

ESTELA MARIA VIEIRA ARRUDA

7-ARQUIVO

DETERMINAÇÃO DE CATALASE  
EM  
PHASEOLUS AUREUS

TESE DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA  
APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ

CURITIBA - 1968

DETERMINAÇÃO DE CATALASE EM PHASEOLUS AUREUS

ESTELA MARIA VIEIRA ARRUDA

Tese de mestrado em Bioquímica  
apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do  
Faraná.

CURITIBA

-1968-

## INTRODUÇÃO

As catalases são caracterizadas pelo fato de utilizarem o peróxido de hidrogênio como doador de hidrogênio e também como substrato na reação catalítica da água oxigenada para formar oxigênio e água. Além da reação catalítica, as catalases podem efetuar a oxidação peroxidativa de uma grande variedade de doadores orgânicos (1).

As catalases são classificadas como hemoproteínas juntamente com peroxidases, hemoglobina, mioglobina e citocromos. Enquanto o papel fisiológico do transporte de oxigênio, armazenamento e utilização dos pigmentos estão bem definidos, a importância da catalase e peroxidase ainda não está esclarecida (2). Observações empíricas indicam que a atividade de catalase e peroxidase pode ser usada como índice do valor da entalpia de inativação de enzimas responsáveis pelo desenvolvimento de perda de sabor de frutas (3).

Eurris (1) cita que em 1901, Loew, baseado em suas observações, declarou não existir um grupo de organismos, qualquer órgão ou mesmo uma simples célula vegetal ou animal que não contivesse alguma quantidade de catalase. Trabalhos posteriores vieram demonstrar a ausência de catalase somente em bactérias obrigatoriamente anaeróbicas e algumas bactérias microaerófilas. A concentração de catalase nos tecidos animais é usualmente maior do que nos tecidos de plantas superiores. Estudos sobre catalases de plantas são muito limitados pelas dificuldades de isolamento, problema resolvido por Galston em 1951 (4).

Dependendo do pH do meio, sais inorgânicos de ferro possuem as propriedades de uma oxidase e de um transportador de elétrons, mas sua capacidade para funcionar como catalase ou peroxidase é muito pequena. Quando é incorporado ferro ao anel de porfirina a atividade de catalases e peroxidases é aumentada (5). Abadia (6) demonstrou que folhas deficientes em ferro apresentam pouca atividade de catalase e que 48 horas depois da injeção deste elemento há um aumento de atividade da enzima. Foi observado que o cobre é essencial para a formação de catalase e para a manutenção de sua atividade em fígado de rato (5). Observou-se também que a atividade da catalase é muito maior em vegetais deficientes em cobre do que em vegetais normais e que há acúmulo de ferro nos nódulos de vegetais deficientes em cobre. Parece que o cobre constitui parte do mecanismo regulador para o ferro em cereais (5). Pattanaik (7) observou maior atividade de catalase em arroz com quantidade adequada de manganês em comparação com plantas deficientes. Vilmeyer et alii (8) estudaram recentemente os efeitos da deficiência de ferro e manganês sobre a atividade de catalase em plantas e observaram que houve diminuição na atividade desta enzima. Appleman (9) observou que plantas de cevada no início do estágio de deficiência em manganês apresentavam maior atividade de catalase do que em plantas com solução nutriente completa. Finkle e Appleman (10) também investigaram o efeito do manganês sobre a produção de catalase por Chlorella.

Kasanski, citado por Altschul e Karon (11), determinou que a atividade da catalase pode ser destruída seletivamente por incubação da solução de enzima com pirogalol. Stern e Bird (12) observaram supressão de atividade de catalase por peroxidase e seus substratos em preparações de sementes.

Chartrenne (13) demonstrou que a azida inibe quase completamente a atividade da catalase sem impedir no entanto a formação desta enzima. Concluiu que a azida pode mesmo favorecer a síntese de catalases. Gautheret (14) cita Galston, o qual observou que estimulantes do desenvolvimento de tecidos vegetais baixam a atividade da catalase, assim como retardantes do crescimento de vegetais - causam um aumento considerável na atividade desta enzima. Em 1930 Adams (15) estudou o mecanismo de ação de numerosas substâncias, incluindo hormônios androgênicos, sobre catalase de fígado de camundongo. Warren e Rechcigl (16) conseguiram inibir catalase, conservando a atividade de peroxidase em leucócitos polimorfonucleares, usando como inibidor aminotriazol.

