



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Alexandre Donizeti Martins Cavagis

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS NA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA DE SEMENTES QUIESCENTES DE SOJA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e Molecular
na Área de Bioquímica

ORIENTADOR
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
Depto. de Bioquímica - IB
UNICAMP

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Alexandre Donizeti Martins
Cavagis
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

Campinas - SP
2001

I



00114583

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	F/UNICAMP
	C313i
V.	Ex.
TOMBO BC	46023
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	15-03-01
N.º CPD	

CM00158541-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C313i Cavagis, Alexandre Donizeti Martins
Influência de alterações conformacionais na atividade da fosfatase
ácida de sementes quiescentes de soja/Alexandre Donizeti Martins
Cavagis. - - Campinas, SP. [s.n.], 2001.
68f: ilus.

Orientador: Hiroshi Aoyama
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Enzima. 2. Fosfatase ácida. 3. Soja. 4. Conformação. 5. Carboidrato.
I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 16 de abril de 2001.

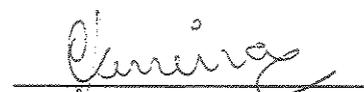
Banca Examinadora:

Titulares:

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
(Depto. de Bioquímica - IB - UNICAMP)


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Carmen Veríssima Ferreira
(Depto. de Bioquímica - IB - UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. Pedro Luís Onófrio Volpe
(Depto. de Físico-Química - IQ - UNICAMP)


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
(Depto. de Bioquímica - IB - UNICAMP)

Assinatura

AGRADECIMENTOS

“Muito Obrigado, Senhor Deus Todo-Poderoso pelo dom da vida e pela oportunidade de ter chegado até aqui, superando muitas dificuldades que serviram de estímulo para a minha evolução pessoal e para ampliar a certeza de que sempre estivestes comigo em todos os momentos.”

Meus sinceros agradecimentos,

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, meu muito obrigado pela orientação e amizade demonstrados desde a iniciação científica. Muito de seu exemplo de vida será carregado por mim ao longo de minha vida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelos recursos financeiros sem os quais não seria possível o desenvolvimento do trabalho e à assessoria, pela leitura crítica dos relatórios que foi de grande valia para a evolução do trabalho;

À Profa. Dra. Nilce e à Profa. Dra. Satie, pela correção crítica da presente dissertação e pelas sugestões úteis e construtivas dadas no exame de qualificação;

A minha esposa, Vânia, pela compreensão, incentivo, companheirismo e dedicação e pelo auxílio na revisão final do trabalho;

A minha mãe, Neide, avós: José (*in memorian*), Áurea, Sílvia e Ângelo e aos meus irmãos, Daniela, Deise, Allyson, Pedro, Lidiane e Dríade;

À Carmen Veríssima Ferreira, que sempre acompanhou bem de perto todo o desenvolvimento do trabalho, com auxílio e sugestões imprescindíveis e também pela participação no processo de qualificação;

Ao Paulo Afonso Granjeiro pela grande contribuição;

Aos companheiros, Márcio Miranda, André Okamoto, José Daniel e Dênison, pela amizade e companheirismo e por praticamente uma década de grande amizade;

Ao José Mauro Granjeiro, pelos conselhos e discussões enriquecedoras;

À Érika, Sílvio, Daniela, Carol, Janaína, Patrícia, Marilena, Paty, Karina, Telma e Ana Cláudia pela amizade, alegria e pela convivência bastante agradável;

Ao Leonardo, Paulo e todos os demais membros do laboratório da Profa. Eneida;

Ao Prof. Dr. Pedro Volpe e ao Alexandre, do Instituto de Química da Unicamp, pelo auxílio nos experimentos de desnaturação térmica;

Ao Sérgio Nozawa, André e ao Prof. Dr. Antonio Rossi Filho, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP, em Ribeirão Preto, pelo auxílio na etapa final do projeto;

À Andréia e Marina, da Secretaria do Departamento de Bioquímica, pelo auxílio e orientações nas questões institucionais;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Gláucia e à Daniela, pelo auxílio na formatação numérica da tese e na revisão final.

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	IX
RESUMO	X
SUMMARY.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 FOSFATASE ÁCIDA DE SOJA	7
3.2 MÉTODOS.....	8
3.2.1 <i>Determinação da atividade enzimática</i>	8
3.2.2 <i>Eletroforese</i>	8
3.2.3 <i>Estudos físico-químicos</i>	9
3.2.4 <i>Composição de aminoácidos</i>	11
3.2.5 <i>Determinação de carboidratos totais</i>	11
3.2.6 <i>Composição de carboidratos</i>	12
3.2.7 <i>Remoção da fração carboidrato</i>	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	15
4.2 ELETROFORESE EM CONDIÇÃO NATIVA	17
4.3 DESNATURAÇÃO TÉRMICA	18
4.3.1 <i>Experimentos com a concanavalina A</i>	20
4.3.2 <i>Efeito de inibidores na desnaturação térmica</i>	22
4.4 DESNATURAÇÃO ENZIMÁTICA POR COMPOSTOS QUÍMICOS	24
4.4.1 <i>Desnaturação por dodecilsulfato de sódio (SDS)</i>	24
4.4.2 <i>Desnaturação térmica em presença de fosfoenolpiruvato (PEP)</i>	27
4.5 DESNATURAÇÃO POR URÉIA	30
4.6 DESNATURAÇÃO POR CLORETO DE GUANIDÍNIO	36
4.7 CÁLCULO DA ESTABILIDADE CONFORMACIONAL ($\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$)	42
4.8 COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS	43
4.9 ESTUDOS ENVOLVENDO A FRAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	44
4.9.1 <i>Determinação do carboidrato total</i>	44
4.9.2 <i>Composição dos carboidratos</i>	45
4.9.3 <i>Remoção da fração de carboidratos</i>	48
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ABREVIATURAS

ΔG	Energia Livre de Gibbs
ΔG^{H_2O}	Estabilidade Conformacional
λ_{max}	Comprimento de onda de máxima intensidade
ConA	Concanavalina A
DTT	Ditiotreitol
Endo-F	Endo- β -N-acetilglicosaminidase F
Endo-F ₁	Endo- β -N-acetilglicosaminidase F ₁
Endo-H	Endo- β -N-acetilglicosaminidase H
FAc	Fosfatase ácida
GuaCl	Cloreto de guanidínio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IEF	Focalização Isoelétrica
p-CMB	p-cloromercuribenzoato
PEP	Fosfoenolpiruvato
pI	Ponto isoelétrico
Pi	Fosfato inorgânico
PMP	Fenilmetilpirazolona
p-NP	p-nitrofenol
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
T _M	Temperatura de transição
Tyr-P	Tirosina fosfato

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1	Tabela de dados da purificação da fosfatase ácida de soja	15
Figura 1	Cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose	16
Figura 2	Eletroforese em condições não desnaturantes da isoforma AP1	17
Figura 3	Desnaturação térmica da fosfatase ácida de soja	18
Figura 4	Inativação térmica da fosfatase ácida de soja a 70 °C	20
Figura 5	Desnaturação térmica em presença de concanavalina A	21
Figura 6	Efeito de inibidores na desnaturação térmica	23
Figura 7	Desnaturação por SDS em presença de diferentes substratos	25
Figura 8	Efeito da concentração de SDS na desnaturação enzimática	26
Figura 9	Desnaturação térmica da fosfatase de soja em presença de PEP	29
Figura 10	Fluorescência em função da concentração de uréia	31
Figura 11	Perfil de desnaturação da FAc de soja por uréia	33
Figura 12	Efeito da concentração de uréia no Centro de Massa da proteína	34
Figura 13	Efeito da concentração da uréia na atividade enzimática	35
Figura 14	Fluorescência em função da concentração de cloreto de guanidínio	37
Figura 15	Perfil de desnaturação da FAc de soja por cloreto de guanidínio	38
Figura 16	Efeito da concentração de GuaCl no Centro de Massa	39
Figura 17	Efeito da concentração de GuaCl na atividade enzimática	40
Figura 18	Reversibilidade da desnaturação por uréia e cloreto de guanidínio	41
Tabela 2	Análise de aminoácidos para a fosfatase ácida de soja	43
Figura 19	Separação por HPLC dos padrões de monossacarídeos	46
Figura 20	Separação por HPLC dos monossacarídeos da fosfatase de soja	47
Tabela 3	Análise da composição total de monossacarídeos de glicoproteínas	47
Figura 21	Eletroforese comparativa para a enzima tratada com Endo-H	49
Figura 22	Eletroforese após tratamento com diferentes concentrações de Endo-H	50
Figura 23	Focalização Isoelétrica após tratamento com Endo H, F e F ₁	51

RESUMO

O objetivo central do presente trabalho foi avaliar a estabilidade conformacional da fosfatase ácida de sementes quiescentes de soja.

Através de estudos de desnaturação térmica, verificou-se uma temperatura de transição (T_M) de 65 °C, o que mostra uma resistência incomum frente à temperatura. Observaram-se efeitos da concanavalina A (lectina) e de molibdato (inibidor) no perfil de desnaturação enzimática com alterações na T_M .

A desnaturação enzimática por dodecilsulfato de sódio (SDS) foi muito pouco significativa em presença do fosfoenolpiruvato (PEP) como substrato. Esta insensibilidade ao agente desnaturante pode ser explicada pela alta afinidade apresentada pela fosfatase em relação ao substrato em questão. A desnaturação térmica da enzima em presença do PEP revelou que este substrato produz uma mudança significativa no perfil de desnaturação, induzindo uma diminuição na temperatura de transição (T_M), o que representa um efeito antagônico àquele observado na desnaturação por SDS.

A análise de aminoácidos revelou informações valiosas que explicam propriedades como o pI relativamente baixo (5,0), e o número expressivo de resíduos ácidos pode estar relacionado com a estabilidade conformacional da enzima.

Os estudos sistemáticos da desnaturação reversível por uréia e cloreto de guanidínio (GuaCl) foram realizados utilizando-se a fluorescência como técnica de monitoramento. O cálculo da Estabilidade Conformacional (ΔG^{H_2O}) foi feito tomando-se o deslocamento nos comprimentos de onda de máxima emissão de fluorescência como parâmetro e o valor obtido foi de 2,48 kcal.mol⁻¹. Os cálculos de Centro de Massa foram tomados em função da concentração do agente desnaturante em ambos os casos.

A análise de carboidratos, realizada por HPLC, revelou a presença de manose, glicosamina e galactosamina e a remoção da fração de carboidratos não foi possível, mesmo após tratamento com 300 mU das endoglicosidases Endo-H, Endo-F e Endo-F₁.

SUMMARY

The central aim of the present work was to evaluate the conformational stability of a soybean seeds acid phosphatase.

Through thermal denaturation studies, the transition temperature (T_M) value determined, 65 °C, has shown an unusual resistance of the enzyme under high temperatures. The effects of strong binding compounds, such as concanavalin A (lectin) and molybdate (inhibitor) on the denaturation profile and transition temperature values were also observed.

Enzymatic denaturation by sodium dodecyl sulfate (SDS) was insignificant in presence of phosphoenolpyruvate (PEP), which might be explained by the high affinity of the enzyme for the substrate in question. Thermal denaturation studies in presence of PEP have shown both a significant change on denaturation profile and a reduction on the transition temperature value.

Aminoacid analysis contributed to valuable informations that are in accordance to some properties of the enzyme, such as a relatively low isoelectric point (pI), equal to 5.0. Furthermore, the expressive number of acid residues may be related to the conformational stability of the polypeptidic chain.

Systematic studies of reversible denaturation by urea and guanidinium chloride (GuaCl) were carried out using fluorescence as a monitoring technique. Conformational Stability calculations were made by taking the wavelengths corresponding to the maximum fluorescence emission as a parameter, and the obtained value was equal to 2.48 kcal.mol⁻¹. Calculus of Centre of Mass was taken as a function of the denaturing agent concentration in both cases.

Carbohydrate analysis was carried out by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the presence of mannose, glucosamine and galactosamine was detected as the main carbohydrates in the glycoprotein structure. Carbohydrate removal was not succeeded, even after treatment with 300 mU/ml of the Endo-β-N-acetylglucosaminidasesH, F and F₁.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, grande atenção tem sido dedicada aos estudos de desnaturação protéica. Como um exemplo, a desnaturação térmica de proteínas tem sido intensivamente estudada (LYUBAREV et al., 1999) por diferentes técnicas como a calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia na região ultravioleta, fluorescência e dicroísmo circular (CD) entre outras (CHEN et al., 1997). Além dos estudos de desnaturação térmica, vários trabalhos recentes na literatura têm reforçado a importância de estudos de desnaturação enzimática e especialmente de fosfatases ácidas por solvente orgânico (CHEN et al., 1999), uréia (OSTROWSKI et al., 1996), SDS e cloreto de guanidínio (CHEN et al., 1997).

Estudos de enovelamento, desenovelamento e estabilidade de proteínas são de grande relevância tanto no campo acadêmico como em biotecnologia (FERSHT et al., 1994). O equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado geralmente envolve dois estados (PRIVALOV, 1979), mas a estabilidade da proteína no estado nativo é da ordem de apenas 20 a 60 kJ.mol⁻¹ maior que no estado desnaturado. Esse valor, relativamente baixo, resulta do balanço entre valores altos tanto para a entalpia como para a entropia. Além disso, a função biológica de proteínas depende sensivelmente do balanço entre a rigidez e a flexibilidade de sua estrutura, fatores que são intimamente dependentes de interações de van der Waals e pontes de hidrogênio intramoleculares, além de pontes de dissulfeto (PRIVALOV & MAKHATADZE, 1992).

Fosfatases ácidas de plantas

As fosfatases ácidas (ortofosfórico monoéster fosfohidrolases - E.C. 3.1.3.2) pertencem à classe das hidrolases que utilizam fosfatomonoésteres e fosfoanidridos como substratos.

Recentemente, SCHENK et al. (2000) clonaram e sequenciaram os cDNAs de fosfatases ácidas púrpuras de uma ampla variedade de plantas, verificando bastante similaridade das enzimas vegetais com as enzimas de mamíferos.

Em plantas, essas enzimas podem ser encontradas tanto na parte extracelular como intracelular. Na primeira, podem estar localizadas na parte externa da parede celular e/ou serem secretadas pela raiz e por células em cultura (DUFF et al., 1991; LEBANSKY et al., 1992; MIERNYK, 1992).

As enzimas da parede celular têm sido associadas à hidrólise de determinados substratos oferecidos externamente à célula em tecidos não danificados. As fosfatases ácidas extracelulares de raiz poderiam tornar acessível para a absorção uma quantidade adicional de fosfato inorgânico, a partir de sua liberação da matéria orgânica do solo (NINOMIYA et al., 1977; LEE, 1988). Já a enzima intracelular parece ser ubíqua, uma vez que tem sido largamente encontrada. Tais enzimas poderiam, portanto, participar de importantes vias metabólicas da planta. Em situações de “stress” a que a planta poderia estar sujeita, algumas fosfatases são importantes na economia celular de compostos como os nucleotídeos trifosfato, pois os teores de fosfato intracelulares seriam garantidos (PLAXTON, 1996).

Embora o papel fisiológico dessas enzimas ainda não esteja totalmente elucidado, no caso específico de plantas, as fosfatases ácidas parecem ter um importante papel, uma vez que já tem sido relatada a participação das mesmas durante o desenvolvimento da planta e também em resposta a alterações ambientais a que as mesmas possam ser submetidas. Dentre os fatores de desenvolvimento pode-se citar a germinação, que talvez seja o processo em que as fosfatases ácidas tenham uma grande importância pois sua atividade está sempre aumentada, além de ocorrer o surgimento de outras isoformas ativas (BISWAS & CUNDIFF, 1991).

A atividade da enzima pode ser aumentada também por fatores ambientais como cultivo da planta em altas concentrações de sal, baixa concentração de fosfato e água e também após ferimentos causados à planta (DEWALD et al., 1992; TADANO, et al., 1993; THEODOROU & PLAXTON, 1993).

Propriedades físico-químicas das fosfatases ácidas

Em plantas, as fosfatases ácidas normalmente apresentam-se em múltiplas formas, as quais podem ter algumas diferenças nas propriedades físico-químicas (DE-KUNDU & BANERJEE, 1990; DUFF et al., 1994, FERREIRA, 1995).

Massa molecular relativa

A massa molecular relativa de fosfatases ácidas de plantas varia amplamente de 30.000 a 300.000: 51.000 para a isoforma AP1 de sementes quiescentes de soja (FERREIRA et al., 1998); 144.000 para a de células de tabaco em cultura (KANEKO et al., 1990); 200.000 para a de embriões de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987).

Ponto isoelétrico

Geralmente o pI destas fosfatases encontra-se entre 4,3 e 6,7: 4,7 para de proteína de reserva de hipocotilédones de soja (DEWALD et al., 1992); 5,0 para a isoforma AP1 de sementes quiescentes de soja (FERREIRA et al., 1999); 6,7 para a de cotilédones de soja (ULLAH & GIBSON, 1988).

Presença de carboidrato na estrutura

A fosfatase ácida dos tubérculos de batata purificada por KRUZEL & MORAWIECKA (1982) apresentou cerca de 17% do peso total da enzima (66.000) de carboidratos tais como: manose (5,6%), ramnose (3,4%), glicose (2,5%), galactose (1,5%) e glicosamina (3,6%). Para a fosfatase ácida de soja, a porcentagem de carboidratos chega a 30 %.

Presença de mais de uma cadeia polipeptídica

(CHUNG & POLYA, 1992) comprovaram que a fosfatase das sementes de papoula tratava de um dímero. BASHA (1984) purificou das sementes de amendoim uma fosfatase ácida com massa molecular relativa de 240.000, composta de 6 subunidades de 42.500.

Presença de centro metálico

SUGIURA et al. (1981) purificaram uma fosfatase ácida de cor violeta de tubérculos da batata doce que apresentou manganês ligado a sua estrutura. Muito recentemente, no entanto, demonstrou-se que tal enzima trata-se de uma metaloenzima binuclear com Fe-Mn. Foi isolada também uma fosfatase ácida púrpura de soja com centro binuclear metálico de Fe-Zn (SCHENK et al., 1999).

