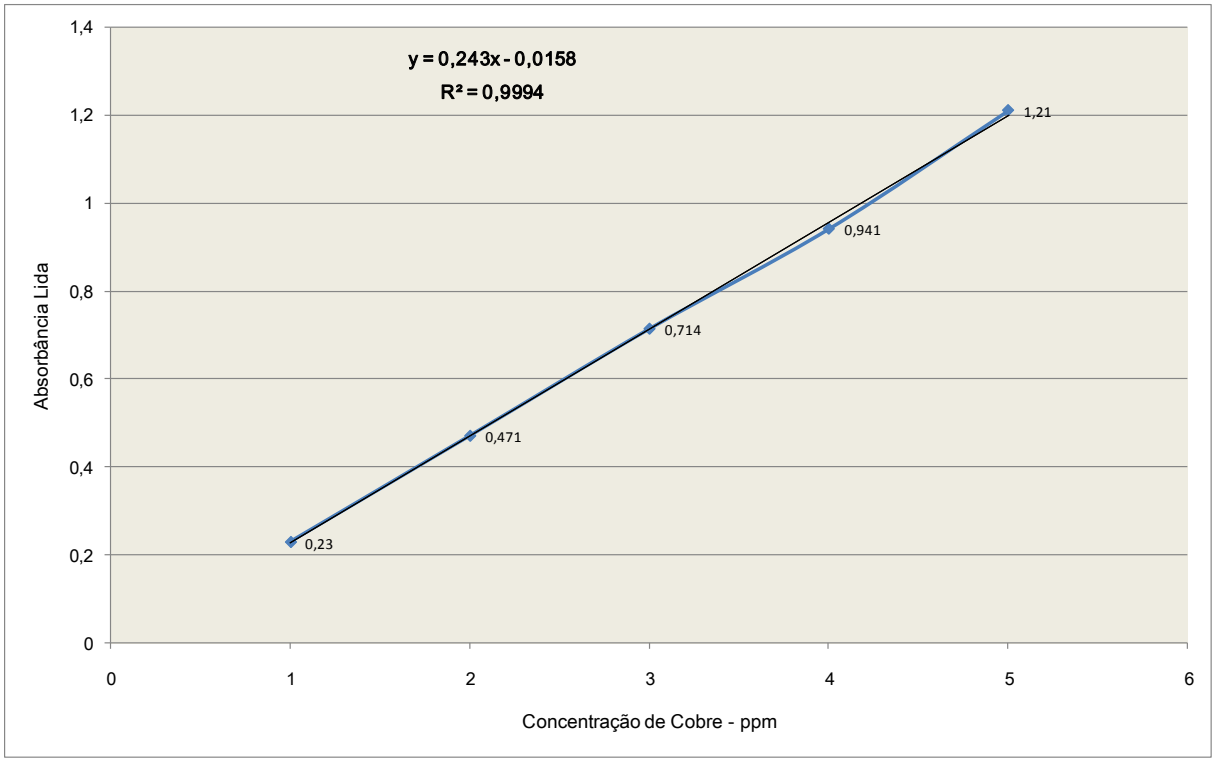


Figura 15 – Curva de Calibração Padrão do complexo cobre-dietietilcarbamato de sódio no intervalo de concentração de 1,0 – 5,0 ppm de cobre na amostra.

A cultivar BRS Agreste apresentou teor de cobre de 1,29 ± 0,1489 mg.100 g^{-1} (Tabela 4). Estudos citados na literatura mostram os teores de cobre variando de 1,22 a 2,74 mg.100 g^{-1} de MS (PIRES et al., 2005) para diferentes linhagens de feijão. Barampama e Simard (1993b), encontraram valores entre 0,75 e 1,28 mg.100 g^{-1} de feijão seco para os cultivares analisados. Maldonado e Sammám

(2000) estudando dez variedades de feijão, verificaram que os teores de cobre estavam entre 0,83 e 2,42 mg.100 g^{-1} de matéria seca para as diferentes espécies, tendo encontrado valor de 0,98 mg.100 g^{-1} de cobre para o cultivar Carioca. Consta que os teores de cobre do presente trabalhos são correlatos aos da literatura, porém superiores aos reportados por Cárdenas (2006), 0,61 mg.100 g^{-1} de cobre para a cultivar Pérola; (0,66 mg.100 g^{-1}) BRS Radiantes e (0,74 mg.100 g^{-1}) Ouro Branco.

4.2.4. Teores de alumínio, cobalto, manganês, potássio, sódio e zinco por ICP-MS

Os resultados encontrados para os minerais determinados em farinha de sementes de feijão comum a partir de ICP-MS foram: alumínio (8,15 mg.100 g^{-1}), cobalto (0,10 mg.100 g^{-1}), potássio (511,74 mg.100 g^{-1}), manganês (0,61 mg.100 g^{-1}), sódio (51,51 mg.100 g^{-1}) e zinco (1,49 mg.100 g^{-1}) (Tabela 4).

Dentre as leguminosas estudadas por Iqbal et al. (2006), o feijão BRS Agreste apresentou as menores concentrações de potássio, manganês e zinco. Cabrera et al. (2003) encontraram níveis de zinco de 3,3 a 7,0 mg.100 g^{-1} em diversas leguminosas. Barampama e Simard (1993b), Esteves (2000), Moura (1998) também reportaram teores superiores de zinco em várias variedades de feijões (2,02 a 3,60 mg.100 g^{-1} MS).

Segundo Bonato *et al*. (1998), a deficiência de manganês na planta reduz o fluxo de elétrons do fotossistema II (FS II) para o fotossistema I (FS I), ocasionando como conseqüência a redução na produção de compostos redutores (ATP e NADPH) que seriam utilizados na fixação de CO_2 durante a fase bioquímica, além de apresentar efeito negativo na síntese de proteínas e na multiplicação celular. Assim como o manganês, o zinco atua no metabolismo do RNA e DNA, na divisão celular, síntese de proteínas e na ativação de enzimas como a anidrase carbônica e oxidases. Em plantas deficientes em zinco ocorre redução drástica na síntese de proteína. Para o potássio, esse nutriente mineral exerce função regulatória pela alteração na conformação e ativação dos componentes de enzimas, além de participar dos processos de síntese de proteínas.

A concentração de sódio não é desejável no feijão (IQBAL *et al*., 2006), porém a cultivar desses estudo apresentou valores muito elevado desse mineral (Tabela 4). Possivelmente a composição do solo tenha influenciado em tal composição. Esse mineral, embora tóxico para a maioria das plantas, é um micronutriente requerido pela maioria das espécies que utiliza as rotas C_4 e CAM de fixação de carbono para a regeneração do fosfoenolpiruvato e estimula o crescimento da planta por meio de uma maior expansão celular.

O teor de alumínio na amostra foi relativamente alto (8,15 mg.100 g^{-1}), esse elemento é tóxicos e, a presença do mesmo no solo proporciona o bloqueio do transporte de nutrientes para as espécies vegetais, acarretando problemas para o crescimento das plantas (BONATO *et al*., 1998)

4.3. Quantificação de Proteínas e Perfil Eletroforético do Extrato Bruto e das Frações Protéicas Precipitadas com Sulfato de Amônio

Para a quantificação protéica das sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) foram pesados 2,0 g de farinha do feijão (FF) e diluídos em 20 mL de tampão de extração, já citado na metodologia. A extração foi procedida sob agitação constante por uma hora, seguida de centrifugação (4000 rpm/ 05 min). Do volume obtido após centrifugação, foi tomado alíquota de 10,25 mL para realização do fracionamento do extrato bruto da FF com sulfato de amônio em níveis de saturação de 0-20 %; 20-60 % e 60 %. As frações obtidas foram dialisadas e liofilizadas para concentração do conteúdo protéico. O conteúdo protéico foi ressuspenso com água destilada nas seguintes quantidades: F 0-20 % (2,5 mL), F 20-60 % (5,0 mL) e F 60 % (4,5 mL).

As dosagens protéicas do extrato bruto e das frações protéicas da FF estão resumidas na Figura 16. O extrato bruto apresentou 24,95 mg de proteínas. Verificou-se que os intervalos de saturação de 0-20%; 20-60% e 60 % continham as seguintes quantidades de proteínas precipitadas: 0,05 mg, 15,55 mg e 8,16 mg, respectivamente. A fração 20-60% apresentou a maior quantidade de proteína precipitada.