Estudos sobre variações de atividade de catalase em vegetais foram realizados por varios autores sob diversas condições. Altschul et alii (17) investigaram a atividade de catalase e peroxidase em sementes de algodão. Burris (1) cita Pattanaik, que observou mais baixa atividade de catalase em pétalas do que em folhas de Hibiscus. Observou também que a atividade da catalase era maior nas folhas do que nas raízes de arroz. Biale (18) cita Ezell e Gerhardt, os quais observaram aumento de atividade de catalase com o aumento de maturação de maçãs. Observaram também (19) que a atividade da catalase de pêras é inicialmente alta, diminui para um mínimo durante o desenvolvimento e outra vez eleva-se nos últimos estágios de maturação. O ponto de atividade máxima de catalase é considerado ótimo para a colheita de frutas destinadas à preparação de conservas. Autores (20) observaram que a atividade da catalase é maior em tecidos de plantas com tumor do que em tecidos de plantas normais. Em 1954 Galston, citado em Bonner e Bandurski (21) observou que

há uma correlação inversa entre o crescimento dos tecidos vegetais e o conteúdo de catalase. Szendrai e Juhasz (22) observaram aumento de atividade de catalase em vegetais durante a primavera e diminuição quando se aproximava o fim do verão. Estudos ainda mais recentes de Narayanaswamy e Ramakrishnan (23) sobre plantas infectadas, demonstraram variações na atividade de diversas enzimas, sendo observado aumento de atividade de catalase nas folhas do vegetal infectado. Whaley (24) demonstrou que tomates hibridizados apresentam maior atividade de catalase do que seus pais. Foram determinadas variações na atividade de catalase de algodão hibridizado (25) e diminuição da atividade desta enzima foi recentemente observada durante o período de amadurecimento de morangos (26). Gylling e von Euler (27) observaram que folhas de uma mutante de cevada apresentava 10 a 20 vezes a quantidade de catalase de folhas normais. Nakai e Ynaba (28) observaram que quando folhas de tabaco se tornam velhas havia diminuição de atividade de catalase. A variação anual de atividade de catalase foi medida recentemente em folhas de árvores e arbustos por Myhalyfi (29). Os problemas de nutrição mineral, formação de clorofila e produção de catalase podem ser correlacionados. Appleman (30) sugeriu que quando está ocorrendo rápida síntese de clorofila, a quantidade de catalase de plantas diminui e quando a síntese de clorofila é bloqueada há novamente formação de catalase. Burris (1) cita Schwarze o qual concorda com a conclusão de que se a produção de clorofila é impedida, mais porfirina fica disponível para outras sínteses. Eyster (31) estudou catalase e sua possível participação na fotossíntese. A localização intracelular desta enzima tem sido investigada por numerosos autores, por diferentes métodos, principalmente em tecidos animais. Ludewig e Chanutin (32) em 1950, estudaram a distribuição intracelular da catalase em fígado de rato,

usando como técnica de fracionamento a referida por Schneider (33). Observaram alta atividade de catalase na fração correspondente à mitocôndria e no sobrenadante e apenas traços em outras frações. Thompson e Klinfel (34) utilizando o método de gradiente de centrifugação diferencial no estudo de fígados de ratos e camundongos, encontraram grande diferença nas duas espécies, sendo a catalase de material de ratos associada aos microssomas e a catalase de fígado de camundongo às partículas que continham uricase. Em 1955 Greenfield e Frice (35) apresentaram um método de isolamento de catalase de fração mitocondrial de fígado de rato. Mais tarde foi estudada por Adams e Burgess (36) a redistribuição da catalase durante a incubação de fatias de fígado de camundongo. Em 1950 de Duve et alii (37) estudaram a localização intracelular da catalase e oxidases em fígado de rato. Três anos mais tarde de Duve et alii (38) continuando os estudos sobre localização de catalase em fígado de rato e realizando o fracionamento sob diversas condições, concluíram que as partículas que contem catalase são diferentes de mitocôndria e lisosomas. Em trabalho posterior, de Duve (39) propôs o termo peroxissomas para designar estas partículas.