A isoforma AP1 de sementes de soja quiescentes apresenta ferro em sua estrutura (FERREIRA, 1998 b).

Propriedades cinéticas

Quanto às propriedades cinéticas, as fosfatases ácidas apresentam algumas características comuns:

pH ótimo para catálise

Em geral, apresentam um pH ótimo ao redor de 5,0 (KANEKO et al., 1990; LEBANSKY et al., 1992). Para as fosfatases ácidas de *Escherichia coli*, *Trichoderma resei* e *Aspergillus niger*, no entanto, o pH ótimo de catálise é 2,5 (RODRIGUEZ et al., 1999; NÄSI et al., 1999; KOSTREWA et al., 1999).

Inibição

É muito comum a inibição por molibdato, fosfato, alguns metais pesados e fluoreto e a independência de cátion, bem como a insensibilidade pelo tartarato

(ROSSI et al., 1981; PASQUALINI et al., 1992; GRANJEIRO et al., 1999; FERREIRA et al., 2000).

Temperatura ótima para catálise

Comumente encontra-se entre 50 e 60 °C. Exceção foi observada para a fosfatase ácida purificada de sementes de algodão que foi de 37 °C (BHARGAVA & SACHAR, 1987) e para as fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja quiescentes que foi de 80 °C, utilizando-se o p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato (FERREIRA et al., 1998 a). A fosfatase ácida de *Aspergillus niger*, além de apresentar um pH ótimo incomum, conforme mencionado, também mostrou uma considerável estabilidade térmica, sofrendo desnaturação térmica e inativação em temperaturas superiores a 80 °C.

Especificidade

Em geral, as fosfatases ácidas demonstram inespecificidade para substratos, muito embora haja predileção por ésteres fosfato, açúcares fosfatados, nucleotídeos e pirofosfato (RENGASAMY et al.; 1981; BASHA, 1984; PASQUALINI et al., 1992). A isoforma API de fosfatase ácida de sementes de soja mostrou uma constante de especificidade maior para o fosfoenolpiruvato que para o p-NPP (FERREIRA et al., 1999).

Fosfatase ácida de Soja

Recentemente nosso grupo desenvolveu um extenso estudo sobre as propriedades de quatro isoformas da fosfatase ácida purificada de sementes de soja (FERREIRA, 1995, 1999). Dentre os diversos resultados interessantes e inéditos obtidos podemos destacar dois em especial: a inespecificidade destas enzimas que atuam sobre diversos substratos como aminoácidos fosforilados, bem como sobre compostos do metabolismo intermediário de plantas como, por exemplo, fosfoenolpiruvato, glicose-6-fosfato e pirofosfato inorgânico (FERREIRA et al.,

1999) e a capacidade destas enzimas de catalisar a hidrólise do p-NPP em temperaturas da ordem de 80 °C (FERREIRA et al., 1998 a).

2. OBJETIVOS

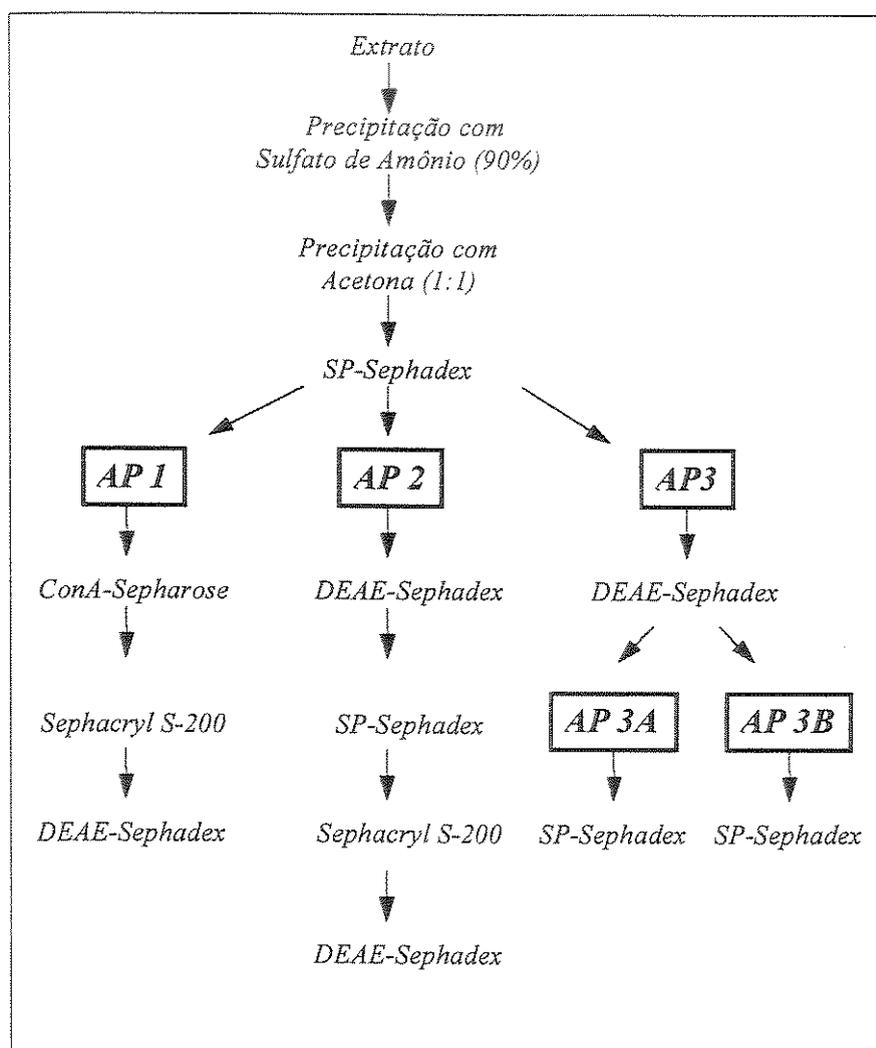
A fim de se conhecer mais a respeito da estabilidade conformacional da fosfatase ácida de sementes de soja, foram traçadas as seguintes metas a serem cumpridas ao longo do desenvolvimento do trabalho:

1. Purificar a isoforma AP1 da fosfatase ácida de sementes quiescentes de soja;
2. Avaliar a desnaturação térmica da fosfatase em presença de compostos que apresentam forte tendência de ligação à enzima e em presença de potenciais compostos protetores;
3. Realizar estudos sistemáticos de desnaturação da fosfatase por uréia e cloreto de guanidínio;
4. Proceder à remoção da fração de carboidratos a fim de analisar a importância dos açúcares na atividade enzimática

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fosfatase Ácida de Soja

A isoforma AP1 da fosfatase ácida foi purificada a partir de sementes quiescentes de soja, utilizando-se cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e afinidade, além de métodos clássicos de separação, conforme padronizado por FERREIRA et al. (1998 a) e mostrado, de forma completa, no esquema a seguir:



Os reagentes utilizados foram adquiridos junto à SIGMA e MERCK, sendo que todos apresentam grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da atividade enzimática

Dosagem do p-nitrofenol

Nos ensaios cinéticos em que foi utilizado o p-nitrofenilfosfato como substrato, a atividade enzimática foi determinada a 37 °C com 5,0 mmol/L do substrato em tampão acetato 0,1 mol/L (pH 5,0) em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada 10 minutos após a adição da enzima, com 1 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 micromol de p-nitrofenol por minuto. O coeficiente de extinção molar do p-nitrofenolato, em meio alcalino, é $1,83 \cdot 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o qual absorve em 405 nm.

Dosagem do fosfato

Este método foi utilizado no caso de substratos diferentes do p-NPP.

A reação procedeu conforme descrito anteriormente, exceto que a paralisação foi feita pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molibdico foi adquirida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,0) como redutor, de acordo com o método descrito por LOWRY & LOPEZ (1945). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido é $4.000 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2.2 Eletroforese

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições não desnaturantes

A modalidade eletroforética em condições não desnaturantes foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% de acordo com a técnica de WEBER & OSBORNE (1969). Os géis de corrida (15%, pH 8,8) e de empacotamento (5%, pH 6,8) foram preparados em tampão tris-HCl 0,3 mol/L, e colocados para polimerizar em uma placa. Os dois compartimentos da cuba foram preenchidos com

tampão de corrida (0,2 mol/L de glicina e 25 mmol/L de Tris pH 8,3). Realizou-se uma pré-corrida de 2 h (60 mA). As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se 200 μ l e 20 μ l de tampão da amostra (10% de glicerol, 0,08% do tampão Tris-HCl 1 mol/L, pH 6,8 e 2 gotas do azul de bromofenol 0,2%). Então, as amostras (50 μ L) foram aplicadas ao gel por 5 h a 4°C. Foi feita uma pré-corrida, mantendo-se por 2h uma corrente de 60 mA e, em seguida, foi realizada a corrida com uma corrente constante de 100 mA, sendo o azul de bromofenol utilizado como marcador. Ao término da corrida, o gel foi retirado do tampão e levado para ser corado para detecção de proteína e atividade enzimática.

Coloração para detecção de proteína

O gel foi corado em solução “Coomassie Brilliant Blue” (C. Blue) em uma mistura de 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial, 500 mg de C. Blue e 500mL de água Milli Q por 12 horas. A descoloração foi realizada após lavagens sucessivas em solução contendo 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 500 mL de água Milli Q. Posteriormente, o gel foi fixado com ácido acético 7%.

Coloração para detecção de atividade enzimática

O gel foi incubado a 37 °C em tampão bis-tris 100 mmol/L, pH 6,0, contendo 50 mmol/L de β -naftil-fosfato e 1,0 mg de Fast Blue BB/mL, até o aparecimento da coloração. Em seguida, o gel foi descorado em lavagens com solução contendo 125 mL de ácido acético e 40 mL de etanol, e a coloração mantida em ácido acético 7%.

3.2.3 Estudos físico-químicos

Estudos de desnaturação térmica

A variação da absorbância em 280 nm da enzima em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0 com 10 % de DTT em função da temperatura foi determinada na ausência e na presença de diferentes compostos. Nos experimentos de desnaturação térmica foi utilizado o espectrofotômetro de arranjo de diodos UV/Vis HP 8452Dos,

acoplado a um sistema programador/controlador de temperatura e a um microcomputador. A temperatura foi aumentada de 30 a 85 °C, com um incremento de 1,0 °C entre 30 e 60 °C, com um incremento de 0,5 °C entre 60 e 70 °C e com um incremento de 1,0 °C entre 70 e 85 °C.

Estudos de desnaturação por uréia.

A solução estoque de uréia foi preparada numa concentração de 10 mol/L em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0 afim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 8 mol/L. A enzima (10 µg ml⁻¹) foi incubada por 30 h a 4 °C nas diferentes concentrações de uréia e mantida em gelo durante o experimento. A intensidade de fluorescência intrínseca da enzima, em cubetas de quartzo de 1 cm, foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi 2000 com comprimento de onda de excitação de 293 nm e de emissão entre 298 e 450 nm. A largura de fenda utilizada foi de 5 nm.

A intensidade de fluorescência obtida no espectro de emissão foi utilizada para o cálculo do Centro de Massa de acordo com o método descrito por BONAFÉ et al. (1998). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação da enzima foram determinados através do λ_{\max} versus [uréia] (PACE 1986).

Estudos de desnaturação por cloreto de guanidínio.

A solução estoque de cloreto de guanidínio foi preparada numa concentração de 8 mol/L em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0 a fim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 6 mol/L. A enzima (10 µg ml⁻¹) foi incubada por 24 h a 4 °C nas diferentes concentrações de cloreto de guanidínio e mantida em gelo durante o experimento. As intensidades de fluorescência intrínseca da enzima foram monitoradas de acordo com o método anteriormente citado.

A intensidade de fluorescência obtida no espectro de emissão foi utilizada para o cálculo do Centro de Massa e os parâmetros termodinâmicos da desnaturação da enzima foram determinados através do λ_{\max} versus [GuaCl] (PACE 1986).

Reversibilidade da desnaturação enzimática por uréia e cloreto de guanidínio

Os testes de reversibilidade foram feitos monitorando-se a atividade relativa da enzima após a diluição do agente desnaturante 10, 100 e 1000 vezes, partindo da máxima concentração utilizada.

3.2.4 Composição de aminoácidos

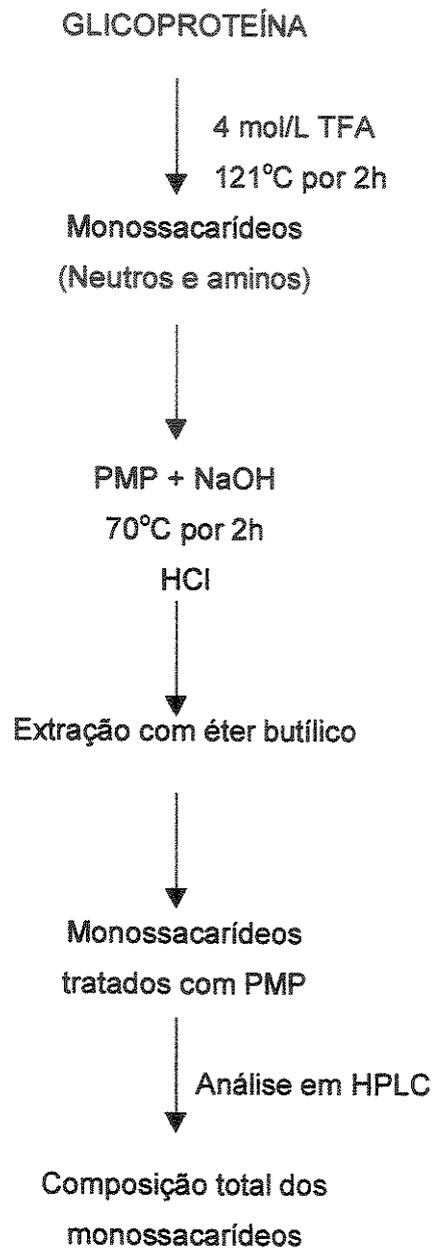
A proteína foi submetida a hidrólise ácida com HCl 6 mol/L, em presença de fenol cristalizado e sob atmosfera de nitrogênio a 110 °C por 24 horas em uma estação de trabalho Pico Tag da Waters. A composição molar dos aminoácidos presentes na proteína foi determinada em analisador automático da Beckman Instruments, Inc. (modelo 7300). Este sistema emprega o método de derivação pós-coluna, no qual os aminoácidos provenientes da hidrólise ácida são separados por cromatografia de troca iônica e detectados como produtos de uma reação com ninidrina a 440 ou 570 nm. A proporção molar de cada resíduo de aminoácido foi determinada em relação à concentração molar total dos resíduos de aminoácidos detectados por este método.

3.2.5 Determinação de carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais foi realizada de acordo com o método de DISHE (1954), utilizando-se 10 µg de enzima, fenol 80% e ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi deixada em temperatura ambiente e, logo após, lida a absorvância a 480 e 490 nm.

3.2.6 *Composição de carboidratos*

O esquema abaixo mostra as etapas de preparação da amostra para a determinação da composição de monossacarídeos na FAc de sementes de soja.



Hidrólise

De acordo com FU & O'NEILL (1995), a fosfatase ácida de sementes de soja foi tratada com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4 mol/L em tubos de hidrólise (13 X 100 mm). Os tubos de hidrólise foram selados e incubados a 120°C por 2 h em aquecimento seco (bloco de aquecimento). Os padrões de monossacarídeos, 10 nmol de manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, foram submetidos a tratamento idêntico às amostras. Após resfriados à temperatura ambiente, os tubos de hidrólise foram abertos e o conteúdo transferido para "Ependorffs" sendo que depois foram evaporados até secagem por concentração à pressão reduzida.

Tratamento com PMP (Fenilmetilpirazolona)

As amostras de glicoproteínas hidrolisadas e secas e padrões de monossacarídeos foram diretamente tratados com PMP por adição de 20 µL de solução deste reagente (0,5 mol/L em metanol) e 20 µL de solução de NaOH 0,3 mol/L, seguido de agitação vigorosa e incubação a 70 °C por 2 h. A mistura foi então neutralizada por adição de 20 µL solução de HCl 0,3 mol/L. Em seguida 0,5 mL de éter butílico foi adicionado e misturado sob agitação vigorosa por 5 s. A fase de separação foi intensificada por breve centrifugação. A fase orgânica (camada superior) foi cuidadosamente removida e descartada. Este processo de extração foi repetido duas vezes mais. A fase aquosa restante foi misturada com 150 µL água para análise em HPLC.

Análise em HPLC

A análise de monossacarídeos tratados com PMP foi realizada em HPLC Shimadzu LC – 10 AD vp equipado com sistema de detecção UV/VIS SPD – M10A vp V. Foi usada uma coluna Brownlee C 18 220 X 2,1 mm, otimizada para separação de carboidratos tratados com PMP. O fluxo foi de 0,2 mL/min. O comprimento de onda para detecção de UV foi de 245 nm. Para a separação de

açúcares neutros ou aminos foram utilizados tampões A e B contendo 100 mM de acetato de amônio, pH 5,5, com 10 e 25% de acetonitrila, respectivamente. Um gradiente de 45 a 100% de tampão B, em 55 min, foi utilizado para separação.

Análise dos dados

Para se determinar a quantidade de monossacarídeo da amostra, o valor da integral de um particular monossacarídeo encontrado na amostra foi dividido pelo valor da integral do correspondente monossacarídeo determinado no padrão, de acordo com o método descrito por FU & O'NEILL (1995).

3.2.7 Remoção da fração carboidrato

O tratamento da FAc foi realizado a 37 °C durante 24 horas com a Endo- β -N-acetilglicosaminidase H nas concentrações de 100, 200 e 300 mU/ml. O mesmo procedimento foi adotado no tratamento com as outras glicosaminidases (F e F₁). Estudos eletroforéticos foram realizados concomitantemente a fim de se avaliar a remoção dos oligossacarídeos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação Enzimática

A Tabela 1 mostra os dados de cada etapa da purificação. A isoforma AP1 da fosfatase foi purificada cerca de 720 vezes e obtida no final com um rendimento de 7% e uma atividade específica de 39 UE.mg⁻¹. Os números em verde mostram o rendimento relativo à primeira coluna cromatográfica.