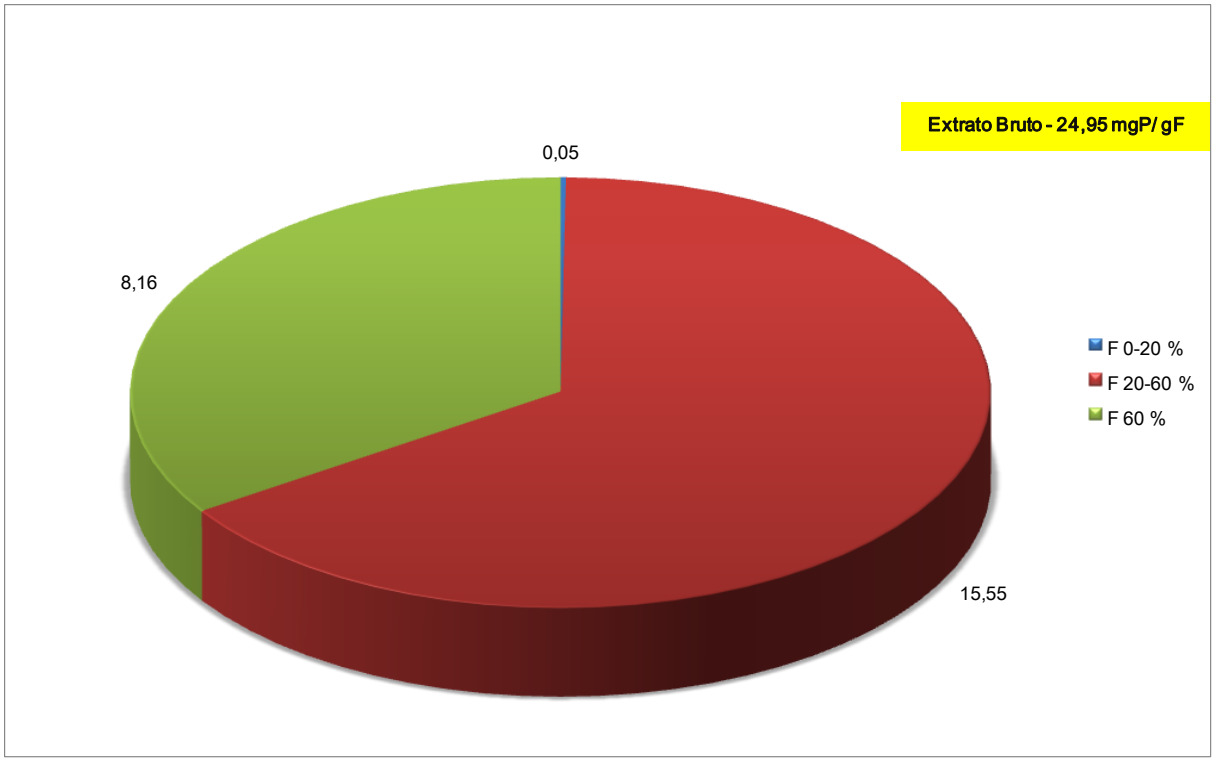


Figura 16 – Quantidades relativas de proteínas do extrato bruto da farinha de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) e das frações protéicas precipitadas nos intervalos de saturação de 0-20%; 20-60% e 60 % com sulfato de amônio.

Observa-se na Figura 17 que houve maior precipitação de proteínas nos dois últimos intervalos de saturação. No extrato bruto pode-se verificar a presença de proteínas de massas moleculares (MM) maiores que 97 kDa e aquelas que estão compreendidas entre MM de 21,1 kDa e 97 kDa. Na Fração 20-60 % houve precipitação de proteínas com MM entre 14 kDa e 66 kDa. A Fração 60 %, possibilitou extração de proteínas com MM entre 30 kDa e 66 kDa. Apesar da Fração 0-20 % ter apresentado proteínas, a presença de bandas não está tão bem nítida em virtude da concentração.

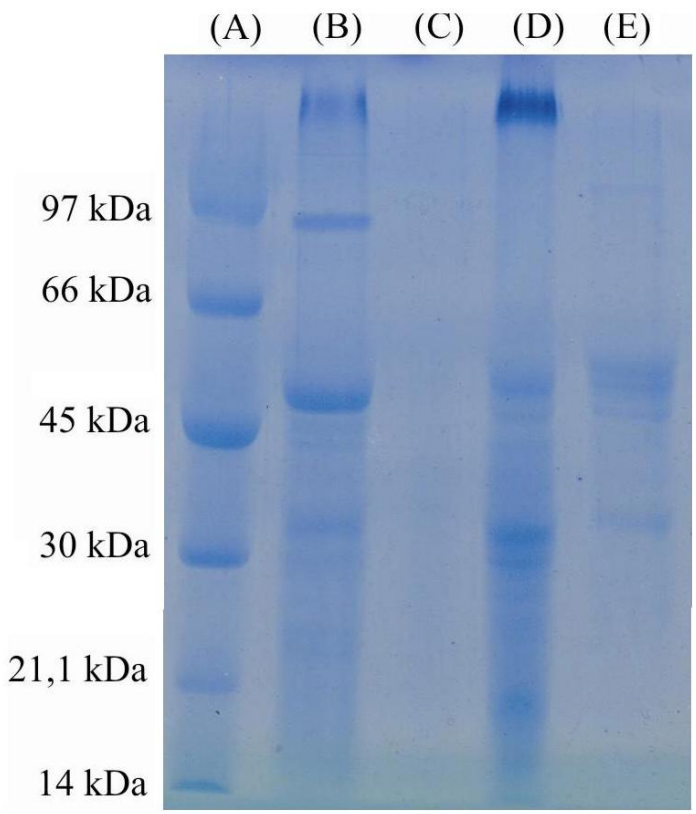


Figura 17 – I – Eletroforese do extrato bruto da farinha de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) e das frações protéicas precipitadas em diferentes intervalos de saturação com sulfato de amônio. No poço A estão os marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). No poço B está o extrato total de FF Phaseolus vulgaris. Poço C, D e E, fração com saturação de sulfato de amônio de 0 – 20 %, 20 – 60 % e 60 %, respectivamente

4.4. Dosagem e Perfil Eletroforético de Proteínas de Plântulas de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) em Diferentes Estágios de Desenvolvimento

4.4.1. Cotilédones

O extrato bruto da farinha de cotilédones de plântulas de feijão comum com 24 ao 30º dia de germinação apresentou concentração protéica variando de 4,57 mg/g F a 8,34 mg/g F (Figura 18). Verificou-se que as plântulas com 29 DG apresentaram o maior índice (8,34 mg), seguido do 27º DG (6,34 mg).

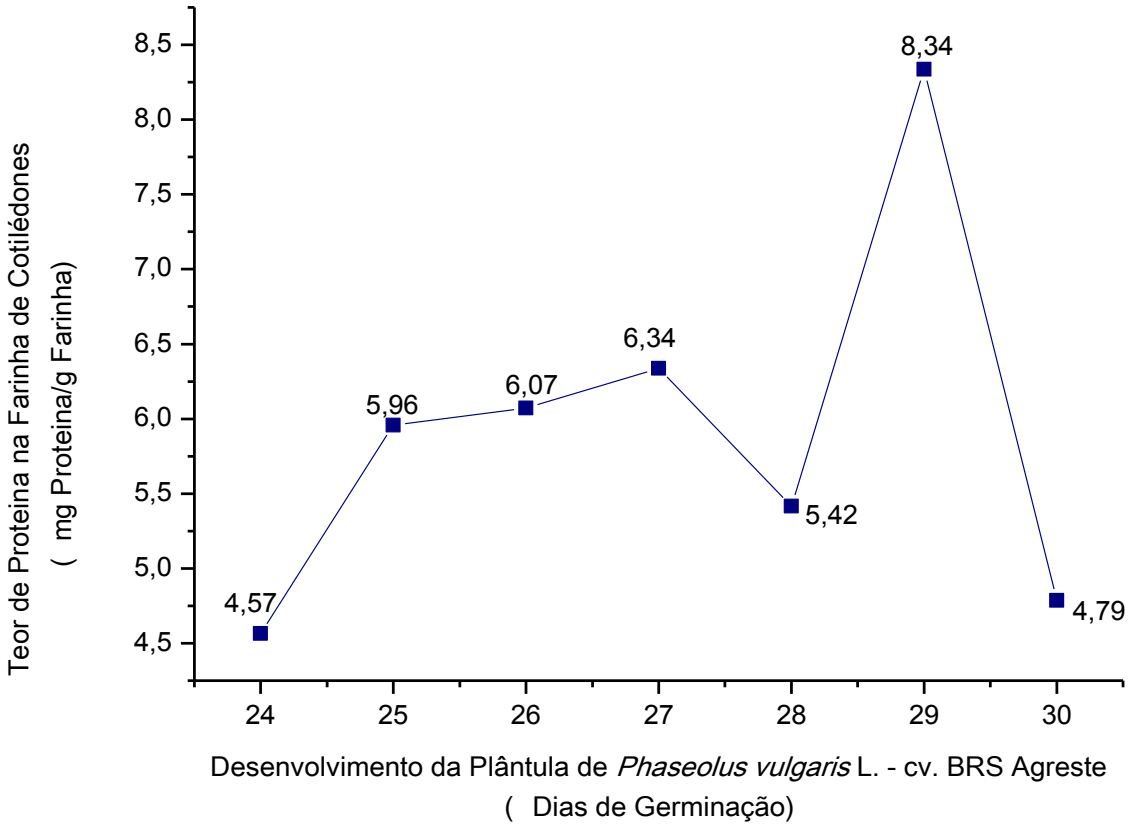


Figura 18 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de cotilédones de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia.

Como pode ser verificado, houve aumento do teor protéico com o progresso do desenvolvimento, entretanto em determinado momento essa síntese começou a cair (29º – 30º DG). O conteúdo protéico apresentou-se crescente nos período de desenvolvimento, com redução gradativa após a protrusão de outras partes teciduais da plântula. O conteúdo de proteínas solúveis decresce durante o crescimento das plântulas (Figura 18), o que concorda com a afirmação de Bewley e Black (1994), de que as proteínas são mobilizadas durante a germinação e subseqüente crescimento das plântulas. Esses resultados também concordam com os obtidos por Müntz *et al*. (2001) de que a mobilização das proteínas armazenadas nos cotilédones só é detectável após a protrusão da radícula (pós-germinação). Em sementes de *Erythrina velutina* Willd., o conteúdo de proteína cotiledonar solúvel decresceu rapidamente durante a germinação e crescimento da plântula (OLIVEIRA *et al*., 1998), e em sementes de *Euphorbia heterophylla* as proteínas foram continuamente degradadas após o inicio da embebição (SUDA e GIORGINI, 2000).