Antes de 1950 são encontradas na literatura botânica poucas referências sobre localização intracelular de enzimas em célula vegetal, baseados mais em observações citológicas do que em estudos enzimáticos. Porém os estudos realizados por Dounce (40) em 1950 são de grande utilidade para a orientação de investigação neste campo. Hagen e Jones (41) em 1952 estudaram alguns fatores envolvidos na aparente localização intracelular de enzimas em preparações de folhas, incluindo temperatura, pressão osmótica, força iônica pH. Determinaram que a atividade desta enzima estava associada a cloroplastos

em pH 5, mas em preparações realizadas em pH 3, 3 ou 5, a atividade de catalase foi encontrada predominantemente na fração solúvel. No ano seguinte Mc Clendon, citado por Burris (1) fracionou homogenados de folhas de tabaco e determinou que a catalase estava presente em todas as preparações numa quantidade aproximadamente proporcional ao conteúdo de proteína de cada fração, portanto não se encontrava concentrada nos cloroplastos. Burris (1) cita também Jagendorf e Wildman que estudando preparações de folhas de tabaco determinaram que a fração correspondente à mitocôndria era rica em catalase e os cloroplastos purificados continham pouco ou quase nada desta enzima. No ano seguinte Goddard e Stafford (42) discutiram o problema da localização intracelular de enzimas de plantas e concluíram que a catalase estava localizada na fração mitocondrial. Em trabalho mais recente, Murphy e Maier (43) chegaram aos mesmos resultados.

A germinação de sementes geralmente provoca uma variação na atividade de catalase e peroxidase.. Altschul et alii (17) estudaram a atividade de catalase em sementes de algodão e observaram que a quantidade de catalase extraível diminui durante a germinação. Estes autores citam que Delea no em 1909 investigou as variações de catalase e peroxidase durante a germinação de sementes de Ricinus communis e encontrou que a atividade da catalase dos extratos aumentou muito rapidamente no início da germinação, passando por um máximo e diminuindo tão rapidamente quanto aumentava no início; Bach et alii em 1927 os quais estudaram sementes de trigo durante a germinação e encontraram uma relação similar entre catalase e peroxidase e Afanisev e Cress que em 1942 observaram aumento de atividade de catalase durante a germinação



de sementes de Juniperus scopulorum. No mesmo ano Holman (44) observou atividade máxima para catalase no quarto dia de germinação de sementes de feijão soja. Brodskis (45) determinou que a atividade de catalase diminui durante o armazenamento de sementes de trigo, de uma maneira correspondente à diminuição da capacidade de germinação da semente. Nanda (46) apresentou um método de determinação de catalase, com a finalidade de prever a germinação de uma variedade de sementes. Nosov e Kustova (47) observaram um aumento na atividade da catalase durante a germinação de sementes de algodão. Foi observado por Takasugi e Yamazaki (48) aumento de catalase em grãos e brótos de trigo durante a germinação. Gylling e von Euler (27) determinaram que a atividade de catalase de fôlhas de cevada aumenta pelo menos durante 11 dias depois do início da germinação. Chikasue em 1953 (49) observou que há uma relação entre o poder de germinação e a atividade de catalase em sementes. No mesmo ano foi determinado por Roca e Ondarza (50) que a atividade de catalase de sementes de milho germinadas aumentou de 45 vezes em 7 dias. Hori e Nakamura (51) observaram atividade máxima de catalase em raízes e brótos de Vicia faba depois de dois dias e nos cotiledones depois de 5 dias de germinação. Goksøyr et alii (52) observaram que a atividade de catalase de Fisum sativum aumenta durante os três primeiros dias de germinação. Buruiana (53) determinou a atividade de catalase em sementes de trigo, cevada, aveia, milho, ervilha e feijão e observou que o seu máximo coincide com a germinação em trigo, cevada, aveia e milho.

No presente trabalho apresentamos um estudo sobre as possíveis variações na atividade da catalase em sementes de Phaseolus aureus com

tempos crescentes de germinação. Foi também realizado um estudo, com finalidade de obter informações sobre a localização desta enzima no mesmo material.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de Phaseolus aureus, ofertadas pela Fazenda São Luiz, município de São Pedro do Ivaí, Faraná, foram usadas como fonte de enzima.

Os produtos químicos utilizados na realização deste trabalho foram de boa procedência.

As determinações de proteínas dos extratos brutos e frações enzimáticas obtidas por fracionamento das partículas por diferença de densidade e fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio, foram realizadas pelo método de Kjeldahl (54).

As determinações de proteínas para o material obtido a partir do pó acetônico foram realizadas pelo método de Lowry et alii (55). Todas as determinações de proteínas foram realizadas em duplicata. As densidades ópticas foram medidas usando espectrofotômetro Bechman modelo DU.