Tabela 1 – Tabela de purificação da fosfatase ácida de sementes de soja

Etapa	Volume / mL	UE Totais	Proteína Total / mg	AE / UE.mg ⁻¹	Purificação / vezes	Rendimento / %
Extrato Bruto	10.060	6.377,98	116.703,04	0,0547	1	100
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ 90%	2.510	4.919,6	34.309,19	0,1434	2,6	77
Precipitação Cetônica	360	870	10.845,36	0,0802	1,5	13,6
SP-Sephadex	338	655	2.796,40	0,2342	4,3	10,3 (100)
Con-A Sepharose	17,0	799	115,64	6,9094	126,3	12,5 (121)
Sephacryl S-200	17,0	581	27,82	20,88	381,8	9,1 (88)
DEAE-Sephadex	2,2	450	11,46	39,26	720	7,0 (68)

O procedimento para obtenção da fosfatase ácida de soja envolve cromatografias de troca iônica, afinidade e exclusão molecular. A Figura 1 mostra o perfil de eluição para a coluna ConA-Sepharose. A fosfatase ácida de soja liga-se à coluna de ConA-Sepharose por se tratar de uma glicoproteína e apresentar na extremidade da porção de carboidrato, manose e/ou glicose, uma vez que a concanavalina se liga especificamente a estas unidades monossacarídicas, de forma

que a cromatografia de afinidade é bastante eficaz na purificação da enzima. É interessante se observar, no perfil cromatográfico, que uma grande quantidade de proteína contaminante foi descartada no tampão de lavagem.

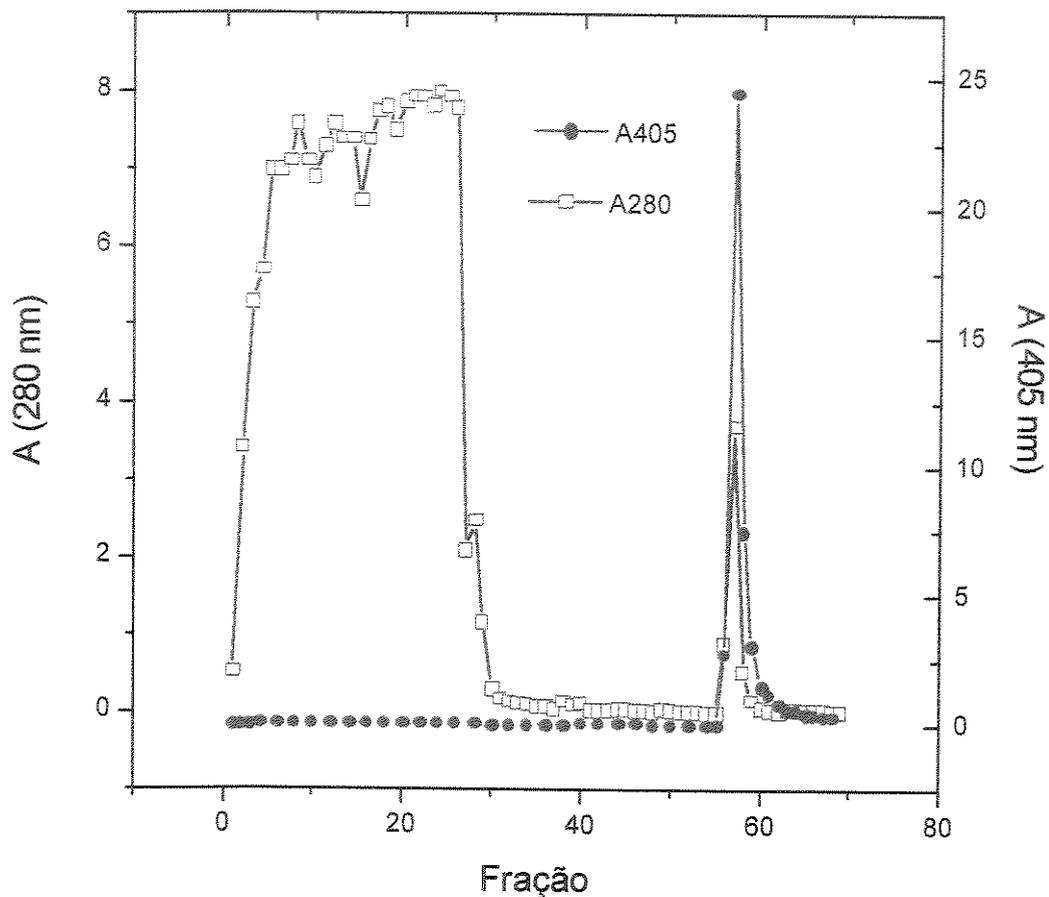


Figura 1 - Cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose. A eluição foi realizada a partir da fração 53 com tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0 contendo 1 mol/L de NaCl, 1 mol/L de glicose e 0,2 mol/L de α -metilmanopiranosídeo. A absorvância em 405 nm foi lida após o desenvolvimento da coloração para atividade.

4.2 Eletroforese em Condição Nativa

A eletroforese em condições não desnaturantes foi realizada após a concentração por ultrafiltração da enzima obtida no final, conforme descrito em métodos 3.2.2. A Figura 2 mostra o perfil eletroforético obtido. Os géis foram corados para atividade enzimática (a) e proteína (b e c).

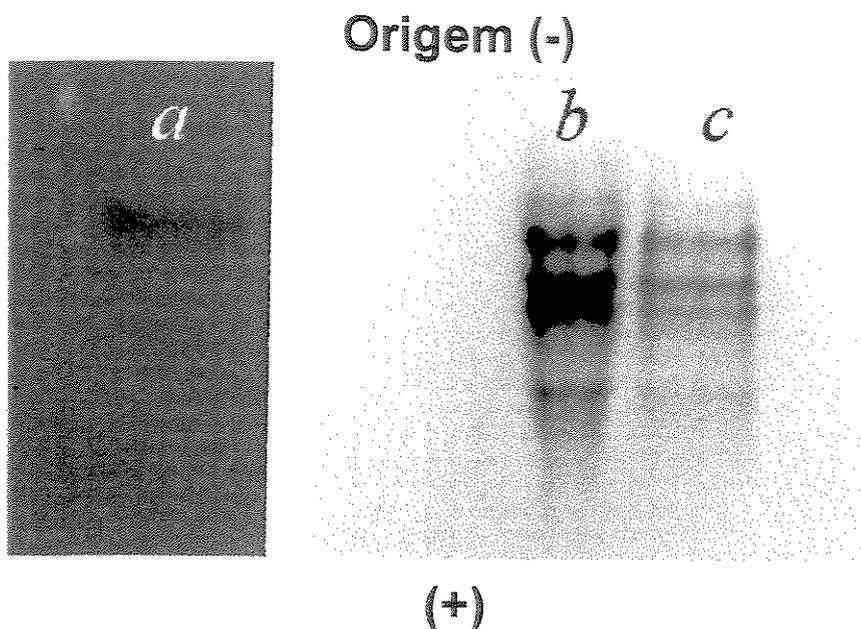


Figura 2. Eletroforese em condições não desnaturantes em pH 8,3 para a isoforma AP1 purificada (géis *a*, *b* e *c*). Os géis foram corados para atividade enzimática (gel *a*) e proteína (géis *b* e *c*). Aplicaram-se as seguintes quantidades de amostra: gel *a* - 50 μ g; gel *b* - 50 μ g e gel *c* - 25 μ g.

A banda difusa observada nos géis é devido ao fato de esta enzima ser glicosilada, o que provoca uma heterogeneidade de migração ao longo do gel (FERREIRA et al., 1998 b) e as bandas adicionais observadas no gel de proteína correspondem a glicofomas (moléculas em diferentes estágios de glicosilação) da própria fosfatase com atividades não evidentes no gel da esquerda.

Obtida a enzima, realizaram-se alguns experimentos como a desnaturação térmica e a desnaturação química, com a finalidade de se conhecer um pouco a respeito de sua conformação.

4.3 Desnaturação térmica

O perfil de desnaturação foi obtido, conforme podemos observar na Figura 3, abaixo:

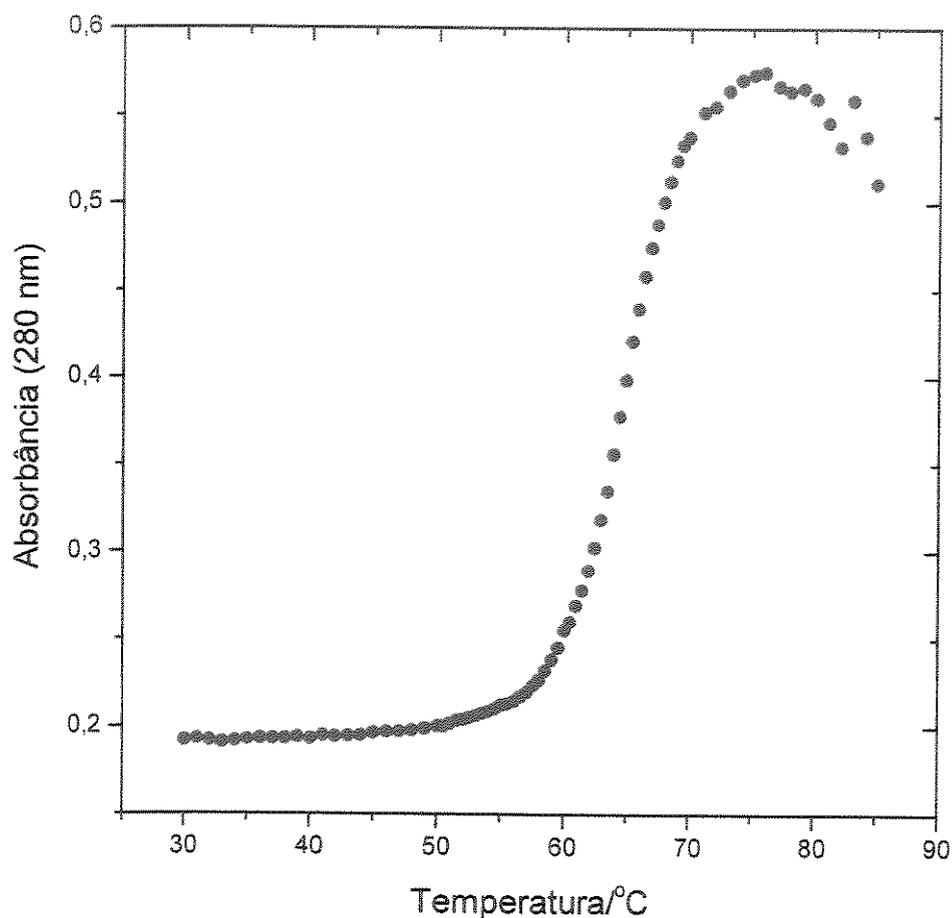


Figura 3 – Desnaturação térmica da fosfatase ácida de soja. A variação da absorbância em 280 nm da enzima em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0 com 10 % de DTT foi monitorada em função da temperatura.

Ao longo dos ensaios, verificou-se que o melhor perfil de desnaturação era obtido em presença de 10 % de ditioneitol (DTT), que atua preservando grupamentos -SH da oxidação. Em temperaturas acima de 70 °C, mesmo antes de se atingir o “platô”, ocorre uma aglomeração e precipitação enzimática, o que pode ser confirmado pela queda na absorvância em 280 nm para temperaturas superiores a 75 °C. Essa precipitação certamente é devida ao rompimento de interações intramoleculares e à formação de ligações intercadeias, possivelmente envolvendo pontes dissulfeto. Essa idéia é sustentada pelo fato de a fosfatase ser insensível ao p-CMB na concentração de 100 µM e ser inibida por ele em concentrações maiores, indicando que não há grupamentos -SH no sítio ativo, mas que esses grupamentos estão presentes em outros pontos periféricos da macromolécula.

A T_M foi calculada em 65 °C, sendo este valor concordante com dados cinéticos anteriores a partir dos quais ficou evidente que a fosfatase ácida de soja apresenta uma resistência incomum frente à temperatura quando comparada com outras enzimas (FERREIRA et al., 1998 a).

Num passo seguinte, a desnaturação enzimática foi feita em presença de p-nitrofenol (p-NP) e fosfato, ambos nas concentrações de 10 mmol/L. Estes compostos são produtos de reação e inibidores competitivos, podendo se ligar à enzima no sítio ativo, sendo que dados cinéticos demonstraram que a combinação citada apresentava grande efeito protetor da inativação térmica da enzima (FERREIRA et al., 1998 a). No entanto, na concentração de 10 mmol/L há uma intensa absorção do p-NP no comprimento de onda de 280 nm, o que tornou impossível a observação do perfil de desnaturação. Todavia, é importante frisar que, mesmo após o aquecimento a 85 °C, foi detectada uma atividade enzimática residual de cerca de 20 %, confirmando que a combinação de p-NP e fosfato nas concentrações citadas exercem um efeito protetor significativo da desnaturação térmica.

Foram também testados outros compostos que apresentam forte tendência de ligação à enzima a fim de se avaliar se o grau de interação entre a enzima e o

composto poderia induzir mudanças conformacionais na macromolécula que alterariam o comportamento catalítico de alguma forma. A escolha dos compostos foi feita também com base em conhecimentos prévios de influência na atividade enzimática.

4.3.1 Experimentos com a concanavalina A

A Figura 4 mostra o gráfico de inativação térmica da enzima em função do tempo de pré-incubação a 70 °C em presença de 50 µg de concanavalina A (ConA) a partir do qual podemos observar o efeito ativador.

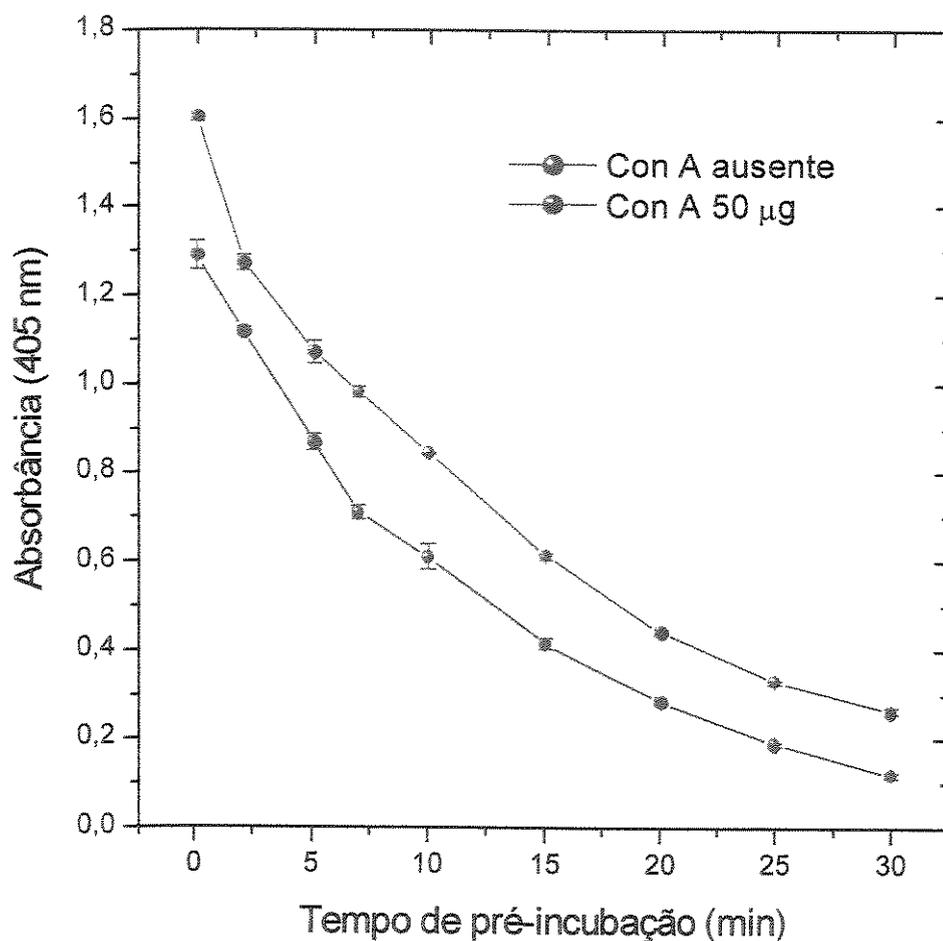


Figura 4 – Inativação térmica da fosfatase ácida de soja a 70 °C.

Ensaio realizados a 37 °C (FERREIRA, 1995) também mostraram que a ativação percentual pela ConA é concentração dependente, atingindo valores máximos da ordem de 35 % para a concentração de 100 µg/mL do composto.

Com base na ativação observada, foi realizada a desnaturação enzimática em presença da ConA em duas diferentes concentrações: 50 e 100 µg/mL. A desnaturação enzimática em presença de 50 µg/mL de ConA é mostrada na Figura 5, na qual encontra-se também o perfil da desnaturação enzimática sem a adição de composto. Como controle, temos a desnaturação térmica da própria ConA.