O padrão eletroforético das albuminas de cotilédones de plântulas de feijão comum com estágio de germinação de 24 ao 30º dia (Figura 19) apresentou pelo menos predominância de sete bandas protéicas nos períodos avaliados. Verificou-se a presença de proteínas de massas moleculares (MM) maiores que 97 kDa e aquelas que estão compreendidas entre MM de 14 kDa e 30 kDa. O arraste visualizado em todos os poços podem indicar presença de glicoproteínas com MM entre 30 a 45 kDa.

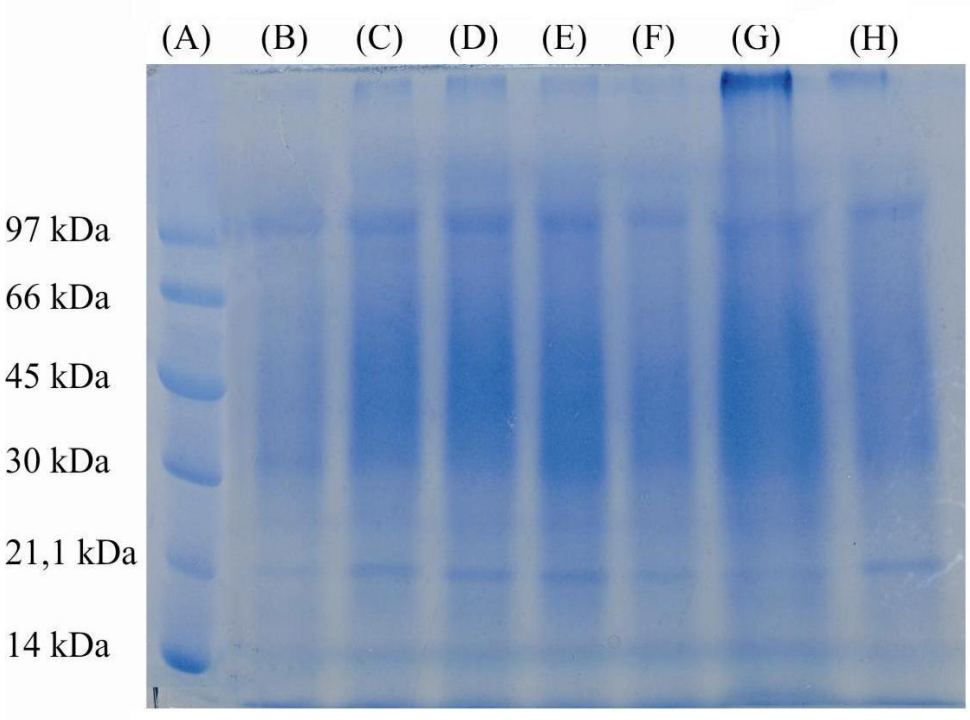


Figura 19 – I – Eletroforese das albuminas de cotilédones de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 ao 30º DG).

4.4.2. Hipocótilo

O extrato bruto da farinha de hipocótilo de plântulas de feijão comum com 24 ao 30º dia de germinação apresentou concentração protéica variando de 5,47 mg/g F a 10,82 mg/g F (Figura 20). Verificou-se que a concentração protéica foi maior em hipocótilos de plântulas com 24 DG (10,82 mg/ g F). Do 25º DG ao 26º DG os hipocótilos tiveram suas concentrações relativas diminuídas, mas desse período ao 30º dia, proteínas foram sintetizadas novamente.

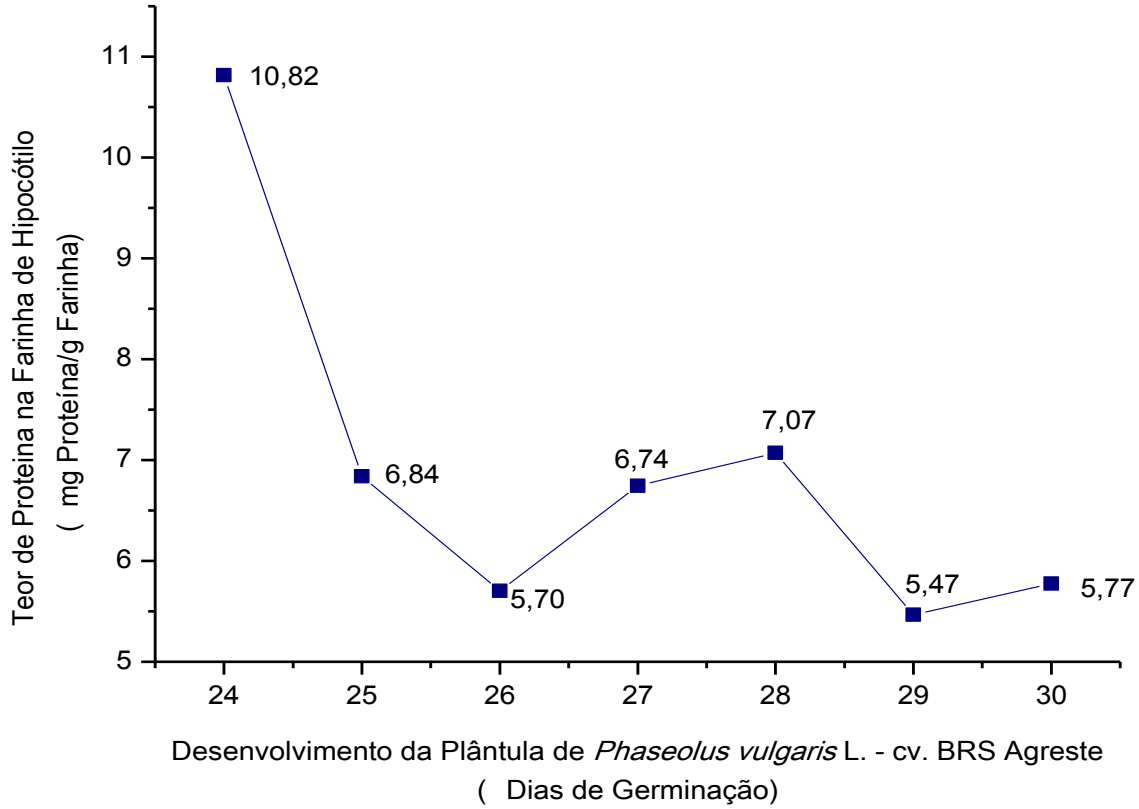


Figura 20 - Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de hipocótilo de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia.

Segundo Jeronimo (2006), de maneira geral com a inibição do crescimento radicular e alongamento do hipocótilo há um aumento da síntese protéica, porém como pode ser observado na Figura 20, com o desenvolvimento, o hipocótilo passou a apresentar decréscimo da expressão protéica ou até mesmo repressão total da mesma. Romero-Romero *et al*. (2002) e Cruz-Ortega, Ayala-Cordeiro e Anaya (2002), relatam que algumas proteínas do tecido vegetal que tenham suas síntese diminuída podem estar envolvidas nos processos de divisão celular, alongamento, formação de parede celular ou tráfego vesicular.

O padrão eletroforético das albuminas de hipocótilos de plântulas de feijão comum com estágio de germinação de 24 ao 30º dia (Figura 21) apresentou pelo menos predominância de três bandas protéicas nos períodos avaliados com MM entre 14 e 21,1 kDa e uma com MM maior que 97 kDa. Também foi visualizado em todos os períodos analisados arraste de proteínas com MM entre 30 a 97 kDa.

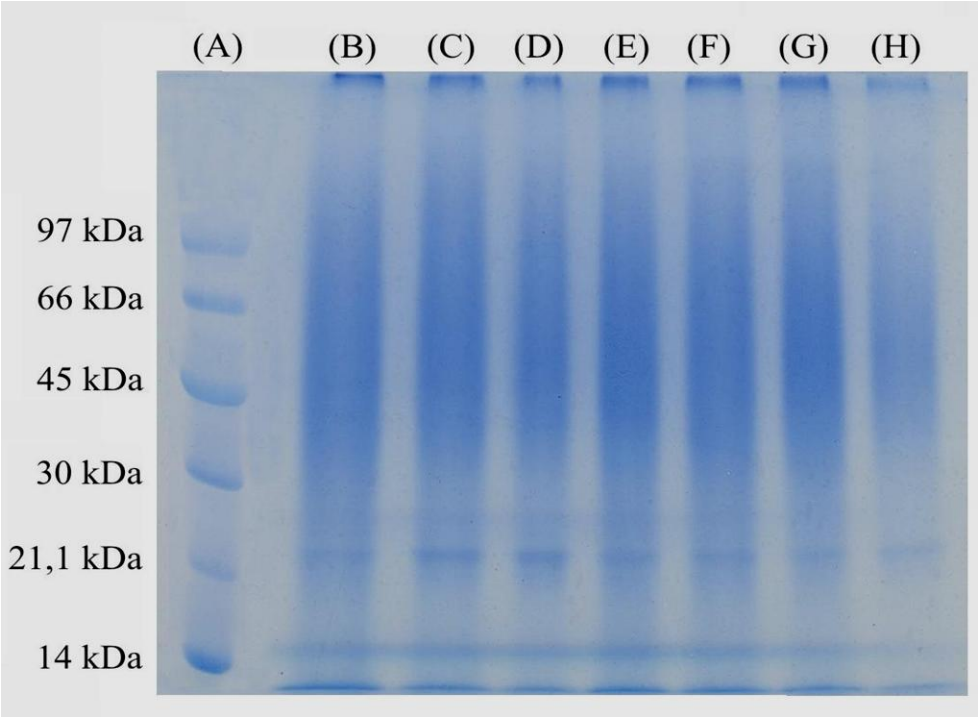


Figura 21 – I – Eletroforese das albuminas de hipocótilo de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24º ao 30º DG).