Preparação da enzima - Foram utilizados dois métodos de

preparação de enzima. O primeiro método seguiu em parte a orientação de Alischul e Karon (19), os quais trabalharam com sementes de algodão germinadas. O outro método seguiu a orientação de L.A. Veiga (53).

No primeiro método foram deixadas germinar 50 g de sementes de feijão em 500 ml de água com aeração em temperatura ambiente durante intervalos de tempo variáveis, dependendo das necessidades do trabalho. As sementes foram destituídas de seus tegumentos e trituradas em liquidificador com excesso de acetona fria, durante alguns minutos. A mistura resultante foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e o resíduo reextraído três vezes com acetona gelada. O material assim livre de gorduras, foi secado, triturado em gral de ágata e guardado a  $-13^{\circ}\text{C}$ . Para 1g deste material foram adicionados 10 ml de tampão fosfato M/15, pH 7. As atividades dos extratos e resíduos foram determinadas pelo método manométrico convencional de Warburg.

No segundo método foram deixadas germinar 50 g de sementes de Phaseolus aureus em 500 ml de água com aeração durante 24 horas, em temperatura ambiente. As sementes destituídas de seus tegumentos foram trituradas em gral de porcelana gelado com 70 ml de tampão preparado da seguinte maneira: 40 ml de sacarose 1M, 5 ml de tampão fosfato 0,01 M e 55 ml de água destilada. O homogenado foi filtrado através de gaze e centrifugado a 2000 x g., durante 10 minutos. O sobrenadante líquido foi centrifugado a 18000 x g durante 30 minutos e o precipitado assim obtido foi suspenso em 3 ml de tampão Tris 0,5 M, pH 7. Esta fração foi designada como Partículas grandes, correspondendo provavelmente a cloroplastos. O sobrenadante líquido foi centrifugado a 80000 x g durante 30 minutos e o precipitado assim

obtido foi suspenso em 2 ml de tampão Tris 0,5 M, pH 7. Esta fração, designada como Partículas pequenas, correspondente provavelmente à fração mitocondrial. Ao sobrenadante de 80000 x g (33 ml) foram adicionados 14,1 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados durante 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000xg durante 15 minutos, dissolvido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7 e dialisado durante uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração foi denominada Fração SA I, e corresponde a uma saturação de 0- 30 %. Ao sobrenadante obtido (46 ml) foram adicionados 10,9 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000 x g por 15 minutos, dissolvido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7 e dialisado durante uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração foi denominada Fração SA II e corresponde a uma saturação de 30-40%. A 55 ml do sobrenadante foram adicionados 18,4 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000 x g durante 15 minutos, dissolvido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e dialisado durante uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração, denominada Fração SA III corresponde à saturação de 40 a 50%. A 72 ml do sobrenadante obtido foram adicionados 33 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000 x g por 15 minutos, dissolvido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e dialisado uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração foi denominada Fração SA IV e corresponde a uma saturação de 50 a 60%. Ao sobrenadante (108 ml) foram adicionados 93 ml de

solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados durante 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000 x g por 15 minutos, - dissolvido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e dialisado durante uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração foi denominada Fração SA V e corresponde a 60-70% de saturação. A 200 ml do sobrenadante foram adicionados 333,4 ml de solução saturada de sulfato de amônio pH 7 e deixados durante 5 minutos a 0°C. O precipitado foi obtido por centrifugação a 10000 x g durante 15 minutos, dissolvido em 10 ml do tampão fosfato 0,1 M pH 7 e dialisado durante uma noite contra 1 litro do mesmo tampão. Esta fração foi denominada Fração SA VI e corresponde à saturação de 70 a 80%.

#### Medida da atividade da enzima

Método manométrico - A determinação da atividade da catalase foi feita em aparelho convencional de Warburg de volume constante, medindo a velocidade de evolução do oxigênio (17). A concentração da enzima foi ajustada para que 25 a 50% da água oxigenada fôsse consumida em 5 minutos. Nas condições experimentais descritas, nas quais a concentração inicial de peróxido de hidrogênio é mantido constante, a atividade da catalase pode ser expressa em termos de reação constante de 1.<sup>a</sup> ordem. O valor para a velocidade constante de 1.<sup>a</sup> ordem foi calculado partindo da seguinte equação.

$$K = \frac{2.303}{t} \cdot \frac{\log. V_{\infty}}{V_{\infty} - V_{t'}}$$

onde K = constante específica de velocidade de reação (nº por unidade de tempo).  
 $V_{t'}$  = volume máximo de oxigênio evoluído depois de um período de reação de t minutos.  
 $V_{\infty}$  = volume máximo de oxigênio evoluído quando é usado excesso de catalase.