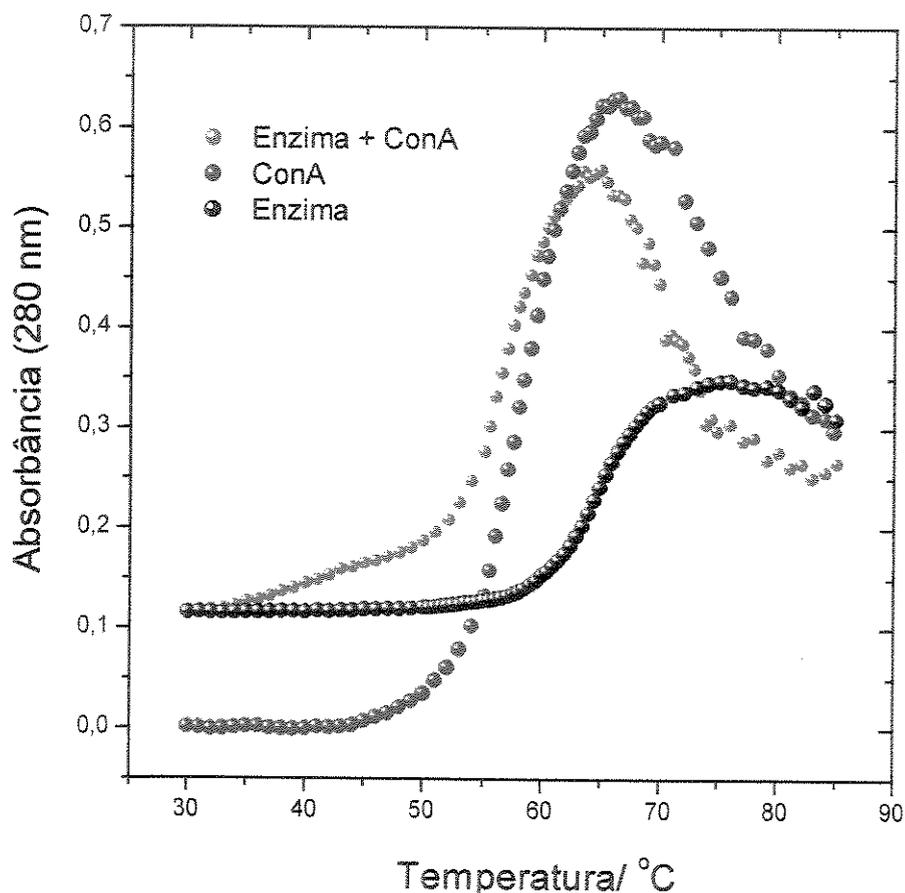


Figura 5 – Desnaturação térmica da fosfatase ácida de sementes de soja em presença de concanavalina A na concentração de 50 µg/mL.

Analisando o gráfico, podemos observar comportamentos diferentes de desnaturação térmica em cada caso, com diferentes temperaturas de transição (T_M). É interessante observar que, entre 30 e 45 °C, há um aumento no valor da absorvância o que sugere que, nesta faixa de temperatura há uma mudança conformacional na molécula da enzima, promovendo uma maior exposição dos grupos hidrofóbicos aromáticos. Esses dados, confrontados com os experimentos cinéticos sugerem que a ativação enzimática em presença da ConA ocorre devido a uma mudança conformacional na enzima que acaba por aumentar a eficiência catalítica. Um comportamento similar foi observado para a desnaturação em presença de ConA 100 µg/mL.

4.3.2 Efeito de inibidores na desnaturação térmica

Em geral, inibidores competitivos se ligam à enzima, protegendo-a da desnaturação térmica. Foram testados dois inibidores: o fosfato, que é um inibidor competitivo, e o molibdato, que se liga de maneira praticamente irreversível à enzima. Podemos avaliar, observando a Figura 6, que o fosfato, na concentração de 1mmol/L, não apresenta efeito de proteção da desnaturação térmica. Porém, observa-se claramente que houve uma diminuição na temperatura de transição de 1 a 2 °C quando a desnaturação foi realizada em presença de molibdato 1 µmol/L, indicando que o molibdato não possui efeito protetor, apesar de ligar-se fortemente à enzima. Um outro fato importante a ser salientado é que a precipitação enzimática, mesmo acima de 70 °C, não ocorre em presença de molibdato. Esses dados, juntamente com aqueles relacionados com o efeito do DTT, sustentam a idéia de que grupos -SH periféricos desempenham importante papel na manutenção da estrutura terciária através de pontes dissulfeto intramoleculares. A precipitação enzimática não ocorre em presença de molibdato, mesmo em temperaturas maiores, provavelmente porque parte do molibdato complexa com os grupos -SH impedindo a formação de pontes dissulfeto intercadeias. Observa-se também pelo gráfico da

Figura 6 que, em presença de molibdato, a enzima apresenta dois estágios de desnaturação, indicados pelas duas inclinações verificadas no perfil.

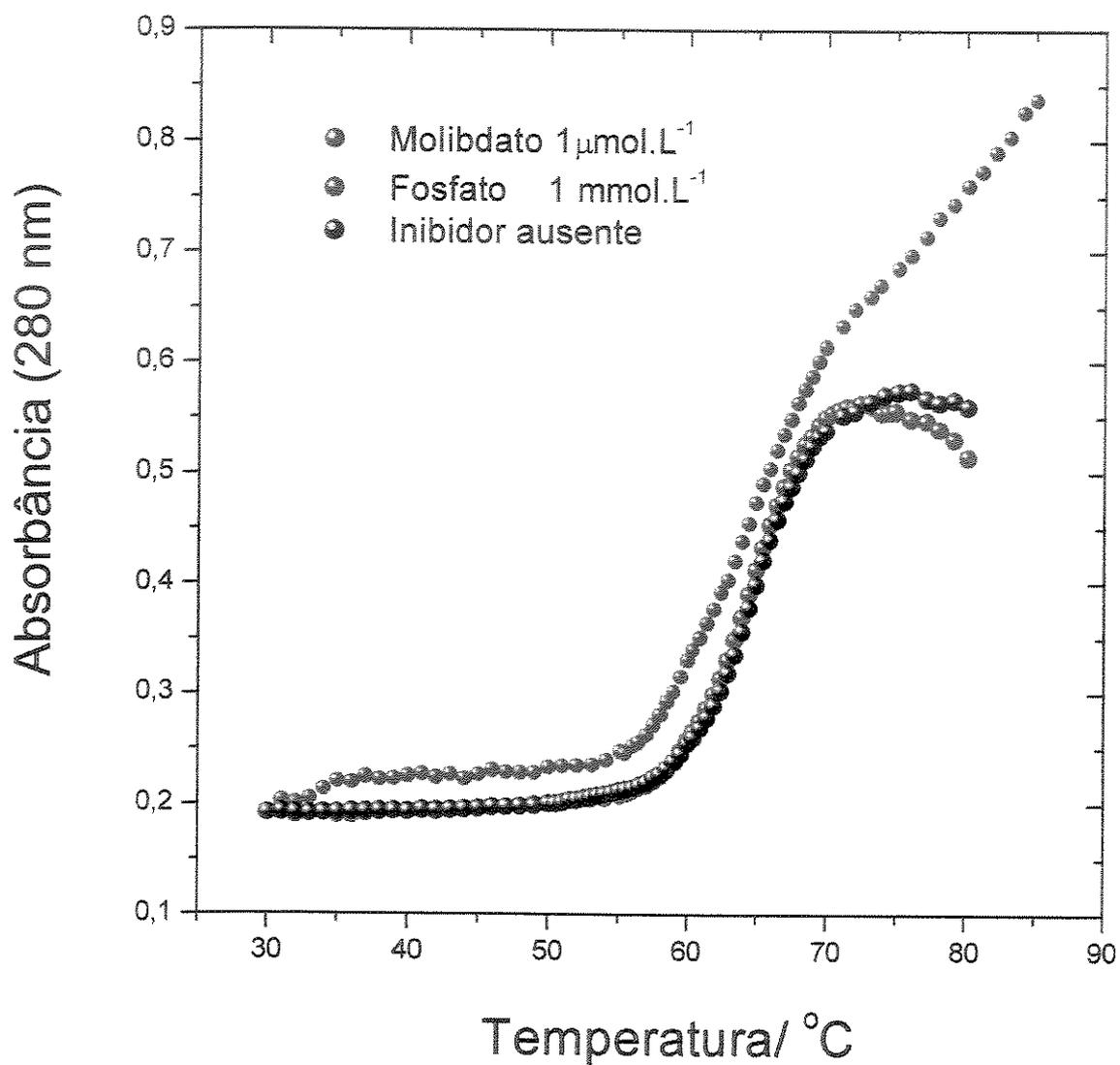


Figura 6 – Efeito de inibidores na desnaturação térmica da fosfatase ácida de sementes de soja.

4.4 Desnaturação enzimática por compostos químicos

Na desnaturação por compostos químicos, selecionamos um surfactante, dodecilsulfato de sódio (SDS) e dois conhecidos agentes desnaturantes: uréia e cloreto de guanidínio (GuaCl).

4.4.1 Desnaturação por dodecilsulfato de sódio (SDS)

Os estudos de desnaturação por dodecilsulfato de sódio (SDS) foram realizados utilizando-se três diferentes substratos, para-nitrofenilfosfato (p-NPP), tirosina-fosfato (Tyr-P) e fosfoenolpiruvato (PEP), sendo medida a atividade residual relativa (Figura 7).

Pelo gráfico mostrado na Figura 7, podemos ver claramente que a enzima é completamente desnaturada pelo SDS quando a concentração deste no meio reacional é da ordem de 1,8 mmol/L. No entanto, em presença de PEP, para a concentração de SDS mencionada, a atividade enzimática é mantida em quase 90 %, mostrando que o PEP pode apresentar efeito protetor da desnaturação pelo SDS.

Realizou-se também um experimento para se avaliar o efeito da concentração de SDS na desnaturação enzimática na ausência e em presença de PEP (Figura 8). Em ambos os casos, observa-se um acréscimo nos valores de absorbância relativa a 280 nm, demonstrando a desnaturação enzimática em presença do surfactante. Quando chegamos a uma situação em que praticamente 100 % das moléculas encontram-se na forma desnaturada, observamos que o valor da absorbância relativa atinge o máximo.

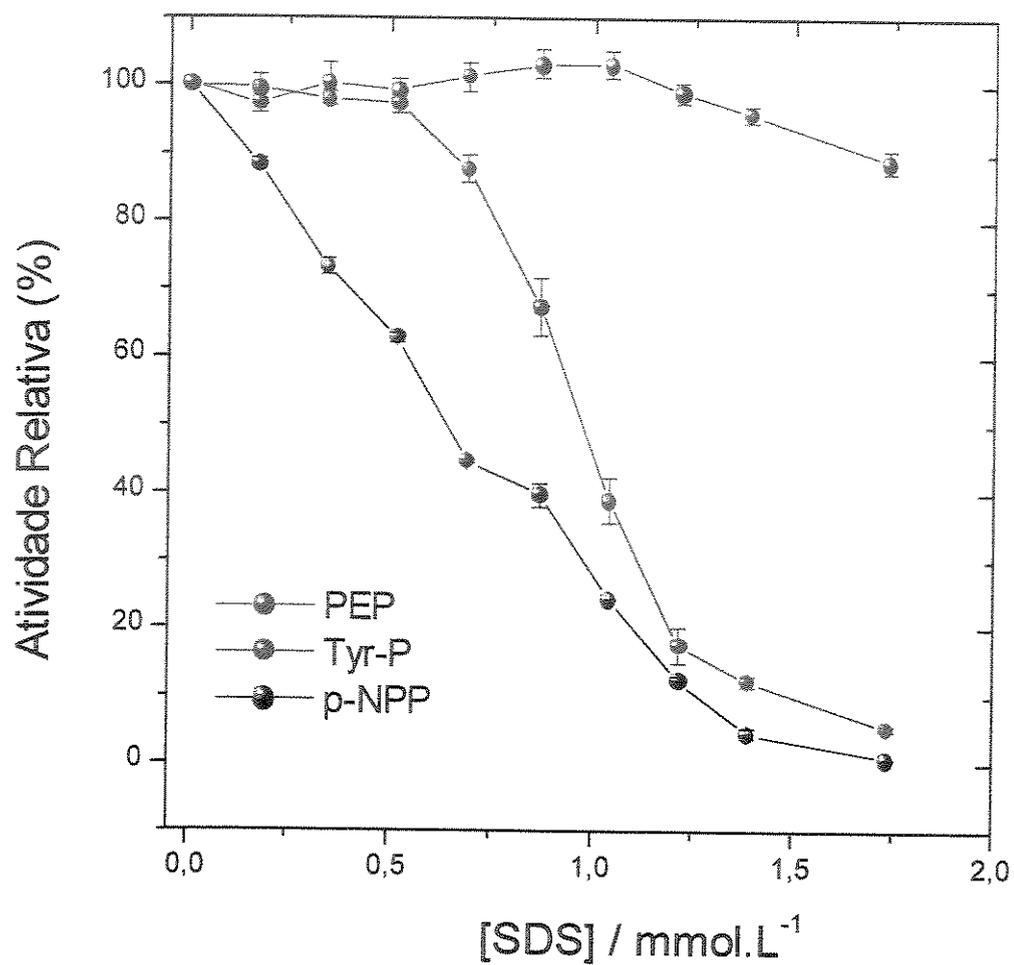


Figura 7 – Desnaturação da fosfatase ácida de sementes de soja por SDS em presença de diferentes substratos na concentração de 5 mmol.L⁻¹.

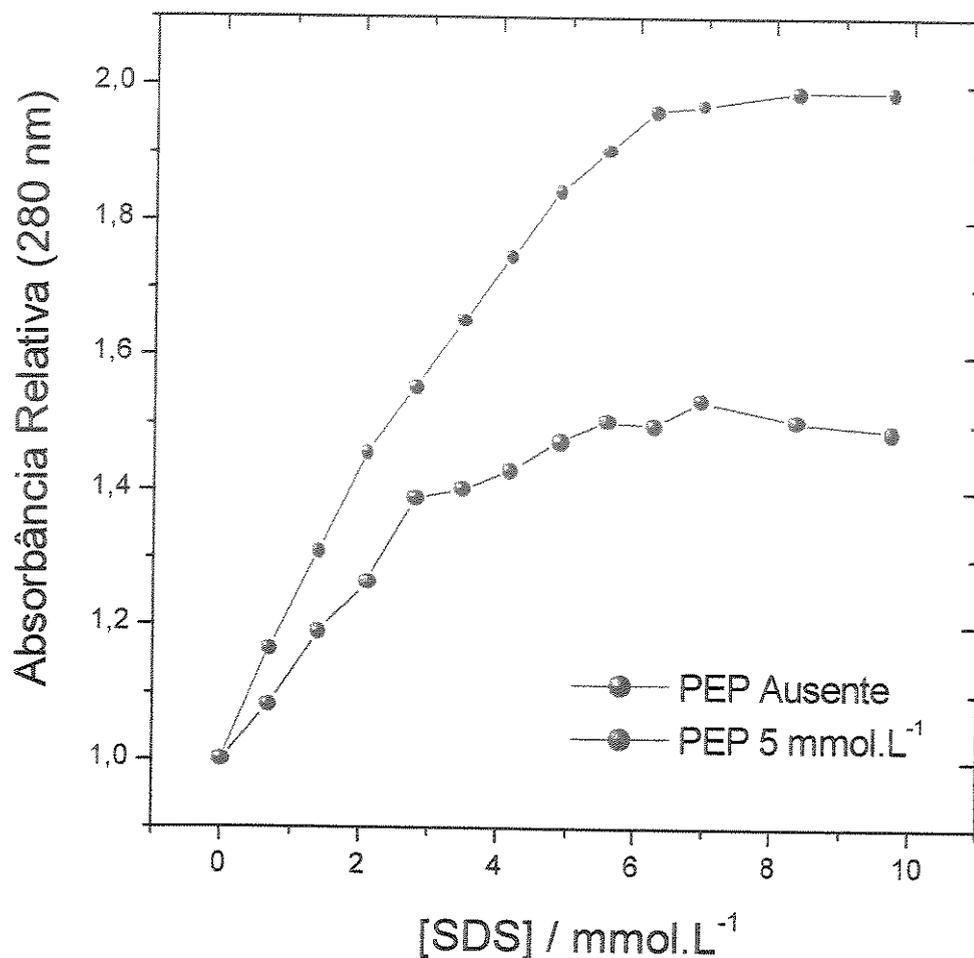


Figura 8 – Efeito da concentração de SDS na desnaturação da fosfatase ácida de sementes de soja a 25 °C.

Podemos atribuir o acréscimo nos valores de absorbância relativa como sendo devidos à exposição dos grupos hidrofóbicos aromáticos que ocorre quando o agente desnaturante está presente. Os diferentes perfis obtidos sugerem que a desnaturação enzimática se dá por mecanismos diferentes em ambos os casos e que o PEP desempenha realmente um papel protetor da desnaturação por SDS, uma vez que estaria ocorrendo menor exposição dos grupamentos aromáticos.

Concomitantemente a esses experimentos, foram feitas medidas de atividade sendo que esta foi reduzida a praticamente zero para concentrações acima de 4 mmol/L de SDS.

Também foram feitos experimentos para se analisar o efeito protetor da desnaturação por SDS exercido pelo PEP na pré-incubação. Neste caso, a enzima foi pré-incubada por 10 minutos com SDS na concentração de 2 mmol/L a 25 °C na ausência e na presença de PEP 5 mmol/L e em seguida realizada diálise por 8 horas contra tampão acetato 0,01 mol/L (pH 5,0) para remoção tanto do fosfato como do surfactante. Observou-se que 90 % de atividade enzimática foi restabelecida após a diálise no caso em que o PEP encontrava-se presente mas não foi observada atividade no caso em que o PEP não havia sido adicionado, mostrando que o PEP apresenta igual efeito protetor quando pré-incubado com a enzima.

Esses resultados são coerentes com a idéia de que a fosfatase ácida de sementes de soja venha a ser uma fosfoenolpiruvato fosfatase, apoiando fortemente dados cinéticos observados anteriormente pelos quais verificou-se que o PEP era um melhor substrato que o p-NPP e representando um forte candidato a substrato fisiológico da enzima (FERREIRA et al., 1999). No entanto, faz-se necessários estudos mais aprofundados para se poder inferir com certeza a respeito desse fato.

4.4.2 Desnaturação térmica em presença de fosfoenolpiruvato (PEP)

Conforme os resultados obtidos, pôde-se constatar de forma clara que o PEP apresenta efeito significativo na estabilidade conformacional da enzima e exerce proteção da desnaturação pelo SDS.

Uma vez que o PEP confere proteção à enzima contra a desnaturação pelo SDS, procuramos verificar se o PEP também apresentaria efeito na desnaturação térmica. Os perfis dessa desnaturação térmica são mostrados na Figura 9 na qual observa-se uma diminuição na temperatura de transição (T_M) em presença do PEP o que mostra que esta molécula favorece o desenovelamento da proteína. O mesmo não ocorre quando se utilizam os produtos de hidrólise do PEP na mesma

concentração (que são piruvato e fosfato inorgânico), deixando claro que o efeito na desnaturação se dá exclusivamente pela interação do PEP com a proteína.

A priori, poderíamos imaginar que este resultado é contraditório com o papel protetor que o PEP demonstra na desnaturação por SDS, mas devemos considerar que um protetor de desnaturação química não necessariamente será um bom protetor de desnaturação térmica e vice-versa, tendo em vista que os mecanismos pelos quais o desenovelamento da proteína ocorre nas duas situações podem ser completamente diferentes. Tomando o nosso caso como exemplo vemos que, sem dúvida alguma, a interação enzima-PEP é muito forte e essa interação intermolecular pode prejudicar pontes de hidrogênio e ligações de Van der Waals intramoleculares que desempenhariam papéis importantes na estabilidade térmica da estrutura terciária. Em contrapartida, a presença das moléculas de PEP dificultariam o acesso ao sítio ativo e, conseqüentemente, a ação desnaturante do SDS. Como fatores estéricos são essenciais em mecanismos químicos, os nossos resultados sugerem que, muito provavelmente, esta é a razão pela qual observa-se efeito protetor do PEP na desnaturação química, haja vista que os resultados obtidos frente à temperatura sugerem que as ligações intramoleculares são prejudicadas quando o PEP está ligado à proteína.

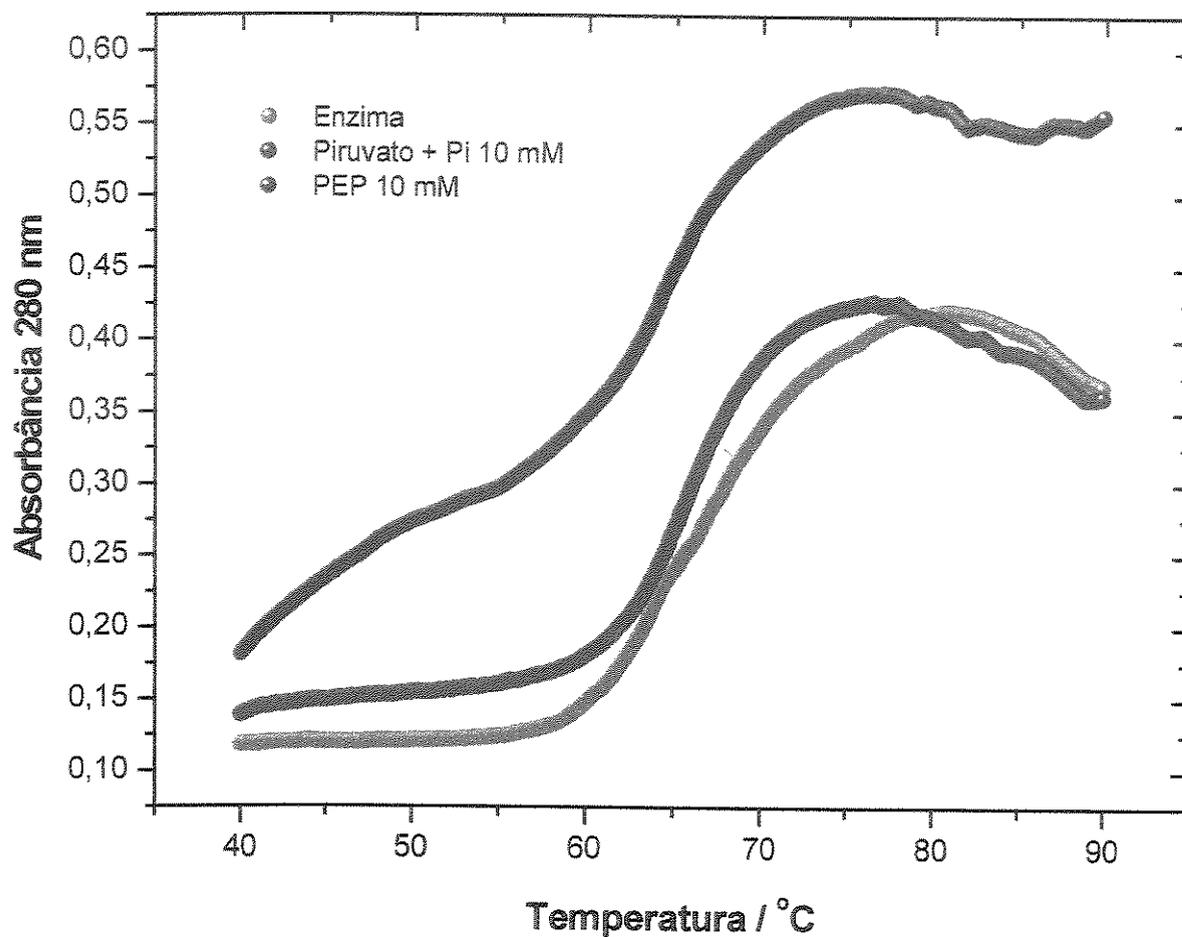


Figura 9 - Desnaturalização térmica da fosfatase ácida de soja em presença de PEP. A variação da absorbância em 280 nm da enzima na ausência e na presença dos compostos mencionados foi monitorada em função da temperatura.

Estudamos também a desnaturação da fosfatase ácida por uréia e cloreto de guanidínio, dois agentes desnaturantes bastante utilizados em estudos conformacionais de proteínas.

4.5 Desnaturação por Uréia

Inicialmente, buscou-se determinar o tempo necessário para a completa desnaturação da enzima pela uréia. O espectro de emissão foi determinado após diversos intervalos de tempo até 50 horas. Assim, foi possível verificar que a desnaturação se completou após 30 horas (não mostrado).

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão pode-se observar uma alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração de uréia e um concomitante deslocamento dos picos de emissão para o vermelho (Figura 10).

O deslocamento para o vermelho ocorre devido à transferência de energia dos anéis aromáticos dos resíduos de tirosina para os resíduos de triptofano. Obviamente, a abertura conformacional leva a uma maior proximidade desses grupos e induz um aumento na taxa de transferência. Por isso, além de mudanças na intensidade, verifica-se um aumento no $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão, sendo que o deslocamento neste caso foi de 11,7 nm.

Através dos valores de máximo comprimento de onda de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$), é possível fazer o cálculo da fração desnaturada de proteína para cada concentração do agente desnaturante (Figura 11), obtendo-se uma curva de desnaturação simples, o que sugere que o mecanismo de desnaturação da FAc de soja por uréia envolve dois estágios.

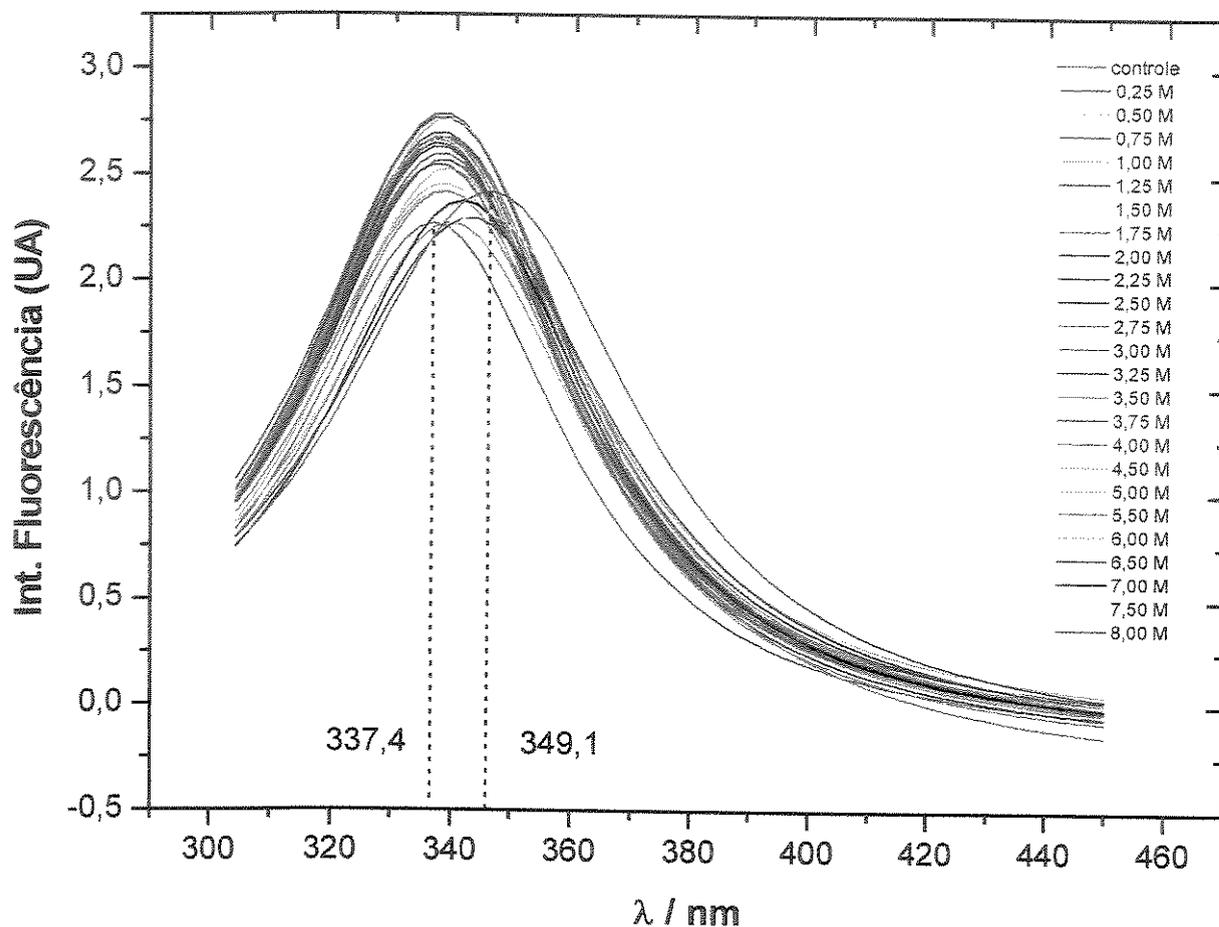


Figura 10. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de uréia.. * UA = Unidades Arbitrárias

Podemos analisar os resultados mais claramente através da Figura 11, onde observamos a fração desnaturada em função da concentração de uréia. Foi feito o ajuste dos espectros de emissão obtidos às funções de Lorentz correspondentes. Essa função proporcionou um melhor ajuste que outras funções como a Gaussiana e, desta maneira, os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ para cada concentração de uréia foram determinados considerando-se o centro da curva em cada caso.

A fração desnaturada foi determinada, então, pela relação:

$$F_d = (\lambda_n - \lambda_{obs}) / (\lambda_n - \lambda_d)$$

onde λ_{obs} são os comprimentos de onda de máxima emissão observados, e λ_n e λ_d representam os valores de λ característicos à conformação nativa e desnaturada. Na verdade, qualquer outro parâmetro mensurável como a intensidade de fluorescência poderia ser tomado, desde que apresentasse uma tendência uniformemente clara ao longo da desnaturação, o que não foi verificado no nosso caso para a intensidade. Desta maneira, preferiu-se trabalhar com os comprimentos de onda de máxima emissão como parâmetro de monitoramento.

O gráfico interno mostra a variação da Energia Livre de desnaturação em função da concentração do agente desnaturante. A metodologia de cálculo dos parâmetros termodinâmicos para a desnaturação será melhor detalhada adiante.

Através do gráfico, verifica-se que a desnaturação por uréia se dá de maneira bastante gradual e não é visivelmente completa mesmo para a máxima concentração de uréia (8 mol/L). Esta conclusão é reforçada pelo deslocamento do Centro de Massa observado na Figura 12.

O Centro de Massa pode ser calculado, para cada concentração do agente desnaturante, pela relação:

$$v = \sum_i v_i F_i / \sum_i F_i$$

Onde F_i representa a fluorescência emitida em cada comprimento de onda v_i e a soma realizada com base na faixa apreciável de valores de F , conforme descrito por BONAFE et al. (1998).

Na figura 13, temos o gráfico da atividade da FAc em função da concentração de uréia. É interessante notar que a perda de atividade enzimática aumenta

sensivelmente com o aumento da concentração de uréia, sendo máxima já na concentração de 3 mol/L. Na concentração de 2 mol/L a atividade residual é inferior a 40 %. No entanto, nesta concentração tanto o $\lambda_{\text{máx}}$ como o Centro de Massa estão apenas começando a variar (Figura 12). Isto ocorre porque a atividade enzimática não depende apenas da conformação da proteína mas também da integridade do sítio ativo.

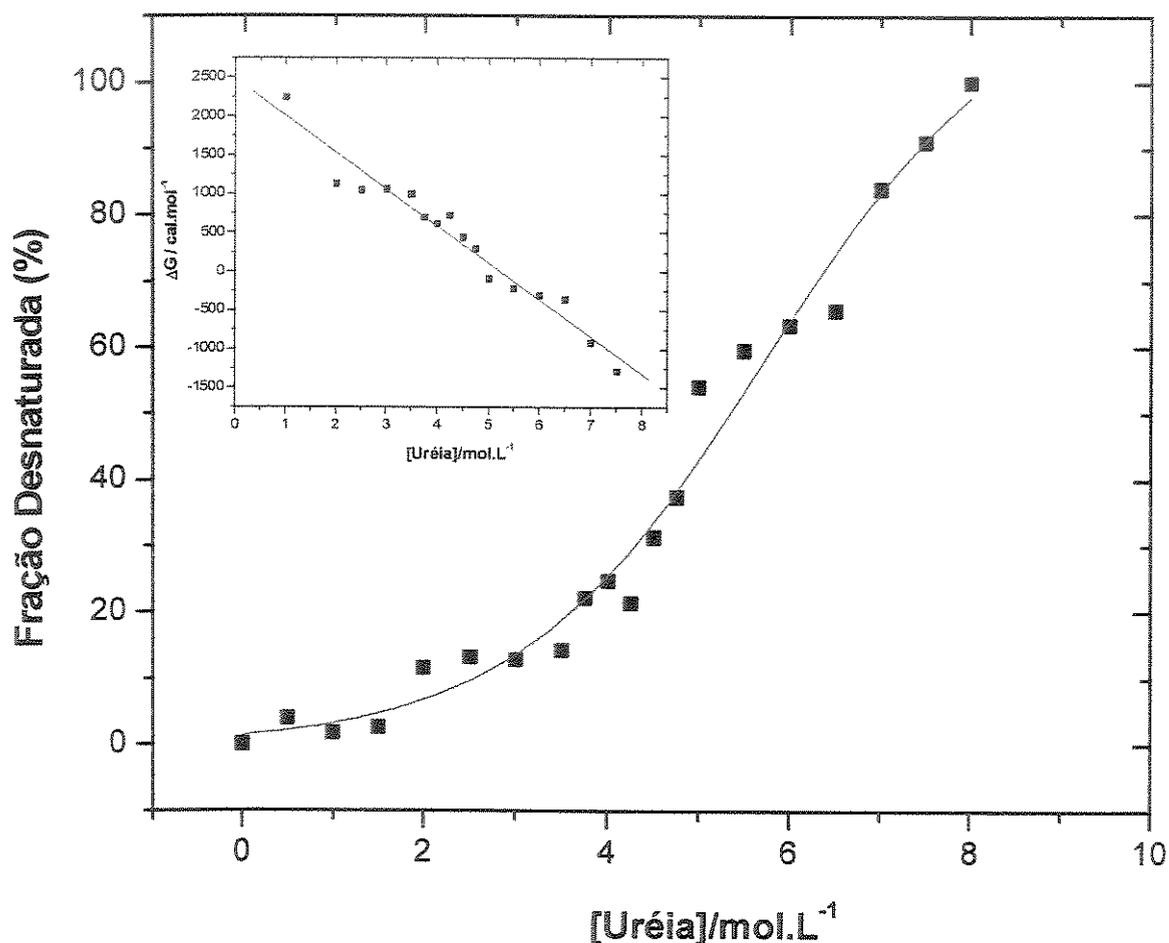


Figura 11. Perfil de desnaturação da FAc de soja por uréia (curva maior, em azul). O gráfico interno mostra a dependência da variação de energia livre (ΔG) de desnaturação em função da concentração da uréia.

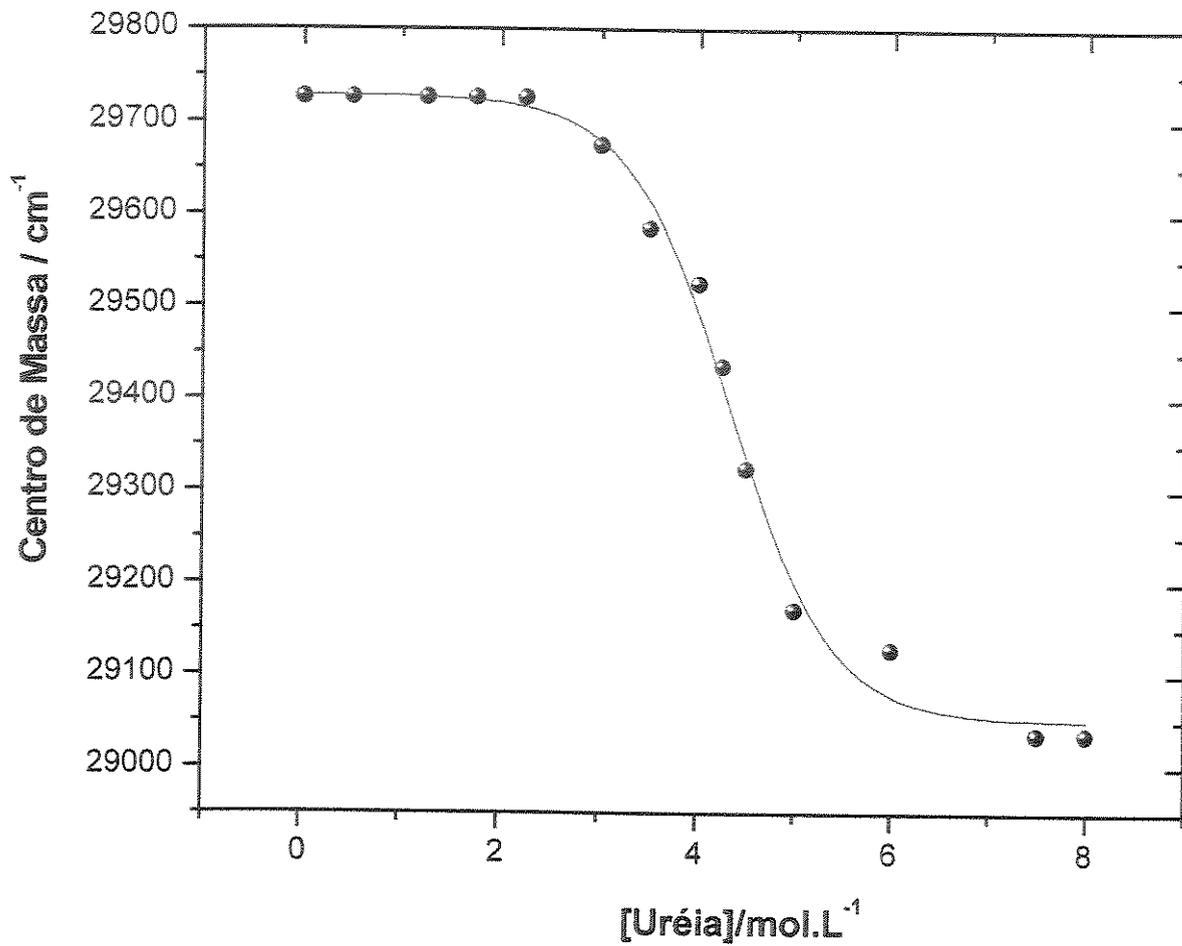


Figura 12. Gráfico do efeito da concentração de uréia no Centro de Massa da proteína.

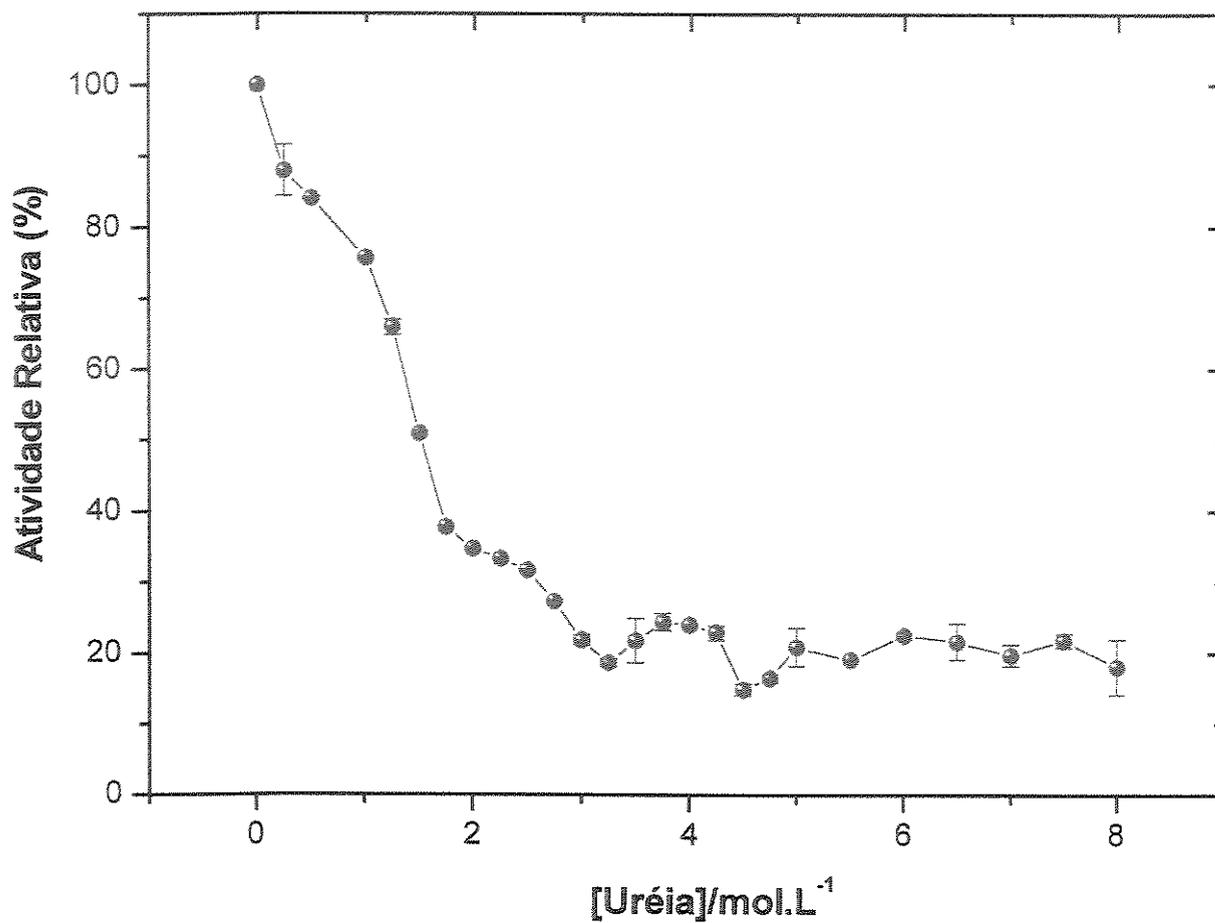


Figura 13. Efeito da concentração da uréia na atividade enzimática.

4.6 Desnaturação por Cloreto de Guanidínio

Da mesma forma que com a uréia, inicialmente procurou-se determinar o tempo necessário para a completa desnaturação da enzima pelo cloreto de guanidínio. O espectro de emissão foi determinado após diversos intervalos de tempo até 30 horas. Assim, foi possível verificar que a desnaturação se completou após 24 horas (não mostrado).

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão podemos observar o mesmo efeito que ocorreu na a desnaturação por uréia, ou seja, uma alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração do cloreto de guanidínio e um concomitante deslocamento dos picos de emissão para o vermelho (Figura 14), que também é devido à transferência de energia dos anéis aromáticos de resíduos de tirosina para os resíduos de triptofano. No entanto, o deslocamento observado neste caso (17,9 nm) foi maior que no caso anterior. Plotando-se os valores de comprimento de onda de emissão máximo em função da concentração do cloreto de guanidínio (Figura 15), também se obtém uma curva de desnaturação simples, sugerindo que o mecanismo de desnaturação da FAc de soja por cloreto de guanidínio envolve dois estágios, isto é, Nativo-Desnaturado. Esta observação é reforçada pelo deslocamento do Centro de Massa (Figura 16). Os resultados demonstram que em concentrações acima de 1 mol/L de cloreto de guanidínio o processo de desnaturação se inicia.

Na figura 17, temos o gráfico da atividade da FAc em função da concentração de cloreto de guanidínio.

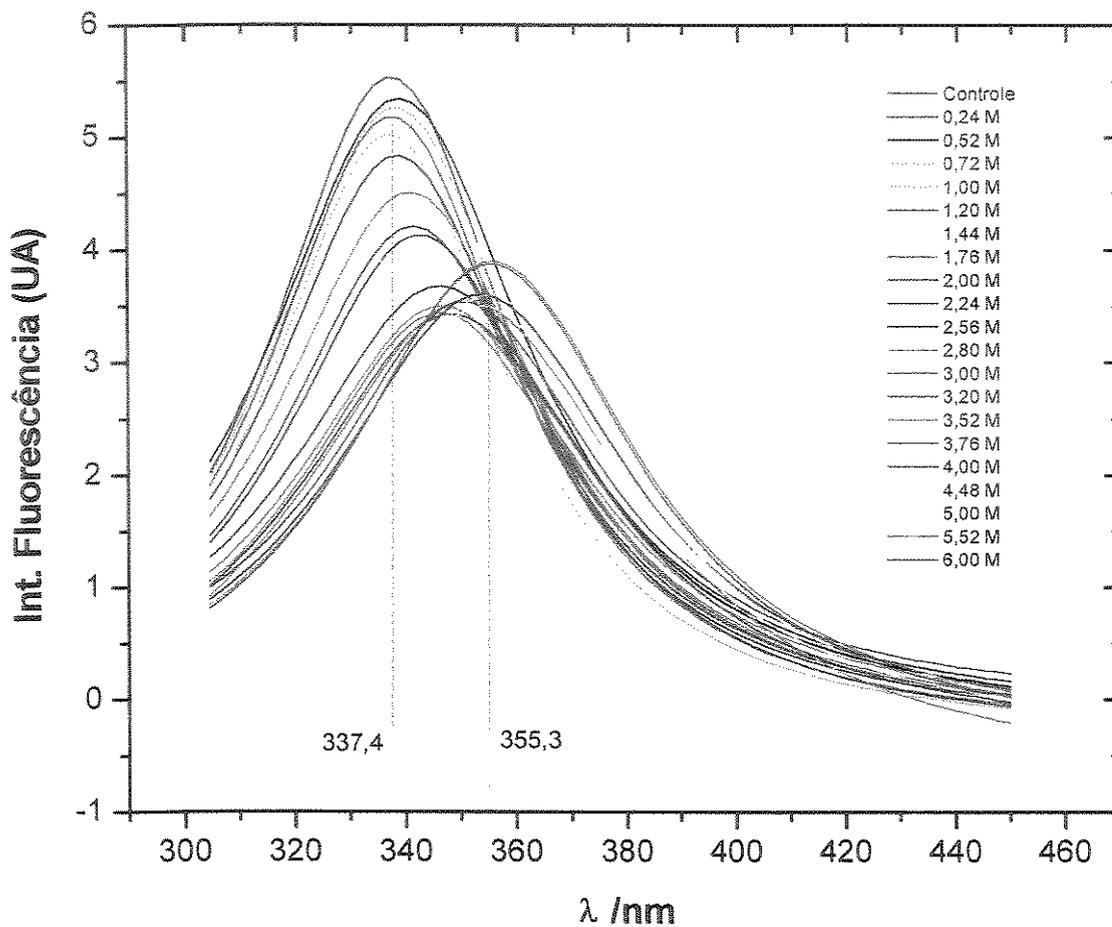


Figura 14. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de cloreto de guanidínio. * UA = Unidades Arbitrárias

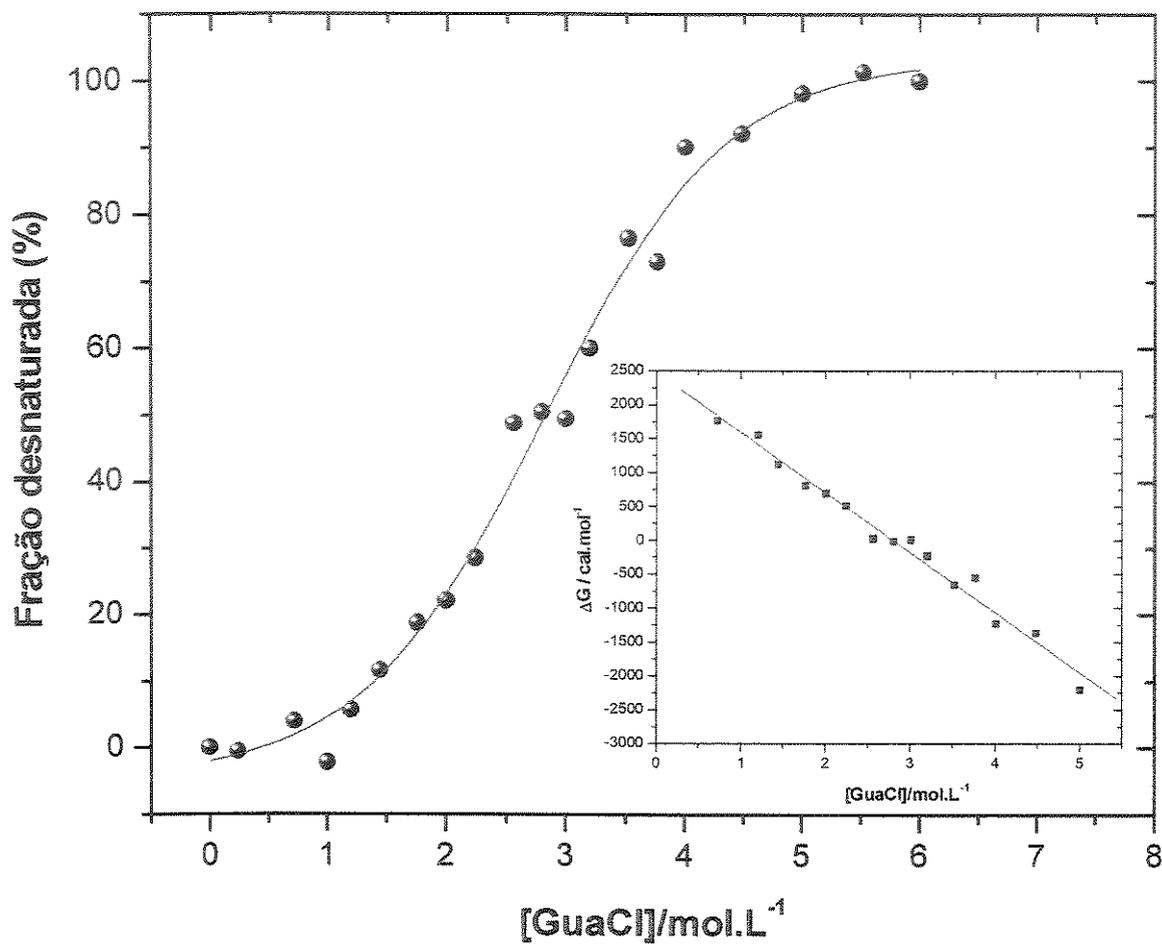


Figura 15. Curva de desnaturação da FAc de soja por cloreto de guanidínio (gráfico externo). No gráfico interno temos a ΔG de desnaturação como função da concentração em mol/L de cloreto de guanidínio.

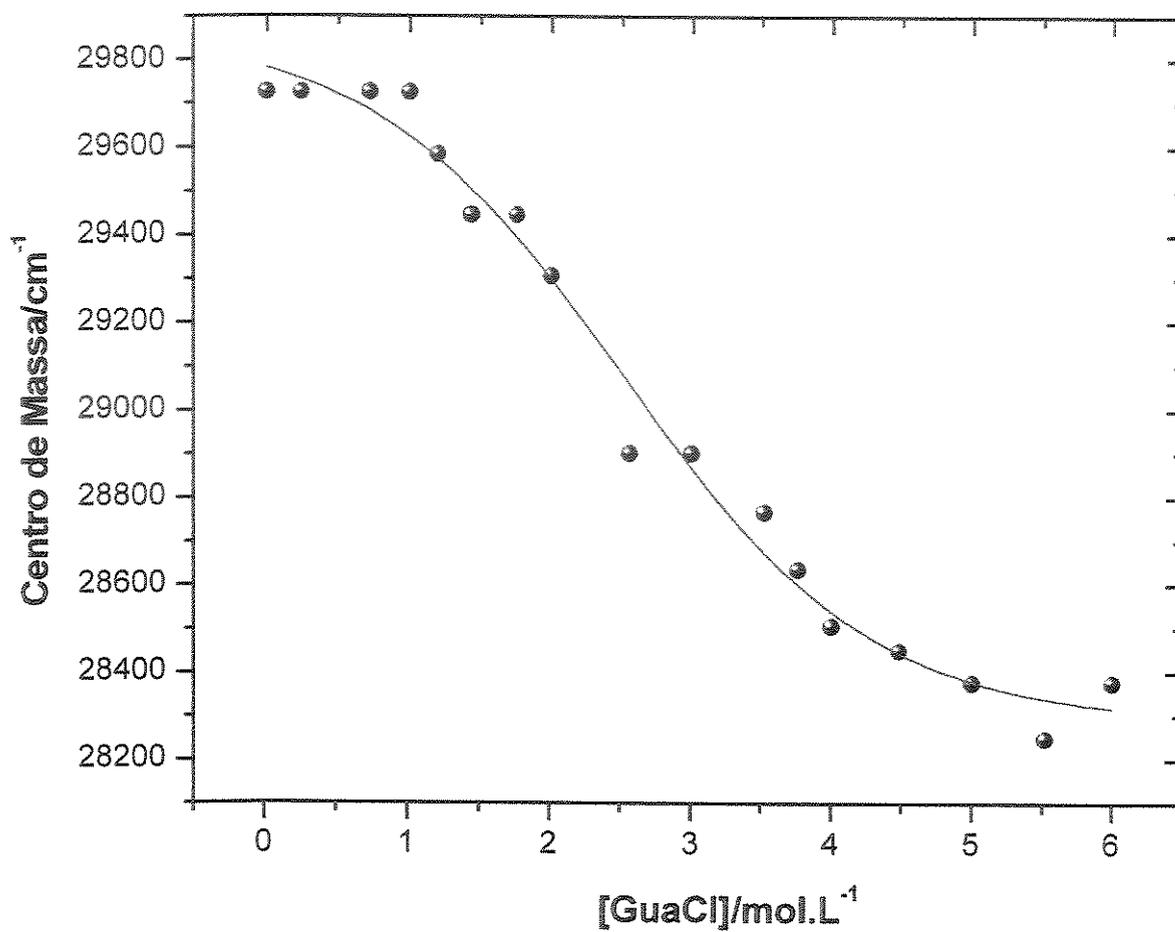


Figura 16. Gráfico do efeito da concentração de cloreto de guanidínio no Centro de Massa da proteína.

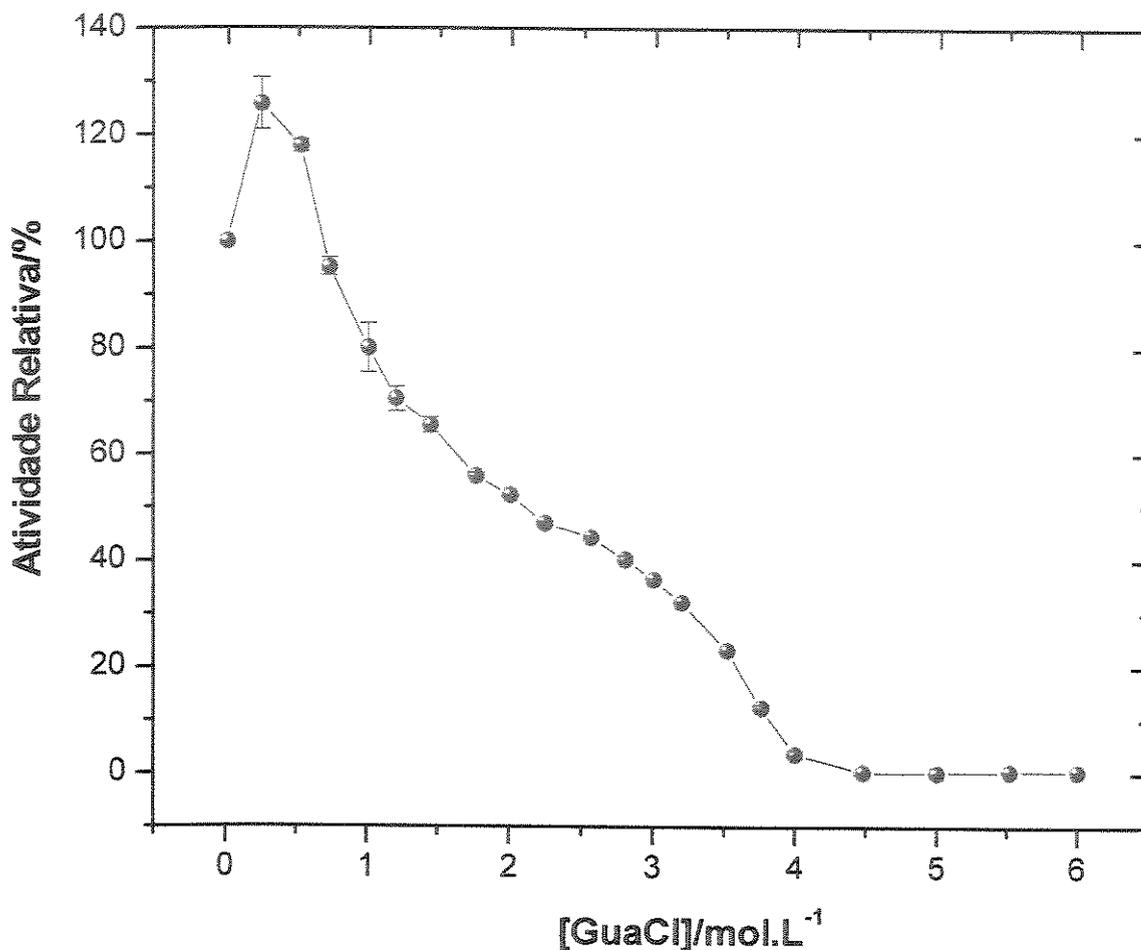


Figura 17. Efeito da concentração de cloreto de guanidínio na atividade enzimática.

É importante lembrar que a determinação dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação só tem sentido quando se tem certeza de que o processo de desnaturação é reversível. A desnaturação térmica da fosfatase de soja é um processo irreversível, haja vista que a atividade enzimática não foi restabelecida após resfriamento gradual o que comprovaria que a proteína reassumira o estado conformacional nativo. Desta forma, os parâmetros termodinâmicos não foram calculados para a desnaturação térmica. A desnaturação por SDS também se

mostrou irreversível. Nos estudos envolvendo desnaturação por agente químico, o teste de reversibilidade foi realizado por diluição e medida da atividade enzimática relativa ao controle (ausência do agente desnaturante). Podemos observar claramente que a desnaturação foi reversível em ambos os casos. No entanto, a reversão da desnaturação por uréia ocorre prontamente diluindo-se 10 vezes a amostra pré-incubada com uréia 8M enquanto que a renaturação apreciável, no caso do cloreto de guanidínio, só acontece com diluições maiores do agente desnaturante.

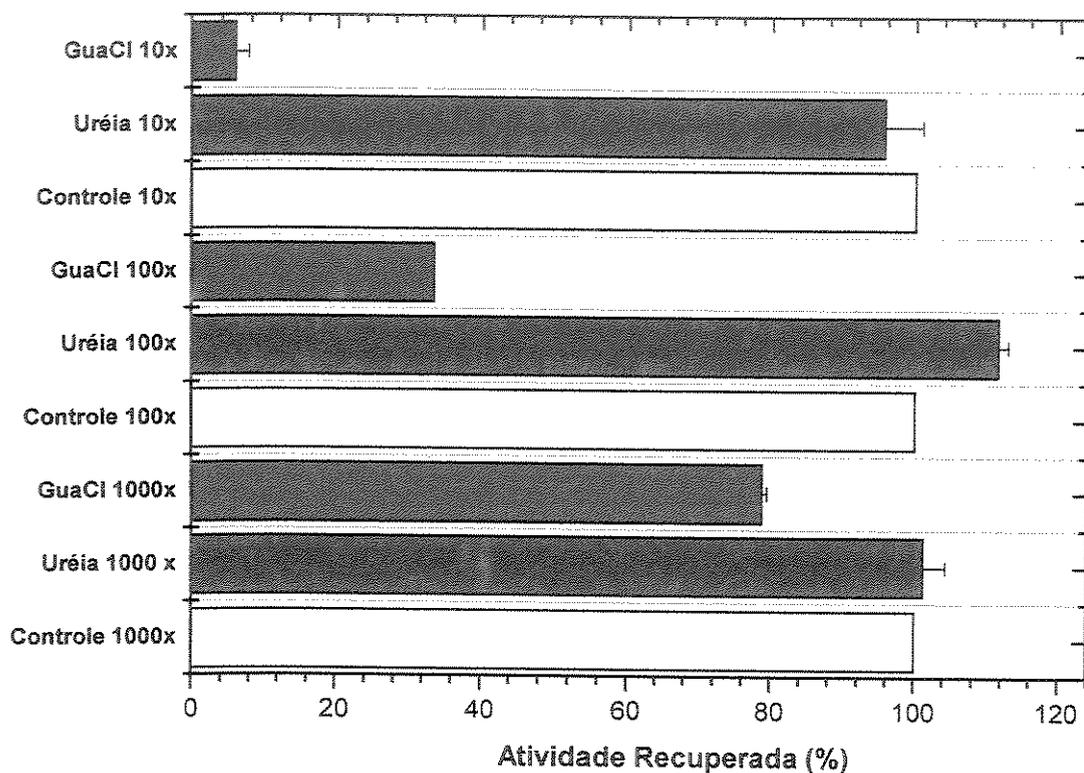


Figura 18 - Reversibilidade da desnaturação por uréia e cloreto de guanidínio da fosfatase de soja. A atividade residual relativa foi determinada após a diluição do agente desnaturante.

4.7 Cálculo da Estabilidade Conformacional ($\Delta G_2^{H_2O}$)

Uma vez que o processo de desnaturação é reversível e parece envolver apenas dois estágios, nativo e desnaturado, em ambos os casos, podemos utilizar o método de PACE (1986) para calcular os parâmetros termodinâmicos do processo.

A diferença de energia livre entre os estados nativos e desnaturados, ΔG , pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$\Delta G = -R T \ln [F_d/(1 - F_d)]$$

onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal mol}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin. O método de análise dos mínimos quadrados é usado para demonstrar os valores da região de transição pela equação:

$$\Delta G = \Delta G_2^{H_2O} - m [D]$$

onde $\Delta G_2^{H_2O}$ é o valor de ΔG na ausência do desnaturante e representa a Estabilidade Conformacional da molécula, isto é, quão mais estável a proteína é na conformação nativa (globular) do que nas conformações desnaturadas. Em média, o valor de $\Delta G_2^{H_2O}$ é de $5,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, mas não deve ser tomado isoladamente a fim de avaliar a estabilidade da macromolécula. O parâmetro m representa o coeficiente angular da transição desnaturante, ou seja, a medida da dependência do ΔG em relação à concentração do desnaturante e $[D]$ é a própria concentração do desnaturante.

Desta forma, os valores de m obtidos foram de $0,47 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot (\text{mol/L})^{-1}$ e $0,89 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot (\text{mol/L})^{-1}$ para as desnaturações por uréia e cloreto de guanidínio, respectivamente. O valor de $\Delta G_2^{H_2O}$ calculado de $2,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ foi concordante nos dois experimentos com um desvio inferior a 0,05%, mostrando que o método de PACE é extremamente adequado para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação reversível. É importante salientar, no entanto, que a determinação dos parâmetros termodinâmicos só é válida para processos reversíveis como neste caso. A reversibilidade pode ser comprovada pela restauração de atividade mediante diluição ou diálise, conforme apresentado nos resultados.

4.8 Composição de aminoácidos

A determinação de aminoácidos foi feita no laboratório de Química de Peptídeos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), conforme descrito em Métodos 3.2.4. A Tabela 2 mostra os dados obtidos. Podemos observar que a enzima apresenta um maior número de resíduos (35) de ácido aspártico ou asparagina (interconvertíveis) e o menor número de resíduos detectados (2) de metionina. Importante salientar que triptofano e cisteína não são detectados através do método empregado.

Tabela 2 – Composição de aminoácidos para a fosfatase ácida de soja

Aminoácido	Número de Resíduos	% em massa	% média em proteínas *
Asn ou Asp	35	12,9	9,9
Thr	19	6,3	6,0
Ser	23	6,8	7,1
Glu ou Gln	24	9,9	9,7
Pro	15	4,9	4,6
Gly	24	4,9	7,5
Ala	20	5,0	9,0
Cys	-	-	2,8
Val	21	6,7	6,9
Met	02	0,9	1,7
Ile	16	5,8	4,6
Leu	25	9,2	7,5
Tyr	14	6,9	3,5
Phe	14	6,7	3,5
His	08	3,5	2,1
Lys	13	5,2	7,0
Arg	09	4,5	4,7
Trp	-	-	1,1

* KLAPPER, M.H. (1977)

Um dado importante também revelado na análise de aminoácidos foi que a isoforma AP1 apresenta uma quantidade expressiva de resíduos com caráter ácido, o que confirma resultados obtidos anteriormente que demonstraram que o ponto isoelétrico desta enzima é relativamente baixo (5,0). Além desse fator, sabe-se que resíduos ácidos podem contribuir de forma significativa para a estabilidade conformacional de uma enzima, mesmo se esses resíduos não estiverem relacionados diretamente com a catálise enzimática. Isso é comprovado pelo fato de que mutações nos resíduos localizados na superfície da proteína podem levar a distorções que se propagam até o sítio ativo (RAMPONI et al., 1999).

O número elevado de resíduos de aminoácidos Asn, Thr e Ser pode indicar que a glicosilação ocorreria em diferentes regiões da cadeia polipeptídica. Em relação aos demais aminoácidos analisados, podemos constatar que a composição obtida para a fosfatase ácida de soja não difere significativamente da composição média encontrada nas proteínas em geral.

4.9 Estudos envolvendo a fração de carboidratos

Comumente, as fosfatases ácidas de plantas são glicoproteínas (DUFF et al, 1994). A seguir, descrevemos os resultados sobre teor/composição de carboidratos da fosfatase ácida de sementes de soja e remoção dos açúcares, que são componentes importantes para a estabilidade conformacional da enzima.

4.9.1 Determinação do carboidrato total

A isoforma AP1 de sementes quiescentes de soja é uma glicoproteína e contém 30 % de carboidrato em sua estrutura (FERREIRA et al., 1999). O teor de carboidrato total foi determinado de acordo com o método de DISHE, 1954 (Métodos 3.2.5). FERREIRA et al. (1999) já haviam mostrado também que as outras isoformas: AP2, AP3A e AP3B de fosfatase ácida de sementes de soja quiescentes apresentaram 28, 18 e 10% de carboidrato em suas estruturas, respectivamente.

A presença de carboidratos nas enzimas, principalmente em plantas, por um lado facilita sua purificação uma vez que essa característica permite que as mesmas sejam retidas em resinas de afinidade como a Concanavalina A-Sepharose. No entanto, a presença de carboidrato na estrutura da proteína prejudica o perfil de eletroforese, uma vez que os carboidratos são responsáveis pela heterogeneidade de migração que aparece nos géis (MORRIS *et al*, 1989).

4.9.2 Composição dos carboidratos

A mistura de monossacarídeos, 10 nmol para cada: manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, foi tratada com PMP e dissolvida em 200 μ L de água como descrito detalhadamente em métodos 3.2.6. Em seguida, foi feita a separação por HPLC de fase reversa (Figura 19). Todos os cinco monossacarídeos PMP-tratados foram resolvidos com linha de base de pelos menos dois minutos de separação de tempo de retenção. Após várias aplicações dos padrões, foi possível observar uma excelente reprodutibilidade do experimento. Os picos para todos os monossacarídeos foram bem definidos e simétricos. Os cinco monossacarídeos utilizados como padrão representam os açúcares comumente encontrados em glicoproteínas provenientes de mamíferos, plantas e fungos (FU & O'NEILL, 1995).

A análise por HPLC do componente de açúcar da fosfatase ácida de sementes de soja é mostrada na Figura 20. Verifica-se um pico em 37 minutos (A) que é referente à manose (8,3%) e, em 43 e 45 minutos, observam-se dois picos sobrepostos (B/C), um dos quais atribui-se à glicosamina (32,1%) e o outro à galactosamina (50,3%). Apesar de não ter sido passado o padrão para este último, pode-se constatar na literatura que a galactosamina apresenta um tempo de retenção um pouco maior e bem próximo do tempo de retenção da glicosamina. Além disso, estudos com lectinas específicas demonstraram que a fosfatase ácida de sementes de soja certamente apresenta galactosamina em sua estrutura. Os picos menores em 69

e 70 minutos correspondem à glicose (5,1%) e galactose (4,2%). As porcentagens foram calculadas com base nas integrais dos picos atribuídos em cada caso.

É interessante citar que a fosfatase ácida de sementes de soja apresenta uma composição bem diferente da observada para a enzima de mamona em que se observa a presença apenas de glicose como carboidrato (não mostrado). Na tabela 3, podemos observar que não há uma composição similar entre as diferentes glicoproteínas já previamente descritas, porém sendo glicosamina e manose os açúcares mais comumente encontrados.

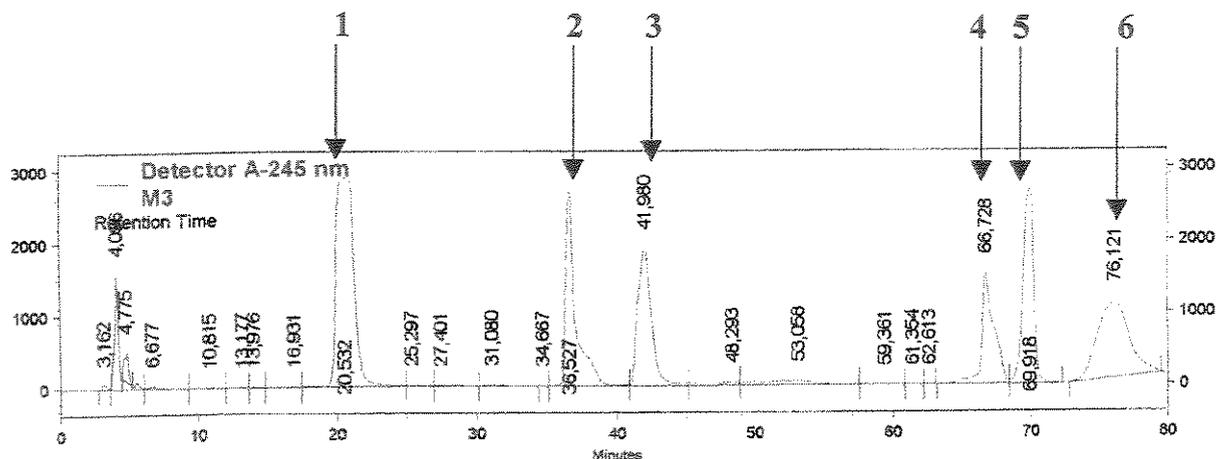


Figura 19. Separação por HPLC dos padrões de monossacarídeos PMP-tratados. O fluxo de corrida foi de 0,2 mL/min e o volume de amostra aplicado foi de 20 μ L. Os Picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são PMP, manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, respectivamente.

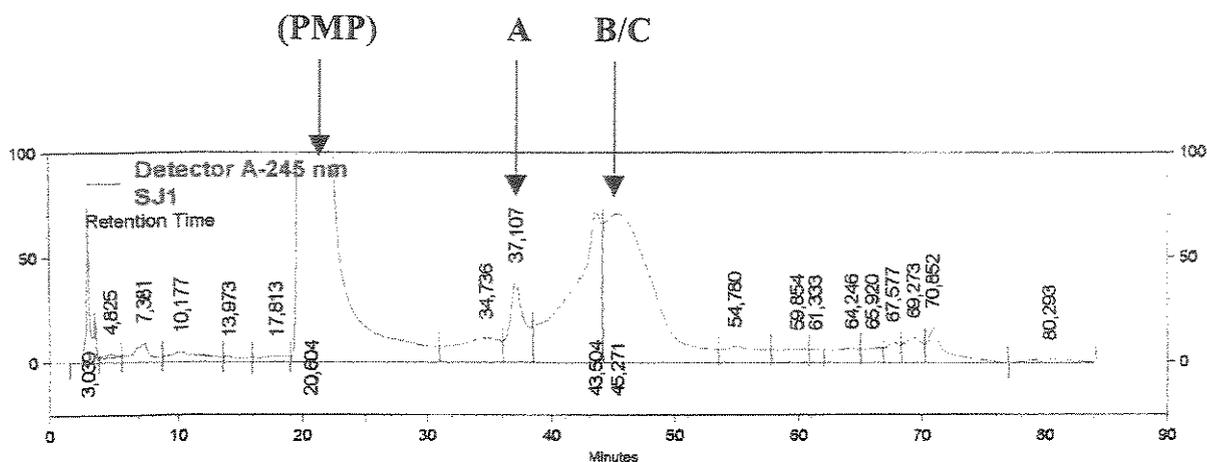


Figura 20. Separação por HPLC dos monossacarídeos neutros e aminos PMP-tratados da fosfatase ácida de sementes de soja. A enzima (100 µg) foi hidrolisada com 4 mol/L de TFA a 121°C por 2h. Após secagem, tratada com PMP e analisada por HPLC como descrito em métodos 3.2.6. O fluxo de corrida e o volume aplicado de amostra foram os mesmos que aqueles utilizados no caso dos padrões.

Tabela 3. Análise da composição total de monossacarídeos de glicoproteínas*

Glicoproteína	Monossacarídeos
RNase B de pâncreas bovino	Manose e glicosamina.
Fetuína bovina	Manose, glicosamina, galactose e galactosamina.
Tiroglobulina de porco	Manose, glicosamina, galactose e fucose
Serotransferina humana	Manose, glicosamina e galactose

* FU & O'NEILL (1995)

4.9.3 Remoção da fração de carboidratos

Os estudos desta última etapa do projeto foram realizados no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto.

A remoção da fração de carboidratos de uma proteína pode ser feita a partir do tratamento da proteína em questão com uma endoglicosidase específica, sendo que uma das mais utilizadas é a Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo-H). No entanto, é importante salientar que a capacidade da Endo-H hidrolisar os oligossacarídeos de uma determinada proteína depende de numerosos fatores, tais como a estrutura terciária da glicoproteína, a quantidade de Endo-H utilizada, o tempo de incubação e a presença ou ausência de reagentes que afetam a conformação da glicoproteína. Em geral, a remoção da fração de carboidratos é acompanhada por alterações no ponto isoelétrico que levam a alterações de migração no perfil eletroforético (TRIMBLE & MALEY, 1984). Desta maneira, após a digestão da glicoproteína com a endoglicosidase, a melhor evidência de remoção é a alteração de migração no gel. Dependendo da acessibilidade da porção de carboidrato, resultados já são observados após 22 horas de digestão com a Endo-H numa concentração de 50 mU/ml.

A fim de se avaliar o grau de acessibilidade da porção de carboidratos da fosfatase ácida de sementes quiescentes de soja, a enzima foi tratada com Endo-H numa concentração de, inicialmente, 100 mU/ml por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foi feita a coloração do gel para proteína, mostrado na figura 21.



Figura 21 – Eletroforese em condições não desnaturantes para a fosfatase ácida de sementes quiescentes de soja. Em *a*, temos a enzima sem tratamento e em *b*, temos a enzima tratada com Endo-H na concentração de 100 mU/ml.

Conforme podemos observar, não houve diferença significativa na migração da enzima ao longo do gel. Foi feita também a coloração dos géis para atividade enzimática, não sendo também observada nenhuma alteração na atividade da enzima após a digestão com a Endo-H. Numa etapa seguinte, decidiu-se proceder à digestão utilizando-se a Endo-H em concentrações maiores: 200 mU/ml e 300 mU/ml. A coloração dos géis foi feita para atividade enzimática e os perfis eletroforéticos são mostrados na Figura 22.

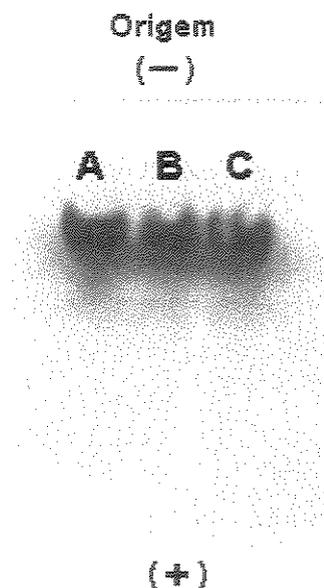


Figura 22 – Eletroforese em condições não desnaturantes para a fosfatase ácida de sementes quiescentes de soja. Em **A**, temos a enzima sem tratamento, em **B**, a enzima foi tratada com Endo-H na concentração de 200 mU/ml e em **C**, o tratamento foi realizado com Endo-H na concentração de 300 mU/ml.

Como podemos comprovar claramente nos géis, não houve alteração no perfil migratório da fosfatase ácida e nem na atividade enzimática, o que demonstra que não houve remoção significativa dos oligossacarídeos da porção de carboidratos.

TRIMBLE & MALEY, após estudos com um grande número de glicoproteínas, verificaram que há três classes fundamentais de glicoproteínas, conforme a susceptibilidade da fração de carboidratos à Endo-H. Os estudos revelaram que, dependendo da glicoproteína, os oligossacarídeos são prontamente susceptíveis à remoção pela Endo-H, como é o caso, por exemplo, da Ribonuclease B bovina e da Desoxirribonuclease A, as quais têm os oligossacarídeos removidos completamente com baixos níveis de Endo-H, sem a necessidade de agentes que interfiram na conformação protéica. Uma classe intermediária, que engloba a Tiroglobulina, apresenta os oligossacarídeos acessíveis apenas com grandes quantidades de Endo-H. Há ainda uma terceira classe de glicoproteínas, na qual se enquadra a

ovoalbumina, cujos oligossacarídeos são considerados “inacessíveis”, ou seja, que não são removidos pela Endo-H a não ser que haja desnaturação por rigorosos tratamentos.

Foi feita ainda uma nova tentativa de remoção utilizando-se outras endoglicosidases como a Endo-F e a Endo-F₁. Desta vez, foi realizada uma Focalização Isoelétrica (IEF) a fim de se acompanhar com maior exatidão a migração da glicoproteína. A Figura 23 mostra o perfil de corrida.

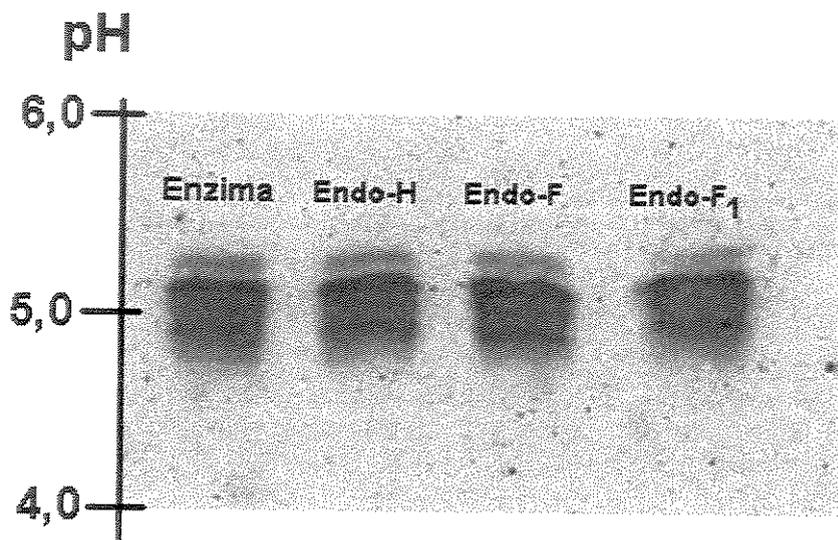


Figura 23 – Focalização Isoelétrica (IEF) para a fosfatase ácida de soja. A enzima foi tratada com 300 mU/ml das endoglicosidases citadas por 24 h a 37 °C e os géis foram corados para atividade enzimática.

Vemos neste caso que há uma heterogeneidade na migração, que pode ser observada mais claramente na eletrofocalização pelo fato de ter sido utilizado um anfólito na faixa de pH entre 4,0 e 6,5. Essa heterogeneidade, como já citado no início do trabalho, é devida à possibilidade de haver formas da fosfatase em diferentes estágios de glicosilação e é observada inclusive em outras fosfatases ácidas, como a proveniente de fluido seminal (VAN ETTEN et al, 1989). No entanto, não ocorreu nenhuma mudança significativa no ponto isoelétrico da

glicoproteína, o que demonstra claramente que a porção de oligossacarídeos da fosfatase ácida de soja não foi removida. Os números relativamente elevados de resíduos de asparagina/aspartato, treonina e serina observados na análise de aminoácidos representam também um forte indício de que a glicosilação ocorre de forma bastante heterogênea ao longo da macromolécula o que poderia dificultar a ação das endoglicosidases sobre os oligossacarídeos totais da fosfatase.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conforme se pode perceber, este trabalho de tese trouxe resultados relevantes que nos permitem conhecer um pouco mais a respeito da estabilidade conformacional da fosfatase ácida de soja. Porém, algumas dificuldades foram encontradas ao longo da execução do projeto, tais como a padronização dos experimentos que foi feita com bastante critério e cuidado, o que exigiu bastante tempo mas foi recompensador pela qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

Além disso, o trabalho foi extremamente enriquecedor pois permitiu contato com vários grupos de pesquisa que trabalham com diferentes linhas, além da participação em reuniões científicas que são de suma importância para a formação integral do pesquisador. As diferentes abordagens tomadas ao longo do trabalho que vão desde as técnicas aprendidas ao longo da purificação enzimática aos cálculos físico-químicos executados também foram muito interessantes no que tange à multidisciplinaridade essencial à formação de um profissional crítico.

O presente trabalho abre também perspectivas interessantes, principalmente para o estudo de remoção da fração de carboidratos. Tendo em vista o tempo relativamente pequeno reservado para este estudo, os resultados obtidos demonstraram a necessidade de se tentar novas endoglicosidases em diferentes condições de tratamento, a fim de se padronizar a remoção significativa dos oligossacarídeos, o que certamente irá trazer informações muito relevantes com relação ao papel da fração de açúcares na estabilidade conformacional e, conseqüentemente, na atividade da enzima.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASHA, S.M. (1984). Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed, *Can. J. Bot.*, **62**, 385-91.
- BHARGAVA, R. & SACHAR, R.C. (1987). Induction of acid phosphatase in cotton seedlings enzyme purification, subunit structure and kinetic properties, *Phytochemistry*, **26**, 1293-1297.
- BISWAS, T.K. & CUNDIFF, C. (1991). Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinenses*, *Phytochemistry*, **30**, 2119-2125.
- BONAFE, C.F.S., VITAL, C.M.R., TELLES, R.C.B., GONÇALVES, M.C., MATSUURA, M.S.A., PESSINE, F.B.T., FREITAS, D.R.C. & VEGA, J. (1998). Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature, *Biochemistry*, **37**, 11097-11105.
- CHEN, Q. -X., ZHANG, R.-Q., YANG, P.-Z., LI, Y., CHEN, S.-L., LI, S., YANG, Y. & ZHOU, H.-M. (1999). Effect of ethanol on the activity and conformation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 103-107.
- CHEN, S.-L., CHEN, Q.-X., YANG, P.-Z., QIU, W.-J., WANG, L.-T. & ZHOU, H.-M. (1997). Unfolding and inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during denaturation by guanidine hydrochloride, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 517-526.
- CHUNG, R. P-T. & POLYA, G. M. (1992). Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities, *Plant Sci.*, **84**, 153-162.
- DE-KUNDU, P. & BANERJEE, A.C. (1990). Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *Vigna radiata*, *Phytochemistry*, **29**, 2825-2828.
- DEWALD D. B., MASON H. S. & MULLET J. E. (1992). The soybean vegetative storage proteins VSP α and VSP β are acid phosphatases active on polyphosphates, *J. Biol. Chem.*, **267**, 15958-15964.
- DISHE, R. G. (1954). Carbohydrates analysis *J. Biol. Chem.* **42**, 180-187.

- DUFF, S. M. G., SARATH, G. & PLAXTON, W. C. (1994). Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase *Physiol. Plant.*, **90**, 791-800.
- FERREIRA, C. V. (1995). Purificação e caracterização das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes, *Tese de Mestrado*, Instituto de Biologia/UNICAMP.
- FERREIRA, C. V. (1999). Caracterização cinética e físico-química de fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja, *Tese de Doutorado*, Instituto de Biologia/UNICAMP.
- FERREIRA, C.V., GRANJEIRO, J.M., TAGA, E.M. & AOYAMA, H. (1998 a). Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 282-286.
- FERREIRA, C.V., GRANJEIRO, J.M., TAGA, E.M. & AOYAMA, H. (1998 b). Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases, *Plant Physiol. Biochem.*, **36**, 487-494.
- FERREIRA, C.V., TAGA, E.M. & AOYAMA, H. (1999). Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms, *Plant Sci*, **147**, 49-54.
- FERREIRA, C.V., TAGA, E.M. and AOYAMA, H. (2000). Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*Glycine Max*) seeds *J. Enz. Inhib.* **15**, 403-410.
- FERSHT, A. R., MARTÍNEZ, J.C., HARROUS, M.E., FILIMONOV, V.V. & MATEO, P.L. (1994). A calorimetric study of the thermal stability of barnase and its interaction with 3'GPM, *Biochemistry* **33**, 3919-3926.
- FU, D. & O'NEILL, R. A. (1995). Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **227**, 377-384.
- GRANJEIRO, P.A., FERREIRA, C.V., GRANJEIRO, J.M., TAGA, E.M. & AOYAMA, H. (1999). Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Physiol. Plant.*, **107**, 151-158.

- KANEKO, T. S., KIKUTE, R. & KUBOTA, K. (1990). Purification and properties of native cell wall acid phosphatase from cultured tobacco cells, *Phytochemistry*, **29**, 2883-2887.
- KLAPPER, M.H. (1977). The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1018-1024.
- KOSTREWA, D., WYSS, M., D'ARCY, A. & VAN LOON, A.P.G.M. (1999). Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **288**, 965-974.
- KRUZEL, M. & MORAWIECKA, B. (1982). Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Purification, properties, sugar and amino acid composition, *Acta Biochim. Polon.*, **29**, 321-330.
- LEBANSKY, B. R., MCKNIGHT, T. D. & GRIFFING, L. R. (1992). Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures, *Plant Physiol.*, **99**, 391-395.
- LEE, R.B. (1988). Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells, *New Phytol.*, **109**, 141-148.
- LOWRY O. H. & LOPEZ J. A. (1945). The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters, *J. Biol. Chem.*, **162**, 421-424.
- LYUBAREV, A.E., KURGANOV, B.I., ORLOV, V.N & ZHOU, H. (1999). Two-state irreversible thermal denaturation of muscle creatine kinase, *Biophys. Chem.*, **79**, 199-204.
- MIERNYK, J.A., (1992). Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures, *Phytochemistry*, **31**, 2613-2616.
- NÄSI, M., PIIRONEN, J. & PARTANEN, K. (1999). Efficacy of *Trichoderma reesei* phytase and acid phosphatase activity ratios in phytate phosphorus degradation in vitro and pigs fed maize-soybean meal or barley-soybean meal diets, *Animal Feed Sci Technol.*, **77**, 125-137.

- NINOMIYA, Y., UEKI, K. & SATO, S. (1977). Chromatographic separation of extracellular acid phosphatase of tobacco cells cultured under Pi-supplied and omitted conditions, *Plant Cell Physiol.*, **18**, 413-420.
- OSTROWSKI, W.S., KUCIEL, R. & MAZURKIEWICZ, A. (1996). The folding intermediate of reversibly denatured human prostatic acid phosphatase, *Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 167-175.
- PACE, C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Meth. Enzymol.*, **131**, 266-280.
- PASQUALINI, S., PANARA, F., BRACARDI, P. & ANTONIELLI, M. (1992). High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles, *Phytochemistry*, **31**, 3703-3706.
- PLAXTON, W.C. (1996). Plant metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 185-214.
- PRIVALOV, P.L. & MAKHATADZE, G.I. (1992). Protein Interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study, *J. Mol. Biol.*, **226**, 491-505.
- PRIVALOV, P.L. (1979). Stability of Proteins, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241.
- RAMPONI, G., PAOLI, P., TADDEI, N., FIASCHI, T., VEGGI, D., CAMICI, G., MANAO, G., RAUGEL, G., CHITI, F. (1999). The contribution of acidic residues to the conformational stability of common-type acylphosphatase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **363** (2), 349-355.
- RENGASAMY, A.; SELVAM, R. & GNANAM, A. (1981). Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes of *Sorghum vulgare*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 230-236.
- RODRIGUEZ, E., HAN, Y. & LEI, X.G. (1999). Cloning, sequencing and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (α ppA2) isolated from pig colon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 117-123.
- ROSSI, A., PALMA, M. S., LEONE, F. A. & BRIGLIADOR, M. A. (1981). Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds, *Phytochemistry*, **20**, 1823-1826.

- SCHENK, G., GE, Y., CARRINGTON, L.E., WYNNE, C.J., SEARLE, I.R., CARROLL, B.J., HAMILTON, S. & DE JERSEY, J. (1999). Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean, *Arch. Biochem. Biophys.*, **370** (2), 183-189.
- SCHENK, G., GUDDAT, L.W., GE, Y., CARRINGTON, L.E., HUME, D.A., HAMILTON, S. & DE JERSEY, J. (2000). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants, *Gene*, **250**, 117-125.
- SUGIURA, Y., KAWABE, H., TANAKA, H. FUJIMOTO, S. & OHARA, A. (1981). Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese (III)-containing acid phosphatase, *J. Biol. Chem.* **256**, 10664-10670.
- TADANO, T., OZAWA, K., SAKAI, H., OSAKI, M. & MATSUI, H. (1993). Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots, *Plant and Soil*, **95**, 95-98.
- THEODOROU, M. E. & PLAXTON, W. C. (1993). Metabolic adaptations of respiration to nutritional phosphate deprivation, *Plant Physiol*, **101**, 339-344.
- TRIMBLE, R.B. & MALEY, F. (1984). Optimizing hydrolysis of *n*-linked high-mannose oligosaccharides by endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H¹, *Anal. Biochem.*, **141**, 515-522.
- ULLAH, A.H.J. & GIBSON D.M (1988). Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 514-520.
- VAN ETTEN, R., MORRIS, M.F., WAHEED, A. & RISLEY, J.M. (1989). Carbohydrate removal fails to eliminate the heterogeneity of human prostatic acid phosphatase. *Clin. Chim. Acta*, **182**, 9-20.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.