4.4.3. Folhas e Raízes

Os extratos brutos das farinhas de folhas e raízes de plântulas de feijão comum com 24 ao 30º dia de germinação apresentaram concentrações protéicas máximas de 31,51 mg/g F e 20,44 mg/g F, respectivamente. Em ambos os extratos as máximas concentrações ocorreram em plântulas com 29 DG (Figura 22 e 23).

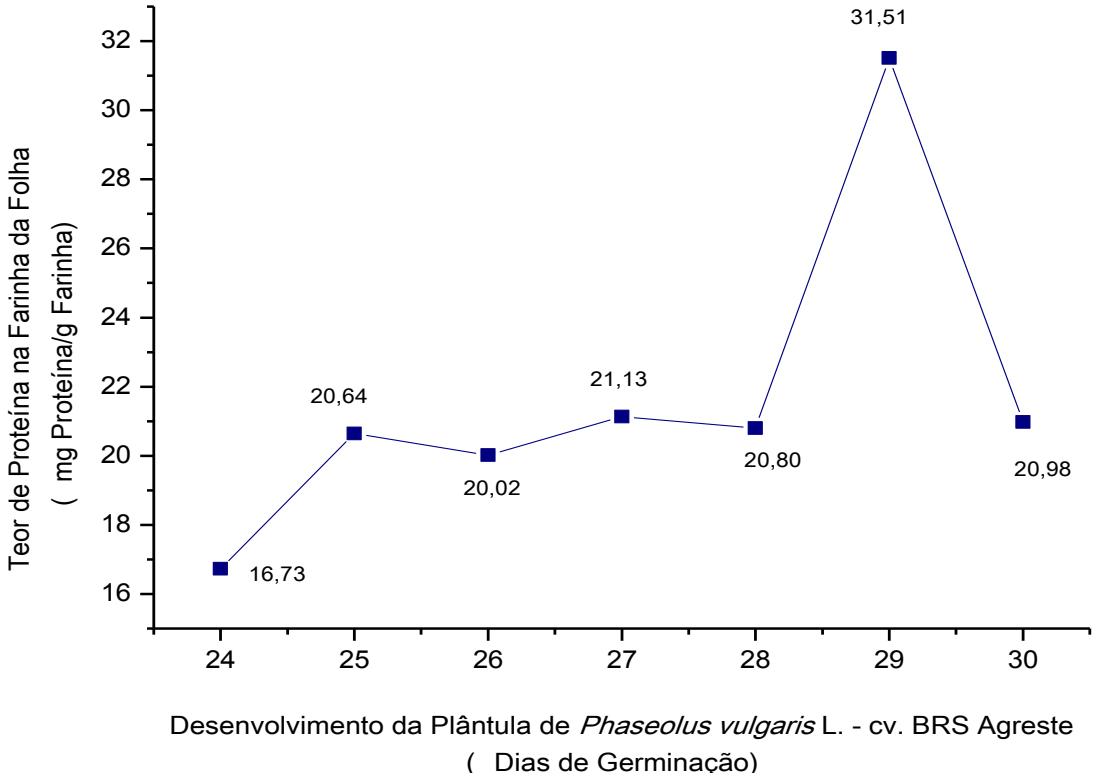


Figura 22 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de folha de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia.

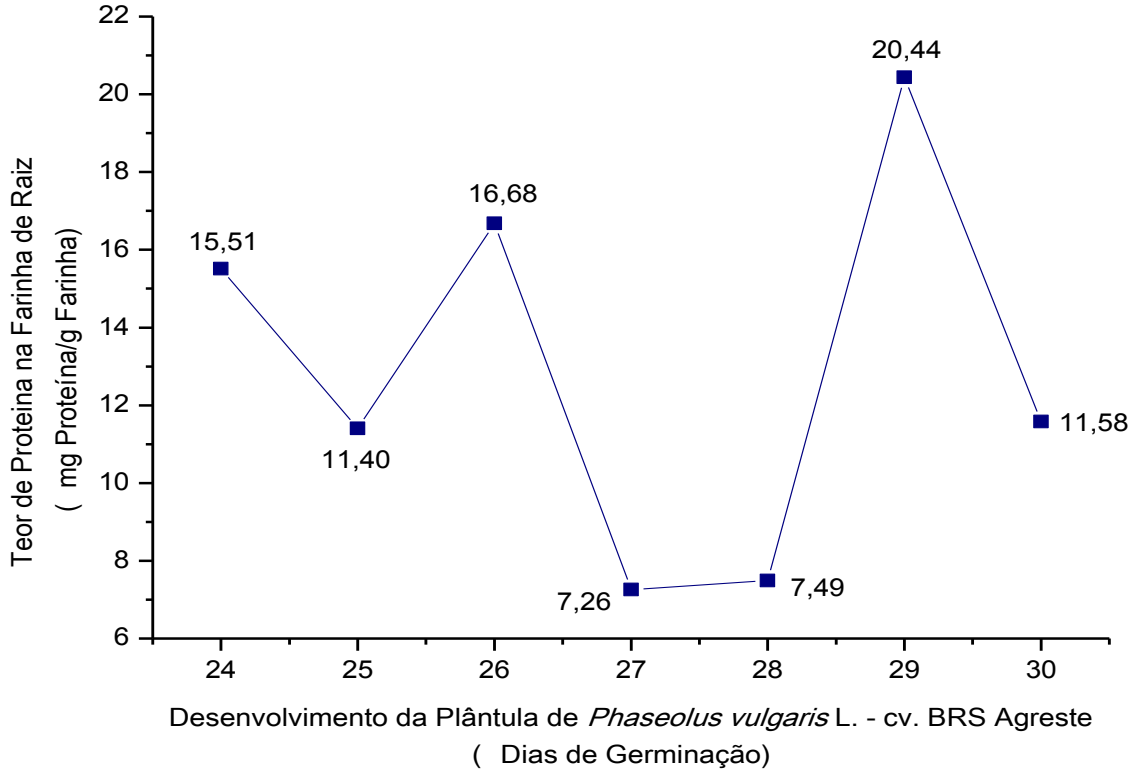


Figura 23 – Dosagem de proteína do extrato bruto da farinha de raízes de plântulas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágio de germinação de 24 ao 30º dia.

Observa-se que o teor protéico da raiz apresenta variações bruscas em seu conteúdo. Uma explicação para tal, reside no fato de que nas plantas em pleno desenvolvimento apresentam algumas enzimas proteinases responsáveis pela hidrólise total de proteínas, liberando os aminoácidos. Os aminoácidos liberados podem ser reutilizados para síntese de novas proteínas ou podem ser desaminados para fornecer esqueletos de carbono para a síntese de novos compostos utilizados no crescimento do eixo embrionário (BEWLEY e BLACK, 1994).

O perfil eletroforético das albuminas de folhas (Figura 24) e raízes (Figura 25) de plântulas de feijão comum com estágio de germinação de 24 ao 30º dia

apresentou comportamento semelhante. Apesar dos extratos de folhas e raízes terem apresentado quantidades protéicas detectáveis por ensaio de Bradford, a presença de bandas não está nítida, talvez em virtude da baixa concentração da amostra. Apenas nas raízes é possível observar a presença de bandas protéicas (MM maior que 97 kDa), que podem ser consideradas como proteínas de reservas, além de arrastes de glicoproteínas (Figura 25).

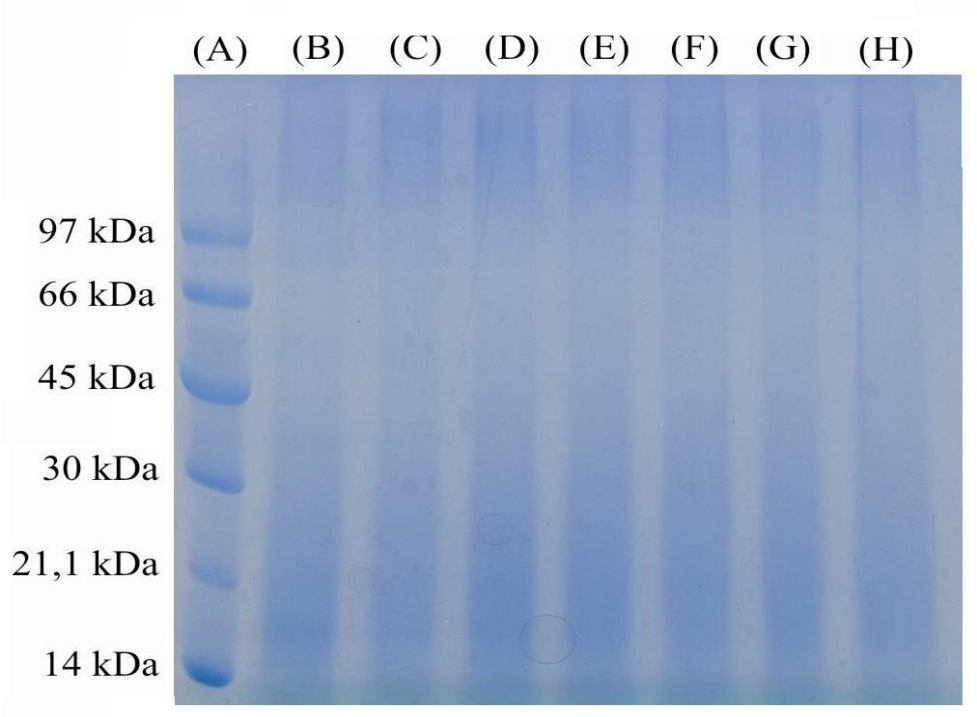


Figura 24 – I – Eletroforese das albuminas de folhas de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 a 30 DG).