Os sistemas montados para estas determinações consistiram de quantidades variáveis de tampão fosfato M/15 pH 7, 0,15 ml de peróxido de hidrogênio (uma parte do peróxido de hidrogênio comercial Merck de 10 volumes, recentemente diluído com 9 partes de água) introduzidos no frasco de Warburg e quantidade de enzima suficiente para conseguir velocidade constante durante 5 minutos foi adicionada no braço lateral do frasco de Warburg. O volume final de cada preparação foi de 2,85 ml e a temperatura de 28°C foi mantida constante.

Método permanganométrico - Foi preparada uma solução de permanganato de potássio N/10 a qual foi fatorada com oxalato de sódio (57). O peróxido de hidrogênio comercial Merck de 10 volumes foi titulado com esta solução. A diferença entre a concentração de água oxigenada inicial e a concentração de água oxigenada após incubação com a enzima forneceu a quantidade de água oxigenada decomposta pela enzima e esta diferença foi considerada como índice de atividade enzimática (58). As determinações de atividade para a catalase foram realizadas incubando a enzima com peróxido de hidrogênio e tampão, durante períodos de tempos crescentes. A reação foi interrompida com  $H_2SO_4$  2N e a solução foi titulada com permanganato de potássio N/10. A velocidade de desdobramento da água oxigenada permaneceu constante em relação ao tempo considerado. O valor para a velocidade constante de 1.<sup>a</sup> ordem foi calculado partindo da equação:

$$K = \frac{1}{t} \cdot \frac{\log. A}{A - X}$$

onde K = velocidade monolecular constante

t = tempo em minutos

A = água oxigenada inicial

A-X = água oxigenada a t minutos

O valor de  $K$  representa a unidade de catalase na diluição empregada no ensaio, e a determinação de atividade foi relacionada com o número de gramas da enzima, (K/g de proteína) segundo Dixon e Webb (59).

## RESULTADOS

Determinação da catalase em várias fases da germinação. Foram estudadas sementes de *Phaseolus aureus* não germinadas e sementes com intervalos sucessivos de 24 horas durante 5 dias de germinação. Amostras do material foram homogenizadas, extraídas com acetona, secadas como foi descrito anteriormente (Material e Métodos), e os extratos foram preparados a partir do pó acetônico. A atividade da enzima, bem como o conteúdo de proteína foram determinados nos extratos e resíduos. O método utilizado para estas determinações foi o permanganométrico. Examinando a relação entre a atividade de enzima e o conteúdo de proteína dos extratos e resíduos, foi observado que houve um abaixamento destes valores com o aumento do tempo de germinação. Considerando apenas a catalase extraível, observamos um considerável abaixamento na atividade durante os dois primeiros dias de germinação e um aumento de atividade no terceiro dia, seguido de pequeno abaixamento no 4º dia e estabilização até o 5º dia de germinação.

TABELA I

DETERMINAÇÃO DE CATALASE EM VÁRIAS FASES DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PHASEOLUS AUREUS

Tempo de germinação (dias)	Valores de K			Proteína total (gnâmas)		Atividade Enzimática (K/g de proteína)		
	Extrato	Resíduo	Total	Extrato	Resíduo	Extrato	Resíduo	Total
0	61,5	1,2	62,7	0,185	0,028	332	42,8	375
1	81	3,7	84,7	0,322	0,048	251	77	328
2	42,5	14,2	56,7	0,322	0,072	132	197	329
3	60	11,7	71,7	0,332	0,102	180	114	294
4	42,5	2,9	45,4	0,297	0,031	143	93	236
5	51,5	4,3	55,8	0,350	0,055	147	78	224



Distribuição da catalase nos extratos de sementes germinadas de Phaseolus aureus. A tabela II apresenta os resultados da centrifugação diferencial de um homogenado de sementes de Phaseolus aureus germinadas. Foi realizada a determinação da atividade da enzima nas diferentes frações e a atividade maior foi encontrada na fração correspondente ao sobrenadante de 8000 x g. Foi observado também apreciável atividade de catalase nas partículas que correspondem provavelmente a mitocôndrias, em comparação com aquelas consideradas cloroplastos.

TABELA II

DISTRIBUIÇÃO DA CATALASE NOS EXTRATOS DE SEMENTES GERMINADAS DE PHASEOLUS AUREUS

Frações	volume (ml)	$\frac{\% \text{MnCl}_2}{\text{gastos (ml)}}$	valôres de $\kappa^*$	Proteínas totais (g)	Atividade enzimática ( $\kappa/g$ de proteína)
Sobrenadante de 2000 x g.	47	0,9	9.400	3,39	2772
Sobrenadante de 4000 x g	40	0,8	8.800	2,08	4229
"Partículas grandes"	6	2,7	108	0,154	701
Sobrenadante de 8000 x g	35	0,8	7.700	1,153	3747
"Partículas pequenas"	5	1,0	950	0,462	2053

\* - A atividade é expressa em termos de velocidade constante de 1<sup>a</sup> ordem.

A tabela III apresenta o fracionamento do sobrenadante de 80000 x g com sulfato de amônio. A maior atividade da enzima foi observada na Fração SA II, que corresponde à saturação entre 30 a 40% com sulfato de amônio.

TABELA III

FRACIONAMENTO DO SOBRENADANTE DE 80000 x g com SA

Frações	Volume (ml)	KMnO <sub>4</sub> gastos (ml)	Valores de K	Proteínas totais (g)	Atividade enzimática (K/g de proteína)
Fração S.A. I	10	2,3	400	0,246	1859
Fração S.A. II	10	0,3	4000	0,308	12.987
Fração S.A. III	10	2,8	120	0,243	483
Fração S.A. IV	10	2,8	120	0,154	778
Fração S.A. V	10	2,8	120	0,154	778
Fração S.A. VI *	10	3,0	-	0,03	-

\* Fração sem atividade para catalase.

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na tabela I mostram que houve um abaixamento dos valores referentes à atividade da catalase com relação ao aumento do tempo de germinação. Altschul et alii (17) observaram diminuição de atividade de catalase extraível durante a germinação de sementes de algodão. No presente trabalho foi observado um abaixamento de atividade de catalase total contida no extrato e resíduo. Observando ainda na tabela I, na coluna referente à catalase extraível, vemos que houve diminuição da atividade da catalase de sementes não germinadas até 2 dias de germinação, apresentando um aumento relativo no terceiro dia e estabilizando do 4º dia em diante. Altschul et alii (17) explicam a ocorrência da diminuição de atividade desta enzima durante a germinação, considerando que na reação catalizada pela catalase, 44% do total de energia livre liberada não é necessariamente acoplada para uma reação de oxido redução e pode ser dissipada como calor. Na reação catalizada pela peroxidase toda a energia livre é acoplada pela reação de oxido redução, portanto potencialmente disponível para funções que requerem energia. Conclui-se que um crescimento rápido do tecido, com alta necessidade de trabalho seria governada por um sistema no qual a atividade da peroxidase deveria predominar sobre a atividade da catalase.

Os resultados apresentados nas Tabelas II e III referem-se ao estudo da localização intracelular da catalase. Para entender o papel

fisiológico de uma enzima específica na economia da célula ou organismo é necessário conhecer o seu ponto de ação. Utilizando o método de centrifugação diferencial cujos resultados estão apresentados na tabela II, encontramos maior atividade da enzima na fração correspondente ao sobrenadante de 80000 x g, o que significa que a enzima foi encontrada em maior quantidade, nas condições de trabalho descritas, no sobrenadante correspondendo - portanto à catalase chamada por Loew, catalase  $\beta$ , citado por Altschul et alii (17). Foi encontrada também (Tabela II) grande atividade de catalase na fração correspondente à mitocôndria, comparativamente com àquela que corresponde a cloroplastos. Disto concluímos que nas condições de trabalho apresentadas, a catalase está distribuída tanto no sobrenadante das preparações como nas frações particuladas, principalmente mitocôndrias. Goddard e Stafford (42) estudaram a localização intracelular da catalase de plantas e concluíram que esta enzima estava localizada na fração mitocondrial. Murphy e Maier (43) em trabalhos mais recentes chegaram aos mesmos resultados.

## CONCLUSÕES

- 1 - Foi observado um abaixamento na atividade da catalase total e variações na atividade da catalase extraível, de sementes de Phaseolus aureus com o aumento do tempo de germinação.
- 2 - Estudando a localização intracelular da catalase, observamos que esta enzima está distribuída na fração considerada mitocondrial e no sobrenadante da preparação.
- 3 - Foi realizada centrifugação fracionada com sulfato de amônio no sobrenadante de 80000 x g da preparação e a maior atividade da enzima foi encontrada na fração que corresponde à saturação entre 30 e 40%.

## SUMÁRIO

Foi obtido pó acetônico de sementes de Phaseolus aureus não germinadas e sementes com tempos crescentes de germinação, o qual foi utilizado como fonte de enzima. Nos extratos e resíduos obtidos por centrifugação foi determinada a atividade da catalase pelo método manométrico. Foi observado diminuição na atividade total desta enzima com o aumento do tempo de germinação das sementes estudadas e variações na atividade da catalase extraível.

Obteve-se um homogenado de sementes de Phaseolus

aureus germinadas durante 24 horas, o qual foi utilizado como fonte de enzima. Foi realizada uma centrifugação diferencial do homogenado e determinada a atividade da enzima nas diferentes frações, utilizando o método permanganométrico. Foi encontrada maior atividade de catalase no sobrenadante correspondente à centrifugação de 80000 x g. Este sobrenadante foi submetido a centrifugação fracionada com sulfato de amônio. A maior atividade da enzima foi encontrada na fração correspondente a 30-40% de saturação. Foi encontrada também grande atividade de catalase na fração considerada mitocondrial.

## AGRADECIMENTOS

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná, pela valiosa colaboração prestada na execução desta tese.

De modo especial ao Prof. Dr. Luiz Alberto Veiga.

Ao National Institutes of Health pelo Grant nº 11.888, concedido ao Prof. Dr. Luiz Alberto Veiga, orientador do presente trabalho.

Ao Conselho de Pesquisas da Universidade Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Pesquisas pelas bôlsas de estudos concedidas.

À Escola de Química da Universidade Federal do Paraná por haver permitido o uso do Respirômetro de Warburg.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - BURRIS, R.H. in RUHLAND, W. ed., - Encyclopedia of plant physiology v.12 (1). Berlin, Springer Verlag, 1960, p. 380.
- 2 - BRILL, A.S. em Florkin, ed., - Comprehensive Biochemistry v. 14. New York, Academic Press, 1966 p. 447.
- 3 - JCSLYN, M.A. & DIEHL, H.C., - Ann. Rev. Plant Physiol. 3, 158, 1952.
4. GALSTON, A.W. in Colowick, S.F. e Kaplan, N.C., eds., Methods in Enzymology v. 2 New York, Academic Press, 1955, p. 789.
- 5 - BROWN, J.C., - Ann. Rev. Plant Physiol., 7, 171, 1953.
- 6 - ABADIA, M.A., - Chem, Abstr. 48, 1954. 1153 lg.
- 7 - PATTANAIK, S., - Chem. Abstr. 43, 1949.9174i.
- 8 - VILMEYER, H.P., FISCHER, F. e BERGMANN, W., - Chem. Abstr. 63, 1967, 54606h.
- 9 - APFLEMAN, D., - Chem. Abstr. 48, 1952, 3110h
- 10 - FINKLE, B. & APLEMAN, D. - Chem, Abstr. 48, 1954. 2189
- 11 - ALTSCHULL, A.M. & KARON, M.L. - Arch. Biochem. 13, 162, 1947
- 12 - STERN, R. & BIRD, L.H., - Biochem. J., 49, 335-8, 1951.
- 13 - CHANTRENNE, H., - Biochim. Biophys. Acta 16, 410, 1955.
- 14 - GAUTHERET, R.J., - Ann. Rev. Plant Physiol. 6, 475, 1955.
- 15 - ADAMS, D.H., - Biochem. J. 74, 141, 1960.
- 16 - WARREN, H.E. & RECHCIGL, M., - Biochim. Biophys. Acta 1, 148 - 243, 1967.



- 17 - ALTSCHUL, A.M., KARON, M.L., e KYAME, L., - Arch. Biochem. 18, 131, 1948.
- 18 - BIALE, J.B., - Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 203, 1950.
- 19 - EZELL, B. & GERHARDT, F., - Chem. Abstr. 33, 1939.3014-8.
- 20 - BRAUN, A.C., - Ann. Rev. Plant Physiol. 5, 151, 1954.
- 21 - BONNER, J. & BANDURSKI, R.S., - Ann. Rev. Plant Physiol. 3, 77 1952.
- 22 - SZENDRAY, I. & JUHASZ, M., - Chem. Abstr. 67, 1957.51031b.
- 23 - NARAYANASWAMY, P. & RAMAKRISHMAN, K., - Chem Abstr. 66, 1957.8833.
- 24 - WHALEY, W.G., - Chem. Abstr. 47, 1953. 1246 h.
- 25 - UZENBAEV, E.K., - Chem. Abstr. 66, 1967. 26259 j.
- 26 - SKORIKOVA, Y.G. & GORBAN, D.F., - Chem Abstr. 63, 1967 1968 j.
- 27 - GYLLING, E. & EULER, R. von., - Chem. Abstr. 47, 1953. 170 f.
- 28 - NAKAI, T. & INABA, Y., - Chem Abstr. 45, 1951. 6699 e.
- 29 - MIHALYFI, J.F., - Chem Abstr. 67, 1967. 71083 y.
- 30 - APFLEMAN, D., - Chem Abstr. 45, (21), 1952. 10316 d.
- 31 - EYSTER, H.C., - Chem Abstr. 45 1951. 2068 d.
- 32 - LUDEWIG, S. & CHANUTIN, A., - Arch. Biochem. 29, 441, 1950.
- 33 - SCHNEIDER, W.C., - J. Biol. Chem 176 (1), 259, 1948.
- 34 - THOMPSON, J.F. & KLIPFEL, F.J., - Arch. Biochem. Biophys. 70, 224, 1957.
- 35 - GREENFIELD, R.E. & PRICE, V. E., - J. Biol. Chem 220, 607, 1956.
- 36 - ADAMS, D.H. & BURGESS, E. A., - Biochem. J. 71, 340, 1959.

- 37 - DE DUVE, C., BEAUFAY, H., JACQUES, F., KAHMAN-LI, Y., SEL-  
LINGER, C.Z., WATTIAUX, R. e DE CONINCK, S., - Biochim. Biophys.  
Acta 40, 186, 1960.
- 38 - DE DUVE, C., BEAUFAY, H. e BAUDHUIN, F., - Acta Chemica Scan-  
dinava 17, S 210 - S 215, 1963.
- 39 - DE DUVE, C. - J. Cell Biol. 27 (2), 25 A, 1965.
- 40 - DOUNCE, A.L. in SUMMER, J.B., e MYRBACK, K. eds., - The Enzy-  
mes v. 1, part 1. New York, Academic Press, 1950 p. 187.
- 41 - HAGEN, C. E. & JONES, V.V.. - Botan. Gaz. 114, 130, 1952.
- 42 - GODDARD, D. R. & STAFFORD, H. A., - Ann. Rev. Plant Physiol. 5,  
123, 1954.
- 43 - MURPHY, J.J. & MAIER, R.H. - Chem. Abstr. 66, 1967. 62706 f.
- 44 - HCLMAN, R. T., - Arch. Biochem, 17, 459-66, 1948.
- 45 - BRODSKIS, B., - Chem. Abstr. 45, 1951, 7648 f.
- 46 - NANDA, K.K., - Chem. Abstr. 44, 1950, 5435b.
- 47 - NCSCV, A.K. & KUSTOVA, A.K. - Chem. Abstr. 48, 1954, 10843h.
- 48 - TAKASUGI, N. & YAMAZAKI, I., - Chem. Abstr. 46, 1952. 10305d.
- 49 - CHICASUE, M., - Chem. Abstr. 49, 1955. 9108d.
- 50 - ROCCA, J. & CNDARZA, R., - Chem Abstr. 48, 1954. 4639 h.
- 51 - HOPY, T. & NAKAMURA, I., - Chem. Abstr. 49, 1955. 9108d.
- 52 - GOKSØYR, J. BOERI, E. e BONNICHSEN, R.K. - Chem. Abstr. 49  
(1), 1955.449i.
- 53 - BURUIANA, L.M., POP, V., POP, E. e PCPA, L. - Chem Abstr. 54  
(21), 1950. 22863 f.
- 54 - KABAT, E. A. & MAYERM, M.M., - Experimental Immunochemistry,  
Thomas, Springfield, Ill., 2nd ed., 1964, p. 476.

- 55 - LOWRY, C.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J.,  
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
- 56 - VEIGA, L.A. - Plant and Cell Physiol., 9, 1, 1968.
- 57 - VOGEL, A.I., ed., - Química analítica quantitativa. Buenos Aires, Kapelusz, 1960, p. 384.
- 58 - ZANGAN, G.T. & AMARAL, D., - Práticas de Bioquímica Geral. Curitiba, Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1967 p. 66.
- 59 - DIXON, M. & WEBB, E.C. eds., - Enzymes, London, Longmans, - 1950, p. 13.