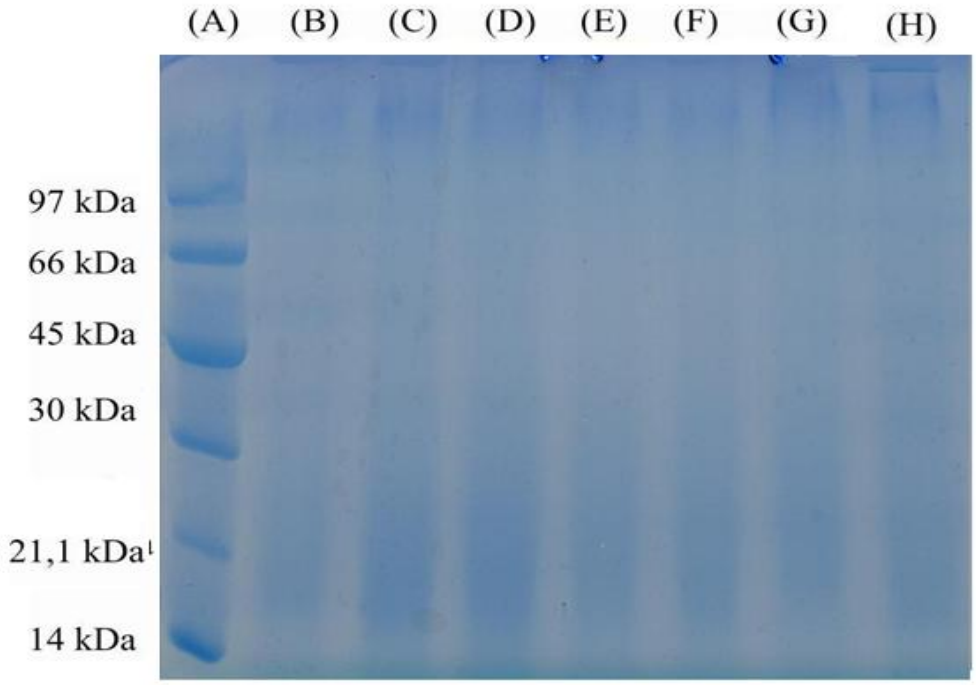


Figura 25 – I – Eletroforese das albuminas de raizes de plântulas de (*Phaseolus vulgaris* L., cv. BRS Agreste) com estágios de desenvolvimento de 24 ao 30º dia de germinação. A) Marcadores moleculares fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Poço de B a H, cotilédones de plântulas em ordem crescentes de dias de germinação (24 a 30 DG).

4.5. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-75 e Determinação Protéica dos Extratos de Raízes de Plântulas de Feijão no Estádio I

A purificação do extrato bruto de raízes de plântulas de feijão no estágio I (1 mL) pela coluna de afinidade (Sephadex G-75) resultou em um primeiro pico ($P_{(R\ I\text{-}1)}$) (tubos de 3 a 8) (Figura 26), que representam as frações não-ligantes da matriz da coluna Sephadex obtidas pela eluição com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4

contendo NaCl 0,15 M e os sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM, as quais foram misturadas, concentradas, constituindo o extrato de R I não-retido na matriz. Posteriormente, o nível basal foi atingido e então picos (tubos 46 a 49; 50 a 59 e 63 a 65) foram obtidos (Figura 26) pela eluição com o mesmo tampão, mas com concentração de NaCl 1,5 M. Esses foram misturados, concentrados constituindo o extrato retido na coluna demonstrada pala AH.

O $P_{(R\ I\text{-}1)}$ era a fração de interesse por ser tratar de possíveis proteínas glicosiladas e com atividade de CKO, sem a presença da lectina PHA que ficou retida na coluna.

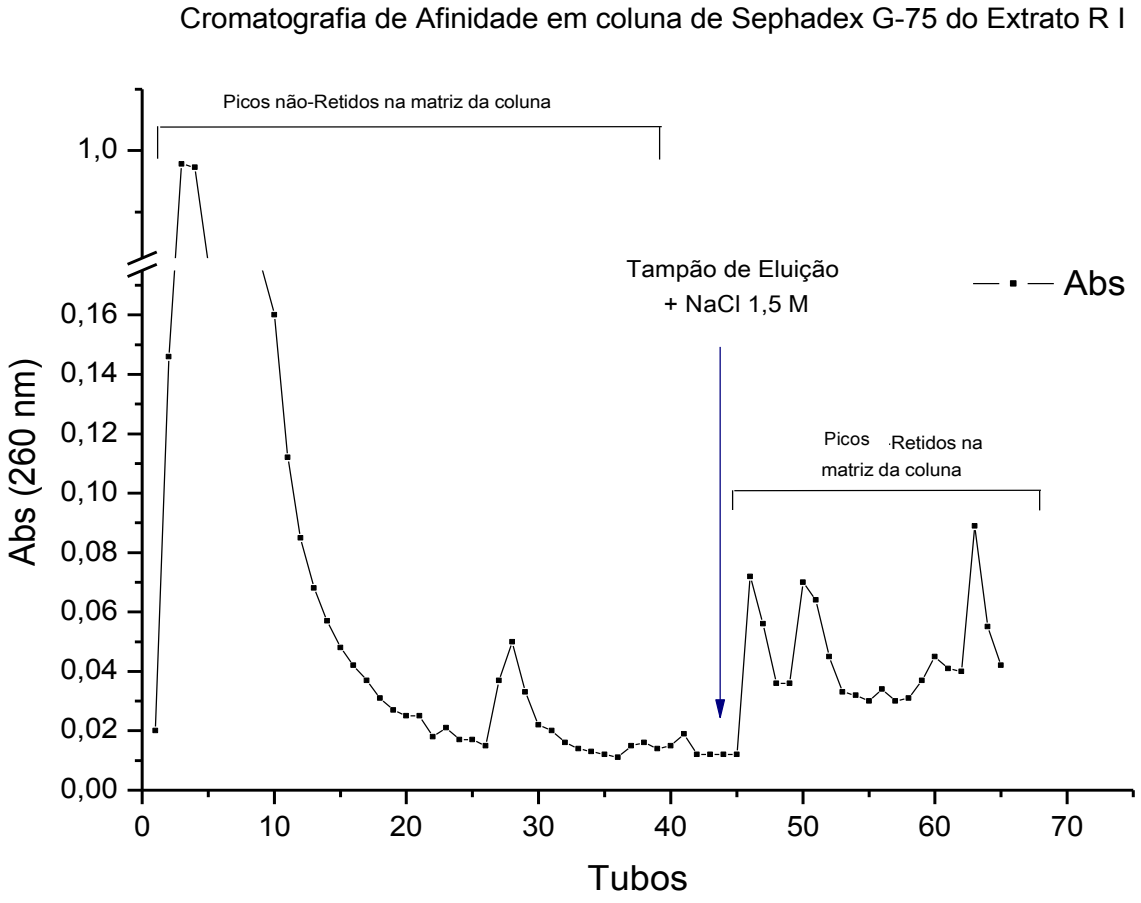


Figura 26 - Eluição do extrato bruto de raízes de plântulas de feijão no estádio I de desenvolvimento por meio do uso da coluna de Sephadex G-75. A fração não-retida foi eluida com Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 com adição de NaCl 0,15 M e sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM e a fração retida com o mesmo tampão com NaCl 1,5 M.

O conteúdo protéico do extrato de R I e dos picos não-retidos e retidos purificados em Sephadex G-75 foi 0,65 mg/mL para o extrato bruto de R I, 0,30 mg/mL para o $P_{(R\ I)}$ não-ligante na coluna e 0,03 mg/mL (picos da fração 46 a 49), 0,04 mg/mL (picos da fração 50 a 59) e 0,06 mg/mL (picos da fração 63 a 65), esses três últimos retidos na coluna com AH.

4.6. Purificação do P $_{(R\ I-1)}$ da Sephadex G-75 em ConA-Sepharose e Determinação Protéica

Este passo foi de fundamental importância, pois permitiu partionar o P $_{(R\ I-1)}$ da Sephadex (Figura 27) em proteínas glicosiladas com resíduos glicose/manose (carboidrato afim da ConA) e proteínas não-glicosiladas ou com outros resíduos glicídicos. Como o P $_{(R\ I-1)}$ apresentou pico retido à coluna de ConA-Sepharose, possivelmente contém a CKO, uma vez que, segundo dados reportados na literatura, a CKO é uma glicoproteína e tem na sua porção de carboidrato, glicose que é conservada em várias espécies.

Inicialmente o P $_{(R\ I-1)}$ foi eluído com o tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 com adição de NaCl 0,15 M e sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM, possibilitando eluição de proteínas (quatro picos não-retidos) sem afinidade a ConA (Figura 27).

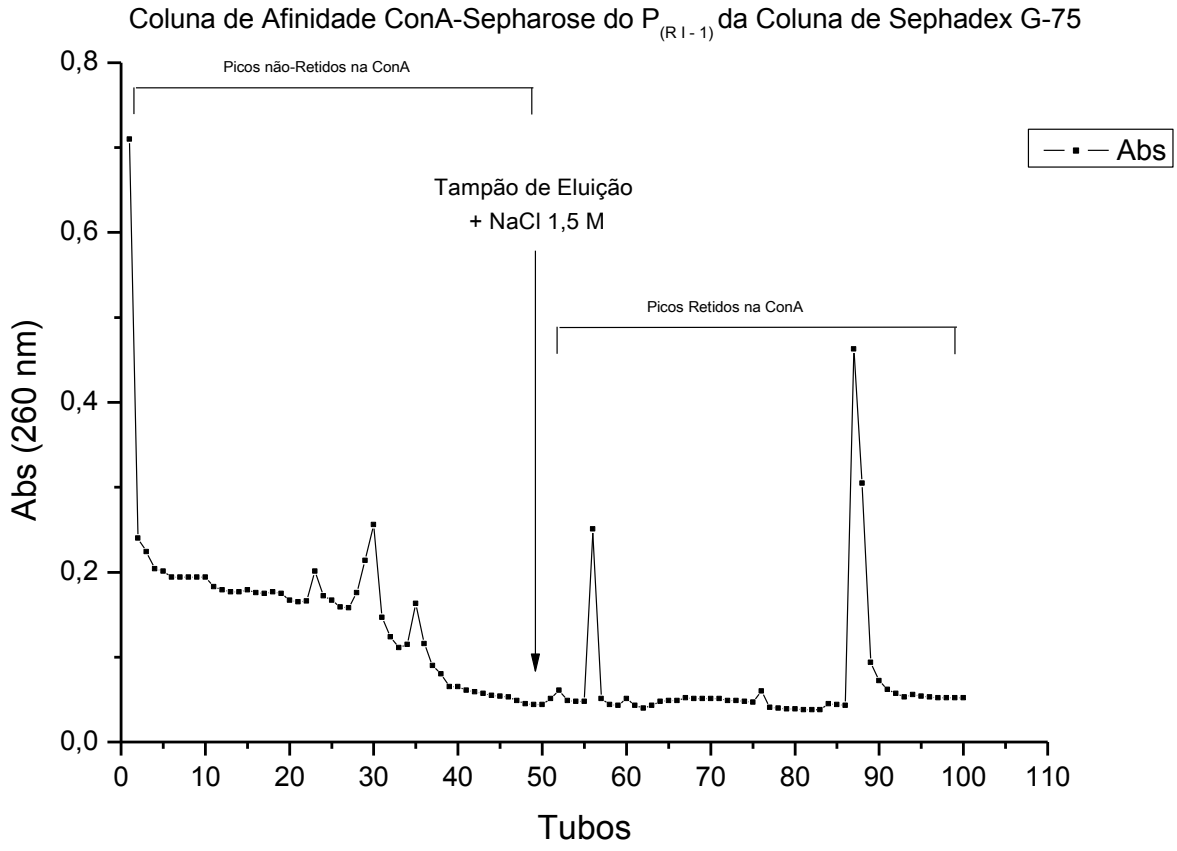


Figura 27 - Eluição do P (R I-1) da Sephadex G-75 por meio do uso da coluna em ConA-Sepharose. A fração não-retida na ConA foi eluida com Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 com adição de NaCl 0,15 M e sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 5 mM e a fração retida na ConA com o mesmo tampão com NaCl 1,5 M.

Posteriormente, o nível basal foi atingido e então dois picos (tubos 56 e 57 – P $_{(I\ ConA)}$; tubos 87 a 89 – P $_{(II\ ConA)}$) foram obtidos (Figura 27) pela eluição com o mesmo tampão, mas com concentração de NaCl 1,5 M. Esses foram concentrados constituindo o extrato retido na coluna e submetidos ao teste de atividade de CKO.

O conteúdo protéico do pico P $_{(I\ ConA)}$ foi de 0,02 mg/mL e do P $_{(II\ ConA),}$ 0,05 mg/mL.

4.7. Ensaio da Atividade da Citoquinina Oxidase nos Picos P $_{(I\ ConA)}$ e P $_{(II\ ConA)}$ Purificados na Coluna de ConA-Sepharose

A presença da CKO nos picos P $_{(I\ ConA)}$ e P $_{(II\ ConA)}$ purificados na coluna de ConA-Sepharose foi demonstrada a partir da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 352 nm. O resumo das absorbâncias para o teste de atividade de CKO pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5 – Ensaio da atividade da CKO nos picos P (I ConA) e P (II ConA) purificados na coluna de ConA-Sepharose.

Picos Purificados em ConA-Sepharose[1/]	Absorbância
P $_{(I\ ConA)}$	0,095
P $_{(II\ ConA)}$	0,120

1/ Extratos dos picos obtidos na ConA-Sepharose em reação com imidazol (0,2 M; pH 6,5), $CuCl_2$ 2 mM, H_2O, isopenteniladenina, TCA 40 % e 4-dimetilamino benzaldeído 0,03 %.

O cobre e imidazol estimulam a atividade da citoquinina (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1987). A CKO em contato com o substrato da CK (isopenteniladenina) catalisa a desalquilação oxidativa das isopenteniladenina e isopenteniladenosina, produzindo adenina ou adenosina e 3-metil-2-butenal (Figura 28). Em condições ácidas o 3-metil-2-butenal reage com o 4-dimetilamino benzaldeído para formar uma base de Schiff altamente luminescente detectável em comprimento de onda máximo de 352 nm (Figura 28). Esse ensaio é baseado no

protocolo geral para detecção de 2,3-aldeído insaturado descrito por Pesez e Bartos (1974). O ensaio tem limite de detecção em intervalos submicromolares e é linear em torno de 150μM de 3-metil-2-butenal. O desenvolvimento de cores é completado em 2 minutos e é estável por várias horas.

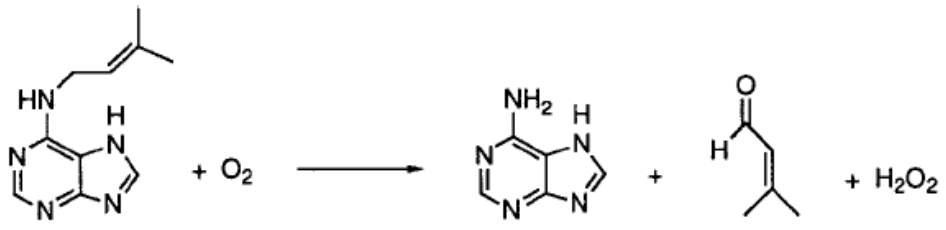


Figura 28 - Esquema da formação da base de Schiff.

Libreros-Minotta e Tripton (1995), em estudo semelhante da atividade de CKO em extratos vegetais, descreveram o ensaio baseado na formação de uma base se Schiff a partir da reação enzimática entre 3-metil-2-butenal e ρ-aminofenol.

Fazendo referência ao complexo metálico cobre-imidazol, Chatfield e Armstrong (1986) estudaram os efeitos de uma série de íons metálicos sobre a atividade “in vitro” de citoquinina oxidase extraída de tecidos de “callus” de *Phaseolus vulgaris* L., cv. Great Northern a partir de ensaio baseado na degradação do i^6Ade-2,3-^{3}H para Ade. A atividade “in vitro” da enzima foi sensivelmente reforçada na reação contendo cobre e imidazol. Esses autores confirmaram que o complexo desses dois metais são específicos e aumentam atividade da citoquinina,

substituindo por oxigênio no mecanismo de reação. Assim, se a clivagem do oxigênio-dependente de um iminopurina intermediária normalmente limita a taxa de reação citoquinina de oxidase, o complexo cobre-imidazol pode aumentar a concentração efetiva e/ou reatividade do oxidante necessário para a repartição dos intermédios. É possível que a formação de complexos envolvendo citoquininas e cobre também possam desempenhar um papel no reforço da reação.

5. CONCLUSÕES

Todas as determinações da composição fisico-química, com exceção para o teor protéico, são registros inéditos para essa cultivar.

A quantificação de proteínas solúveis na farinha de sementes da cultivar em estudo, demonstrou quantidades de 24,95 mgP/gF com predominância de proteínas de pesos MM entre 21,1 kDa e 97 kDa.

O fracionamento com sulfato de amônio na saturação de 20-60 %, possibilitou a precipitação de 15,55 mgP/gF.

Nas plântulas germinadas, pode-se verificar que o teor protéico varia de acordo com o tecido vegetal analisado e o tempo de germinação. Nos cotilédones, raízes e folhas a concentração protéica foi máxima aos 29 DG, havendo um decréscimo após esse período. Ressalta-se que na raiz as variações foram maiores. Nos hipocótilo, a maior concentração ocorreu aos 24 DG. A variação nesses conteúdos protéicos pode está atrelado a síntese/degradação de proteínas durante os processos de divisão celular, alongamento, formação de parede celular ou tráfego vesicular.

A cromatográfica de afinidade do extrato bruto de raízes de plântulas no estádio de desenvolvimento I em coluna de Sephadex G-75 foi eficiente na remoção de lectina PHA, sem interesse nesse trabalho; e isolamento de proteínas glicosiladas e ou com outros resíduos glicídicos, evidenciadas em um pico P $_{(R\ I\text{-}1)}$.

A purificação de $P_{(R\ I\text{-}1)}$ na coluna de ConA-Sepharose possibilitou separação de dois picos de proteínas glicosiladas com resíduos glicose/manose (carboidrato afim da ConA) retidos na coluna (característicos de CKO).

O teste de atividades biológica nos dois picos purificados na ConA-Sepharose demonstrou a presença de CKO, uma vez que a reação com a isopenteniladenina (substrato da CK) quando em contato com a CKO foi degradada, havendo formação da base de Schiff que é luminescente e foi detectável em comprimento de onda de 352 nm.

6. BIBLIOGRAFIA

ANGRA, R.; MANDAHAR, C. L.; GULATI, A. (1990). The possible involvement of cytokinins in the pathogenicity of Helminthosporium maydis. **Mycopathologia.** *199*, 177-82.

ANTUNUES, P. L; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G. J. (1995, JAN-ABR). Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), Cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. ***Revista Brasileira de Agrociência**, 1*.

ARMSTRONG, D. J (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: MOK, D. W. S.; MOK, M. C. eds. **Cytokinins: Chemistry, Activity and Function**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1139-1154.

ARTECA, R. (1996). **Plant Growth Substances: Principles and Applications.** Chapman & Hall, New York, 332p.

ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A., ANGELES, E. R; QIAN, Q; KITANO, H; MATSUOKA, M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science.** 309, 741–745.

BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. (1993b). Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry breans as affected by processing. **Journal Food Scienc***.* 59, 833-837.

BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. (1993a). Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. **Food Chemistry**, Barking, v.47, n.2, p.159-167.

BEEBE, S. E.; SKROCH, P. W.; TOHME, J.; DUQUE, M. C.; PEDRAZA, F.; NEIENHUIS, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**. 40, 264-273.

BEWLEY, J. D. (1997, Jul). Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**. 9, 1055-1066.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. (1994) **SEEDS: Physiology of Development and Germination.** 2 ed. New York, Plenum Press, 445p.

BILYEU, K. D; COLE, J. L; LASKEY, J.G; RIEKHOF, W. R; ESPARZA,T.J; KRAMER, M. D; MORRIS, R. O. (2001). Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. **Plant Physiology**. 125, 376–386.

BONATO, C. M.; RUBUIN FILHO, C. J.; MELGES, E.; SANTOS, V. D. (1998). **Nutrição Mineral de Plantas.** Maringá: Universidade Estadula de Maringá (UEM).

BORGHETTI, F. (2004). Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p. 109-124.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** 72, 248-254.

BRIGIDE, P. (2002). **Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados**..Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 58p. ESALQ/USP. Dissertação (Mestrado).

BROWNLEE, B. G.; HALL, R. H.; WHITTY, C. D. (1975). Biosynthesis and cytokinin activity of 8-hydroxy and 2,8-dihydroxy derivatives of zeatin and N^6-(Δ2-isopentenyl) adenine. **Biochemistry**. 14, 3088-93.

BRÜCKER, H. (1969). Die evolution der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* L. aus der südarnerikanischen Wildbohne **Ph. Aborigineus Burk. Angew. Bot.** 42, 119-128.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; AIDAR, M. P. (2004). Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p. 163-185.

BUNCH, H. D. (1959, Oct.). Temperature, relative humidities factores in maintaining store seed viability. **Seedsmen's Digest** .

BURKART, A.; BRÜCKER, H. (1953). *Phaseolus aborigineus* Burkart, die nutmassliche andine Stammoform der Kulturbone. **Züchter.** 23, 65-72.

CABRERA, C.; LORIS, F.; GIMÉNEZ, R.; OLALLA, M.; LÓPEZ, M. C. (2003) Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. **The Science of the Total Environment,** Amsterdan, 308, 1-14.

CÁRDENAS, L. L. (2006). **Biodisponibilidade de zinco e de ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamentos domésticos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 189p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos).

CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. (2008, jan./mar.). Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 28, 200-213.

CASTELLÓN, R. E.; ARAÚJO, F. M.; RAMOS, M. V.; ANDRADE NETO, M.; FREIRE FILHO, F. R.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S. (2003). Composição elementar e caracterização das frações lipídicas de seis cultivares de caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 7, 149-153.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. (2004). Embebição e reativação do metabolismo. In: BORGHETTI, A. F., **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 149 – 162.

CASTRO, R. D.; VAN LAMMEREN, A. A.; GROOT, S. P.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. (2000, Feb). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**. 122, 327-335.

CHATFIELD, J. M.; ARMSTRONG, D. J. (1986). Regulation of Cytokinin Oxidase activity in Callus Tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. ***Plant Physiol.*** 80, 493-99.

CHATFIELD, J. M; ARMSTRONG, D. J (1987) Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus tissues: enhanced *in vitro* activity of the enzyme in the presence of copper-imidazole complexes. **Plant Physiol.** 84, 726–731.

CORRÊA, M. M. (2007). **Avaliação da qualidade tecnológica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) de sete cultivares, quanto à: absorção de água, tempo de cozimento, hard-shell, e aos teores de ferro e zinco antes e após diferentes métodos de cozimento doméstico.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos).

COSTA, G.; QUIROZ-MONICI, K.; REIS, S.; OLIVEIRA, A. (2006). Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked peã, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chem**. 94, n. 3, 327-330.

CRUZ-ORTEGA, R.; AYALA-CORDERO, G.; ANAYA, A. L. (2002). Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminate:* effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiologia Plantarum**. 116, 20-27.

DA SILVA, E. A. (2000). **Coffee *(Coffea arabica cv. Rubi)* seed germination: mechanism and regulation.** The Netherlands: Wageningen Agricultural University, Wageningen, 105p. Thesis (Ph.D).

DAVIES, P. J. (1995). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.** 4 ed. Dordrecht: Klumer Academic Publishers. 750p.

DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. (2000). Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** 12, 105-136.

DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (1997). **Plant Biochemistry**. Londres: Academic Press. 554p.

DIETRICH, J. T.; KAMINEK, M.; BLEVINS, D. G.; REINBOTT, T. M.; MORRIS, R. O. (1995). Changes in cytokinins and citokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development. **Plant Physiol Biochem.** 33, 327-36.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO (2009 a). **Origem e história do feijão**. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>. Acesso em: maio 2009.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO (2009 b). **Cultivares de Feijão: sistemas de cultivo**. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm>. Acesso em: maio 2009.

ESTEVES, A. M. (2000). **Comparação química e enzimática de seis linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** Lavras: Universidade Federal de Lavras. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).

FONSECA, N. R.; MYCZKOWSKI, M. L.; PRIOR, M.; SÁ, R. O.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZANOTTO, M. D. (2004). Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de mamona. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA***, 1*. Anais... , 2004

FONSECA, S. V., VIEIRA, C., MINIM, V. P.; CARDOSO, A. A. (2002). Folhas verdes de feijão na alimentação humana: avaliação sensorial, adubação nitrogenada e desfolhamento. **Bragantia.** Campinas, 61, 161-167.

GALUSKA, P.; FRÉBORT, I.; SEBELA, M.; SAUER, P.; JACOBSEN, S.; PEC, P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. **Eur J. Biochem.** 268, 450-461.

GALUSZKA, P.; FRÉBORT, I.; SEBELA, M. PE'C, P. (2000) Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. **Plant Growth Reg**. 32, 315–327.

GARCIA, J. S. (2006) **Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas**. Campinas: UNICAMP. 150 p. Tese de doutorado em Ciências, 2006.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. (1994). Nutrition and health implications of bean: a review. **Journal American Clinical Nutrition**. 13, 549-558.

GENTRY, H. S. (1969, January). Origin of the Common Bean, *Phaseolus vulgaris*. **Economic Botany**. 23, 55-69.

GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science.** 266, 605-614.

GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. (1998). Gangorra de preços: a produção e o abastecimento de feijão na safra 1997/98 no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas.** 28, 60-65.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. (1955). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic and solvents. **Methods Enzymol.** 1, 67-90.

HABERLANDT, G. (1913). Zur Physiologie der Zellteilung. **Sitzber. Kgl. Preuss. Acad. Wiss**., **Berlim.** 318-345.

HALL, R. H. (1973). Cytokinins as a probe of developmental processes. **Annu Rev Plant Physiol**. 24, 415-44.

HARADA, J. J. (1997). Seed maturation and control of germination. In: LARKINS, B. A.; VASIL, I. K. **Cellular and molecular biology of plant seed development**. Dordrecht: Kluwer: Academic Publishers. p. 545-592.

HARE, P. D; VAN STADEN, J. (1994). Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. **Physiol Plant.** 91, 128-136.

HELDT, H. W. (1997). **Plant Biochemistry e Molecular Biology**. London: Oxford University Press. 522p.

HOUBA-HERIN, N.; PETHE, C.; D'ALAYER, J.; LALQUE, M. (1999). Cytokinin oxidase from Zea mays: Purification, CDNA cloning and expression in moss protoplasts. **Plant J.** 17, 615-626.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2009). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Produção de cereais, leguminosas e oleaginosas - comparação entre as safras 2008 e 2009** – Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuária/lspa/lspq_20095_7.shtm>. Acesso em: maio 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1976). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** v. 1. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; MUHAMMAD, S. K. (2006) Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry.** Oxford, v. 97, n. 2, 331-335.

JABLONSKI, J. R.; SKOOG, F. (1954). Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. **Physiol. Plant.** 7,16

JERONIMO, C. A. (2006). **Efeito do extrato aquoso de folhas de *Solanum licocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântula de *Sesamum indicum* L.** Distrito Federal: Universidade de Brasília, 75p. Dissertação Universidade de Brasília, Departamento de Botânica.

KAMÍNEK, M; ARMSTRONG, D. J (1990) Genotypic variation in cytokinino oxidase from *Phaseolus* callus cultures. **Plant Physiol.** 93, 1530-1538.

KAPLAN, L. (1965). Arqueology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Econ. Bot.** 19, 358.

KAPLAN, L; LYNCH, T. F.; SMITH, C. E. (1973). Early cultivated beans *(Phaseolus vulgaris)* from anVintermontane Peruvian valley. ***Science.*** 179, 76-77.

LABOURIAU, J. G. (1983). A germinação de sementes. **Monografias científicas**, 170. Washington: Organização dos Estados Americanos.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227, 680-5.

LASKEY, J.G; PATTERSON, P.; BILYEU, K.; MORRIS, R. O. (2003). Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. **Plant Growth Regulation.** 40, 189–196.

LETHAM, D. S.; PALN, I. L. (1983). The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annu Rev Plant Physiol.** 34, 163-97.

LIBREROS-MINOTTA, C. A.; TIPTON, P. A. (1995). A colorimetric assay for cytokinin oxidase. **Anal. Biochem.** 231, 339–341.

MALDONADO, S.; SAMMÁN, N. (2000). Composición química y contenido de minerales de leguminosas y cereales producidos en el noroeste argentino. **Arch. Latinoam. Nutr.** 50, 195-199.

MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M.; LAJOLO, F. M. (1996). Chemically determined total and available methionine in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated protein fractions. **Food Chem.** 55, 179-184.

MAUSETH, J. D. (1991). **Botany: An Introduction to Plant Biology**. Saunders College Publishing. Philadelphia, Pennsylvania. p. 348-415.

MCGAW, B. A; HORGAN, R. Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. **Biomedical and Life Sciences**.159, 30-37.

MELO, D. L. (2005). **Dormência em sementes de Annona crassiflora Mart.** Lavras: UFLA.

MELO, L. C.; COSTA, J. G.; PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; DIAZ, J. L C.; CARVALHO, H. W. L.; WARWICK, D.; RAVA, C. A.; PEREIRA, H. S.; SILVA, H. T.; SARTORATO, A.; FARIAS, J. C.; BASSINELLO, P. Z.; WENDLAND, A. (2008, Dez). BRS Agreste - Cultivar de feijoeiro comum de grão mulatinho com alatp potencial produtivo e porte ereto. **Comunicado Técnico**. 155 , 1ª, 2. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

MESQUITA, F. R. (2005). **Linhagens de Feijão: composição química e digestibilidade protéica.** Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos).

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M.; LIMA, R. A.; ABREU, A. F. (2007, jul./ago.). Linhagens de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade protéica. **Ciênc. agrotec**. 31, 1114-1121.

MICKEY, D. (1994). Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle . In: SPRENT, J. I.; MICKEY, D. **Advances in legume systematic 5: the nitrogen factor**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 221-228.

MILLER, C. O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M. H.; STRONG, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **J. Am. Chem. Soc.** 77, 1392-1393.

MILLS, L. J.; VAN STADEN, J. (1978). Extraction of cytokinins from maize, smut tumors of maize and Ustilago maydis cultivares. **Physiol Plant Pathol.** 13, 73-80.

MIRANDA-COLIN, S. (1967). Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijó1 común). **Agrociencia.** 1, 99-109.

MIRANDA-COLIN, S. (1979). Evolución de *Phaseolus vulgaris y P. coccineus. In* ENGLEMAN, E. M. ed. **Contribuciones al Conocimiento del Frijó1 *(Phaseolus)* en Mexico**. Chapingo, Mexico: IEICA, 83-99.

MOK, D. W. S; MOK, M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52, 89–118.

MOK, D. W. S; MOK, M. C. (1994). **Cytokinins-chemistry, Activity, and Function.** Boca Raton, FL: CRC Press, 340 p.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S..; DIXON, S. C.; ARMOSTRONG, D. J.; SHAW, G. S. (1982). Cytokinin structure-activity relationships and the metabolism of N6-(Δ2-isopentenyl) adenosine-8-14C in *Phaseolus vulgaris* callus tissues. **Plant Physiol**. 70, 173-178.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMOSTRONG, D. J. (1978). Differential Cytokinin Structure-Activity Relationships in *Phaseolus*. **Plant Physiol.** 61, 72-75.

MOK, M.C. (1994). Cytokinins and plant development: An overview. In: MOK; D. W. S.; MOK, M. C. **Cytokinins: Chemistry, Activity and Function**. (Boca Raton, FL: CRC Press), 155–156.

MORRIS, R.; BILYEU, K.; LASKEY, J.; CHEIKH, N. (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 225, 328-333.

MOTYKA, V; KAMÍNEK, M. (1992) Characterization of cytokinin oxidase from tobacco and poplar callus cultures. In: KAMÍNEK, M.; MOK, D. W. S.; ZAZÍMALOVÁ,

E. eds, **Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants**. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 33-39.

MOURA, A. C. (1998). **Análises físico-químicos e enzimáticas antes e após armazenamento em grãos de feijão *(Phaseolus vulgaris* L.) submetidos a diferentes tempos e tipos de secagem.** Lavras: Universidade Federal de Lavras. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).

MÜNTZ, K. et al. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany.** v. 52, n. 362, 1741-1752.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Sciences*. 8, 213-217.

OBROUCHEVA, N. V. (2000). The distinct controlling of dormancy release and germination commencement in seeds. In: VIÉMONT, J. D.; CRABBÉ, J. **Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control**. Wallingford: CABI, 35-45.

OLIVEIRA, J. T. A.; MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. (1998). Protein and lecitin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, 25-30.

OLIVEIRA, L. F. (1997). **Efeito da ingestão da mistura arroz e feijão na biodisponibilidade de ferro e cálcio.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

OSBORN, T. C. (1988). Genetic control of beans seed protein. **Crit. Rev. Plant Sci.** 7, 93-116.

PACES, V.; WERSTIUK, E.; HALL, R. H. (1971) Conversion of N^6-(Δ^2-Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. **Plant Physiology.** 48, 775-778.

PELOSO, M. J.; COSTA, J. G.; RAVA, C. A.; FARIA, L. C. (2002, Jan). **Cultivares: Cultivo do feijoeiro comum.** Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de Produção. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/cultivares.htm>. Acesso em: maio 2009.

PENG, J.; HARBERD, N. P. (2002). The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. **Current Opinion on Plant Biology.** 5, 376-81.

PEREIRA, C. A.; COSTA, N. M. (2002, jan./abr). Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). **Rev. Nutr**. 15, 5-14.

PESEZ, M.; BARTOS, J. (1974). **Colorimetric and fluorimetric analysis of organic compounds and drugs.** New York : Dekker. 270p.

PIRES, C. V. (2002). **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 68p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica).

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G.; CRUZ, G. A.; MENDES, F. Q.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A. (2005, abr./jun.). Composição fisico-quimica de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alim. Nutr**. 16, 157-162.

POPELKOVÁ, H.; FRAAIJE, M. W.; NOVÁK, O.; FRÉBORTOVÁ, J.; BILYEUS, K. D.; FRÉBORT, I. (2006). Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalised reaction: correlations with the crystal structure. **Biochem J.** 398, 113-24.

RAGHAVAN, V. (1997). **Molecular embryology of flowering plants**. New York: Cambridge University Press. p. 386–389

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. (2002) **Como obter sucesso na cultura do feijoeiro no Estado de Minas Gerais.** Lavras: EMBRAPA. 7 p. (EMBRAPA, Circular Técnica, 50).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (1992). **Biology of Plants**. New York: Worth. p. 545-572.

RIBEIRO, N. D.; JOST, E.; CERUTTI, T.; MAZIERO, S. M.; POERSCH, N. L. (2008). Composição de microminerais em cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. **Bragantia [online].** vol.67, n.2, pp. 267-273. ISSN . doi: 10.1590/S0006-87052008000200002.

ROMERO-ROMERO, M. T.; ANAYA, A. L.; CRUZ-ORTEGA, R. (2002). Screening for effects of phytochemical variability on cytoplasmic protein synthesis pattern of crop plants. **Journal of Chemical Ecology**. 28, 601-613.

ROSTON, A. J. (1990). Feijão. CATI, **Boletim Técnico**. 199, 18 p. Campinas.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. (1992). **Plant Physiology**. 4. Ed. Belmont: CA Wadsworth. 682p.

SCHMÜLLING, T; WERNER, T; RIEFLER, M.; KRUPKOVA, E; BARTRINA, Y; MANNS, I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. **Journal of Plant Research.** 166, 241–252.

SCHMULLING, T.; WERNER, T. (2008). **Patent No. 7,332,316 B2.** US.

SCOTT, M.; MARTIN, C. G.; HORGAN, R.; HEALD, J. K. (1982) Mass spectrometric measurement of zeatin glycoside levels in *Vinca rosea* L. crown gall tissue. **Biomedical and Life Sciences.** v. 154, n. 3, 273-276.

SILVA, O. F. (2004). **Sócioeconomia: Desenvolvimento da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, Safras 2000/2001 a 2007/2008.** Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/feijao/comportamentofeijao.htm>. Acesso em: maio 2009.

SIMARD, R. (1993). Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry breans as affected by processing. **Journal Food Scienc***. 95*, 833-837.

SINGH, S. P. (1995). Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. **Crop Science.** 35, 118-124.

SOARES, A. G. (1996). Consumo e qualidade nutritiva. **Anais da 5ª Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão.** 2 , 73-79. Goiânia: UFGO.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. (2000). Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal.** v. 12, n. 3, 226-245.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2009). **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: ARTMED, 719p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (1998). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA – SPI/EMBRAPA CNPH.

VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M. E.; BLAKESLEE, A. F. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of Datura embryos. ***Science***. 94, 350.

VILLAVICENCIO, A.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCEÉ, H. (2000). Efect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans. **Radiation Physics Chem**. 57, 289-293.

WELCH, R. M.; HOUSE, W. A.; BEEBE, S.; CHENG, Z. (2000). Genetic selection for enhanced biovailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **J. Agric. Food Chem.** 48, 3576-3580.

WERNER, T., MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. **Communicated by Jozef S. Schell, Max Planck Institute for Plant Breeding Research**. Cologne, Germany, Jun, 2001, 1-6,

YADEGARI, R.; GOLDBERG, R. B. (1997). Embryogenesis in dicotyledonous plants. In: LARKINS, B. A.; VASIL, I. K. **Cellular and molecular biology of plant seed development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 3-52

YOKOYAMA, L. P. (2003, Janeiro). Importância econômica. Cultivo do feijoeiro comum. **Sistemas de Produção, 2, Embrapa Arroz e Feijão***, Jan/2003. Versão eletrônica. Disponível em: <http://Embrapa Arroz e Feijão*. Retrieved maio 2009, from Cultivo do feijoeiro comum. Sistemas de Produção, Importância econômica: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.HTM.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo