

**CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS  
FOSFATASES ÁCIDAS DAS SEMENTES DE SOJA  
QUIESCENTES**

**Tese de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica do  
Instituto de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida por ( ) candidato a)  
Carmen Veríssima  
Ferreira 19  
e aprovada pela Comissão Julgadora. 07  
95

**ORIENTADOR**  
**Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA**  
**Depto de Bioquímica**  
**UNICAMP.**

*Hiroschi Aoyama*

**CAMPINAS - SP**

**1995**

U.M. 00076799-3

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	F413p		
V	Ex.		
PLANO	8.1.25660		
PROC.	433/95		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	28/09/95		
N.º CPD			

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

F413p

Ferreira, Carmen Veríssima

Purificação e caracterização das fosfatases ácidas das  
sementes de soja quiescentes / Carmen Veríssima Ferreira.  
-- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

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

1. Fosfatase ácida. 2. Soja. 3. Purificação. 4. Cinética  
de enzimas. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Aos meus pais, por terem dado a oportunidade e estímulo para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Wander, Amauri, Adriana, Nilza, Anderson, Andréia, Kátia e Luana, pela grande amizade;

À Patrícia, pela amizade e agradável convivência.

Dedico este trabalho.

## **Agradecimentos**

Ao prof. Hiroshi Aoyama, pela orientação e pela liberdade dada para a execução deste trabalho. Agradeço também pela amizade e exemplo de profissionalismo.

Ao prof. Eulázio M. Taga, pela orientação na parte de purificação e pela ótima receptividade em seu laboratório.

Aos professores, Ladaslav Sodek, Lúcia Pereira da Silva e Sérgio Marangoni, pelas correções desta tese e demais professores do Departamento de Bioquímica.

Ao professor Ieso Miranda Castro, pelo incentivo inicial, o qual foi de fundamental importância.

À Cíntia, Marilena, André e Márcio, pelo companheirismo.

Ao Mauro, pela grande ajuda no período inicial e pelas horas gastas em discussões de resultados e trabalhos.

À Ângela, pela amizade e estímulo constante.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da FOB/USP, Thelma, Ovídio, Gilmar e Vera, pela agradável convivência.

À Andréia, Marina e Mírian pelo auxílio na secretaria e demais funcionários.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À FAEP/UNICAMP, FAPESP E CNPq, pelo apoio financeiro para a compra de material permanente e de consumo.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mecanismos de reação	1
1.2. Distribuição da Fosfatases Ácidas	3
1.3. Localização celular das Fosfatases Ácidas de plantas	5
1.4. Características gerais das Fosfatases Ácidas de plantas	6
1.5. Importância do estudo das Fosfatases Ácidas de plantas	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material	14
3.2. Métodos	15
3.2.1. Determinação da atividade enzimática	15
3.2.2. Determinação de proteína	16
3.2.3. Concentração da solução protéica	17
3.2.4. Tratamento das resinas	17
3.2.5. Purificação	17
3.2.5.1. Obtenção do extrato	17
3.2.5.2. Precipitação com sulfato de amônio (90%)	18
3.2.5.3. Precipitação cetônica (1:1)	18
3.2.5.4. Cromatografia em SP-sephadex	18
3.2.5.5. Purificação da fração AP1	19

3.2.5.6. Purificação da fração AP2	20
3.2.5.7. Purificação das frações AP3A e AP3B	21
3.2.6. Armazenamento da enzima	21
3.2.7. Determinação da massa molecular	21
3.2.7.1. Através de filtração em gel	21
3.2.7.2. Através de eletroforese em SDS-PAGE	22
3.2.8. Estudos Eletroforéticos	22
3.2.9. Estudos cinéticos	23
3.2.9.1. Efeito do tempo de incubação	24
3.2.9.2. Efeito da concentração da enzima	24
3.2.9.3. Efeito do pH na atividade das frações	24
3.2.9.4. Estudo da especificidade	24
3.2.9.5. Determinação de $K_m$ e $V_{máx}$	24
3.2.9.6. Efeito de compostos na atividade das 4 frações	25
3.2.9.7. Efeito da concentração de NaCl na atividade das frações	25
3.2.9.8. Efeito da temperatura na atividade das frações	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Purificação	26
4.1.1. Obtenção do extrato	28
4.1.2. Precipitação com sulfato de amônio (90%)	28
4.1.3. Precipitação cetônica (1:1)	30
4.1.4. Cromatografia em SP-Sephadex	30
4.1.5. Purificação da fração AP1	32
4.1.6. Purificação da fração AP2	38
4.1.7. Purificação das frações AP3A e AP3B	45
4.2. Determinação da massa molecular	51
4.2.1. Através de filtração em gel	51
4.2.2. Através de eletroforese PAGE-SDS	51
4.3. Estudos Eletroforéticos	58
4.3.1. Eletroforese em condições não desnaturantes	58
4.3.2. Eletroforese em condições desnaturantes (coloração para carboidrato)	62

4.4. Estudos Cinéticos	65
4.4.1. Efeito do tempo de incubação	65
4.4.2. Efeito da concentração da enzima	65
4.4.3. Efeito do pH	65
4.4.4. Estudo da especificidade por substrato	69
4.4.5. Determinação de $K_m$ e $V_{máx}$ .	69
4.4.6. Efeito da temperatura na atividade das frações	72
4.4.7. Inativação térmica das fosfatases	73
4.4.8. Efeito de íons metálicos	77
4.4.9. Efeito da concentração de NaCl	77
4.4.10. Efeito de potenciais inibidores	78
4.4.11. Efeito de compostos na atividade das fosfatases.	83
5. PERSPECTIVAS	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

**ABREVIATURAS**

<b><math>\beta</math>-Naftil-P</b>	$\beta$ -Naftil-Fosfato
<b>A.E.</b>	Atividade Específica
<b>AD</b>	Azul de Dextrano
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>AMP</b>	Adenosina Monofosfato
<b>AP</b>	Fosfatase Ácida
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>ConA-Sepharose</b>	Concanavalina A Sepharose
<b>DEAE-Sephadex</b>	Dietilaminoetil-Sephadex
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E</b>	Enzima
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
<b>E.Pi</b>	Complexo Enzima.Fosfato
<b>FMN</b>	Flavina Mononucleotídeo
<b>GSH</b>	Glutationa Reduzida
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>M<sub>r</sub></b>	Massa Molecular Relativa
<b>p-NPP</b>	p-Nitrofenil Fosfato
<b>Piridoxal-5P</b>	Piridoxal-5-Fosfato
<b>PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
<b>pCMB</b>	p-Cloromercuribenzoato
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>Pi</b>	Fosfato Inorgânico

<b>pI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>PPI</b>	Pirofosfato Inorgânico
<b>PTPP</b>	Fosfotirosina-Proteína Fosfatase
<b>Ser</b>	Serina
<b>SDS</b>	Lauril Sulfato de Sódio
<b>SP-Sephadex</b>	Sulfopropil-Sephadex
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TR</b>	Tempo de Retenção
<b>TRo</b>	Tempo de Retenção do azul de dextrano
<b>Tyr-P</b>	Tirosina-Fosfato
<b>UE</b>	Unidade Enzimática
<b>Vmax</b>	Velocidade Máxima

## RESUMO

Quatro frações contendo atividade fosfatásica ácida (AP1, AP2, AP3A e AP3B) foram detectadas e purificadas a partir do extrato solúvel de sementes de soja quiescentes através da precipitação com sulfato de amônio e acetona e cromatografias de troca iônica, filtração em gel e afinidade. Em coluna de SP-Sephadex a fração AP1 foi eluída com o tampão de equilíbrio (tampão acetato 0,01 M, pH 5,0), enquanto as frações AP2 e AP3 foram eluídas com 0,05 e 0,3 M de fosfato, respectivamente. As frações AP3A e AP3B foram obtidas da fração AP3 aplicada em coluna de DEAE-Sephadex. A atividade enzimática foi determinada utilizando p-NPP como substrato em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, a 37°C. Atividades específicas de 50, 10, 0,84 e 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  foram obtidas para AP1 (purificação de 910 vezes), AP2 (180 vezes), AP3A (16 vezes), e AP3B (36 vezes), respectivamente. Massas moleculares relativas de 51.000, 58.000, 52.000 e 30.000 foram determinadas para AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente, através de filtração em gel na coluna SW 300 (Waters Protein Glass) acoplada a um sistema de LC. Das 4 frações, somente a AP1 se ligou à coluna de conA-Sepharose, embora provavelmente as outras frações também tenham carboidratos em suas estruturas. O perfil de eluição nas cromatografias de troca iônica mostrou que as 4 frações apresentavam pI diferentes.

Após a purificação, foram realizados estudos cinéticos para as 4 frações de fosfatases ácidas. A fração AP1 apresentou uma alta atividade em pH 4,5-6,0, enquanto para as outras frações, a faixa de pH ótimo foi 5,0-6,5. AP1 e AP2 exibiram maior especificidade pelo substrato do que AP3A e AP3B. Os valores de  $K_m$  foram determinados para p-NPP, Tyr-P e PPi, em pH 5,0 a 37°C. As fosfatases ácidas apresentaram os seguintes valores de  $K_m$ : AP1 (p-NPP - 0,49, PPi - 0,51 e Tyr-P - 1,14 mM); AP2 (p-NPP - 0,38, PPi - 1,33 e Tyr-P - 1,14 mM); AP3A (p-NPP - 0,20, PPi - 0,16 e Tyr-P - 0,19 mM) e AP3B (p-NPP - 0,086, PPi - 0,17 e Tyr-P - 0,17 mM). A atividade das 4 frações não foi afetada na presença de EDTA, DTT, GSH e 2-mercaptoetanol. O fosfato, fluoreto, vanadato, molibdato e os cátions  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , inibiram as 4 frações, quando se utilizou o p-NPP como substrato. Ao contrário de outras fosfatases ácidas de planta, as 4 frações apresentaram alta atividade em temperatura acima de 80°C, durante 10 minutos de incubação. No

entanto, quando as mesmas foram pré-incubadas a 80 °C houve perda da atividade após 5 min., indicando portanto que a presença do substrato é importante para a manutenção da atividade nesta temperatura. Nenhuma das frações catalizou a reação de transfosforilação, uma vez que na presença de aceptores de fosfato (glicerol, metanol e etanol) não ocorreu aumento da atividade enzimática. Os resultados obtidos mostram que as 4 frações não apresentaram diferenças significativas em suas propriedades cinéticas.

## SUMMARY

Four fractions of acid phosphatase (AP1, AP2, AP3A, and AP3B) have been detected and purified from soybean seeds soluble extract through ammonium sulfate and acetone precipitations, and ion exchange, gel filtration and concanavalin A-sepharose chromatographies. AP1 was eluted with equilibrium buffer, while AP2 and AP3 were eluted with 0.05 and 0.3 M inorganic phosphate, respectively, from SP-Sephadex column. AP3A and AP3B were the enzymatic fractions originated from AP3 applied on the DEAE-Sephadex column. The enzyme activity was determined using p-nitrophenylphosphate as substrate in 100 mM acetate buffer, pH 5, at 37°C. Specific activity values of 50, 10, 0.84 and 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  were obtained for AP1 (910-fold purification), AP2 (180-fold), AP3A (16-fold), and AP3B (36-fold), respectively. The relative molecular mass of AP1, AP2, AP3A and AP3B were determined by 300 SW Waters Protein Glass column, were found to be 51,000, 58,000, 52,000 and 30,000, respectively. The four acid phosphatase forms purified seemed to be glycoproteins, however, only AP1 could bind to concanavalina A Sepharose. Ion exchange chromatography elution patterns showed that soybean seed acid phosphatases essentially differed in relation to their isoelectric point.

The kinetic properties of the four fractions of soybean seeds acid phosphatases were studied. AP1 presented a high activity at pH 4.5-6.0, while for the other fractions the optimum pH range was 5.0-6.5. AP1 and AP2 exhibited higher substrate specificity than AP3A and AP3B. The  $K_m$  values were determined for p-nitrophenylphosphate, tyrosinephosphate and inorganic pyrophosphate, at pH 5.0 and 37°C. The acid phosphatases presented the following apparent  $K_m$  values: AP1 (pNPP - 0.49, PPi - 0.51 and TyrP - 1.14 mM); AP2 (pNPP - 0.38, PPi - 1.33 and TyrP - 1.14 mM); AP3A (pNPP - 0.20, PPi - 0.16 and TyrP - 0.19 mM) and AP3B (pNPP - 0.086, PPi - 0.17 and TyrP - 0.17 mM). Using pNPP as substrate, no effect was observed in the acid phosphatases activity in the presence of EDTA, dithiothreitol, glutathione and 2-mercaptoethanol. The four fractions were inhibited by inorganic phosphate, fluoride, vanadate, molybdate,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . In contrast to other plant acid phosphatases all the soybean seeds enzymatic forms presented high activities above 80°C, during 10 min incubation. However the enzymes were

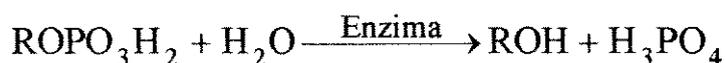
inactivated after 5 min, when pre-incubated at 80 °C in the absence of substrate. The soybean seeds acid phosphatases did not catalyze the transphosphorylation reaction since no stimulation was observed with inorganic phosphate acceptors (glycerol, methanol and ethanol). Our results showed that no significant differences could be observed on the kinetic properties for the four soybean seed acid phosphatase fractions.

## 1. INTRODUÇÃO

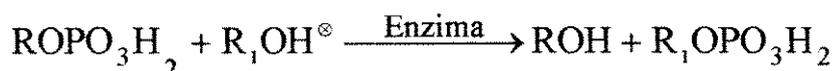
### 1.1. Mecanismos de reação

As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C. 3.1.3.2.) pertencem a uma classe de enzimas que catalizam reações de hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transfosforilação (SAEED et alii, 1990), como esquematizado a seguir:

#### *Hidrólise*



#### *Transfosforilação*



⊗ Aceptor de fosfato

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos (ROCHE, 1931), sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato, com pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase de glóbulos brancos que catalisava esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

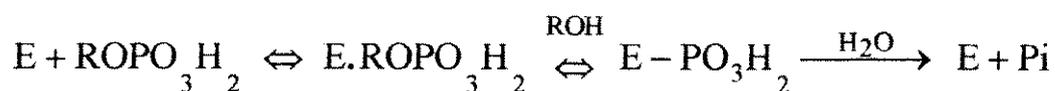
A distinção entre as fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas, inicialmente era baseada somente no pH ótimo para atividade enzimática. Posteriormente, outras características relacionadas com o mecanismo de reação ajudaram a diferenciar estas duas classes de enzimas. NEUMAN (1968) observou que as fosfatases alcalinas além da hidrólise dos substratos usuais, catalisavam também a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosforotióico  $\text{RSPO}_3\text{Na}_2$  do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tio-álcool correspondente. Já as fosfatases ácidas, por sua vez, catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosforotióico do tipo  $\text{ROPO}_2\text{SKH}$ , produzindo o álcool e o tiofosfato. Estes fatos nos permitem visualizar mecanismos de reação diferentes para as duas enzimas, uma vez que a fosfatase ácida requer para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato.

CHAIMOVICH & NOME (1970) observaram a insensibilidade das fosfatases ácidas à presença de cátions mono e divalentes no meio de reação, ao contrário das fosfatases alcalinas que requerem metais, principalmente o  $Mg^{2+}$ , para sua atividade (REID & WILSON, 1971). VICENT et alii (1992) propuseram outra diferença para estas duas classes de enzimas, sugerindo suas vias catalíticas:

### Fosfatase Alcalina



### Fosfatase Ácida



No caso da fosfatase alcalina, em pH acima de 7, o complexo E.Pi é limitante da velocidade e a espécie  $E-PO_3^{2-}$  contém um grupo fosfoserina que é lábil em meio básico e estável em meio ácido, característica apropriada para esta fosfatase. No entanto para a fosfatase ácida, o complexo E.Pi não foi possível ser observado, mas provavelmente o mesmo possa ser um intermediário, uma vez que o Pi atua como um inibidor competitivo da reação enzimática. Para a fosfatase ácida de alta massa molecular (vide adiante a classificação) da próstata e germen de trigo estes autores sugeriram que o intermediário ( $E-PO_3H_2$ ) da reação seria a fosfohistidina, que é lábil em meio ácido. Para a fosfatase ácida de baixa massa molecular, embora estudos de modificação química e dependência do pH indiquem que este intermediário também seria a fosfohistidina, relatos na literatura mostram que os grupos sulfidrilas apresentam um papel essencial na catálise, pois estas fosfatases são fortemente inibidas por reagentes que se ligam à estes grupos (LAIDLER et alii, 1982).

## 1.2. Distribuição das Fosfatases Ácidas

A distribuição das fosfatases ácidas na natureza é ampla. Vários aspectos destas enzimas foram estudados em microorganismos (LOVELACE et alii, 1986; SCHELL et alii, 1990; GONZÁLEZ et alii, 1993; HAN et alii, 1994). DIBENEDETTO & COZZANI (1975) purificaram e estudaram algumas propriedades da fosfatase ácida de *Schizosaccharomyces pombe* a qual apresentou uma ampla especificidade pelo substrato, uma massa molecular de 383 kDa, sendo que 66% desta massa correspondia a carboidrato. As propriedades cinéticas desta fosfatase foram similares às de outras leveduras. No entanto, a enzima desta levedura apresentou um pH ótimo menor (3,0), e uma atividade específica 5 a 6 vezes maior que a fosfatase de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta diferença na atividade específica da mesma enzima de espécies proximamente relacionadas pode indicar mecanismos de regulação diferentes ou a existência de múltiplas formas enzimáticas com diferente eficiência catalítica. REMALEY et alii (1984) purificaram uma fosfatase ácida resistente ao tartarato, localizada na superfície externa de promastigotas da *Leishmania donovani* capaz de impedir a produção de ânion superóxido por neutrófilos humano; isto não foi observado quando a enzima era inativada pelo calor ou quando adicionado inibidor ao meio de pré-incubação, indicando que este efeito é dependente da atividade catalítica da enzima. Estes resultados sugerem um possível papel patofisiológico para a fosfatase ácida de promastigotas deste microorganismo e oferece uma possível explicação de como o parasito intracelular escapa dos mecanismos de inativação do mesmo, pela célula hospedeira. Comumente a expressão da fosfatase ácida em microorganismos é controlada por fatores ambientais. Dificilmente é sintetizada na fase de crescimento exponencial mas sim na fase estacionária, sugerindo que sua síntese ocorreria em resposta à limitação de algum nutriente. A privação do fosfato inorgânico extracelular ou a anaerobiose geralmente causam a imediata síntese da enzima (DASSA et alii, 1982).

Os tecidos animais contêm ao menos três tipos de fosfatases ácidas com uma distribuição extremamente variada, podendo ser encontrados em secreções como saliva, sémen, e em diversos tecidos tais como: próstata, placenta, testículo, cérebro, fígado, coração, baço, glândulas salivares, osso, dente, gengiva, nervos e glânglios nervosos. No sangue esta enzima pode ser detectada tanto nos eritrócitos, leucócitos como no plasma, onde algumas vezes é utilizada como meio de diagnóstico para

algumas doenças (para revisão, TAGA, 1979). As fosfatases ácidas de tecidos animais podem ser distintas quanto à massa molecular, localização no interior da célula, especificidade quanto ao substrato e sensibilidade a inibidores. As fosfatases ácidas de alta massa molecular relativa, maior que 100.000, estão geralmente localizadas na fração lisossomal e microsomal das células (DIPIETRO & ZENGERLE, 1967; BECK et alii, 1986). As fosfatases ácidas de baixa massa molecular, menor que 20.000, juntamente com as de massa molecular intermediária, em torno de 40.000, são encontradas no citossol (De ARAÚJO et alii, 1976; HELWING et alii, 1977; GALKA et alii, 1980; FUJIMOTO et alii, 1984). Além de diferir quanto à massa molecular, as formas de alta massa molecular são fortemente inibidas por tartarato e fluoreto (SHIBKO & TAPPEL, 1963; DI PIETRO & ZENGERLE, 1967), enquanto as de baixa massa são relativamente insensíveis a estes inibidores e sensíveis ao pCMB, composto que se liga especificamente a grupos -SH livres (TAGA, 1982). As fosfatases ácidas de massa intermediária são pouco sensíveis ao tartarato, pCMB e íons metálicos (HAYMAN, 1989). Quanto à especificidade pelo substrato, as fosfatases ácidas de baixa massa molecular são altamente específicas, enquanto as de massa molecular alta e intermediária hidrolisam uma ampla variedade de compostos fosforilados (SAEED, 1990). Estas duas últimas podem ainda apresentar ligados à sua estrutura metais como ferro, magnésio e manganês.

Similarmente, esta ampla distribuição também ocorre no reino vegetal onde a fosfatase ácida é detectada em plantas superiores (BOROUGHES, 1954), folhas de trigo (ROBERTS, 1956), tabaco (SHAW, 1966), milho (SLACK et alii, 1969), tubérculo de batata doce (UEHARA et alii, 1974), no látex da *Hevea brasiliensis* - seringueira (JACOB & SONTAG, 1974), na membrana tilacóide de *Sorghum vulgare* - sorgo (RENGASAMY et alii, 1981), em escutela de semente de milho em germinação (ROSSI et alii, 1981), em sementes de amendoim (BASHA, 1984), no pólen de *Brassica campestris* (mostarda) e *Lilium regale* (lírio) - (STROTHER et alii, 1985), na camada aleurônica de grãos de arroz (YAMAGATA et alii, 1980) e de cevada (GABARD & JONES, 1986), em sementes de girassol (PARK & VAN ETTEN, 1986), de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987), de soja (ULLAH & GIBSON, 1988,) e coleóptiles da cevada (PASQUALINI et alii, 1992) e em culturas de endosperma de milho (MIERNYK, 1992). A importância do estudo das fosfatases ácidas em plantas decorre principalmente da sua possível participação no

metabolismo do fósforo, o qual é importante para o crescimento normal e para o desenvolvimento dos órgãos das plantas (BASHA, 1984).

### 1.3. Localização celular das Fosfatases Ácidas de plantas

As fosfatases ácidas de plantas podem ser encontradas na parte intracelular e extracelular. Na segunda, podem estar localizadas na parte externa da parede celular e/ou ser secretadas pela raiz e por células em cultura (UEKI & SATO, 1977; KANEKO et alii., 1990; LEFEBVRE et alii., 1990; DUFF et alii., 1991; LEBANSKY et alii., 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. Neste caso, identificou-se em laboratório, que certos ésteres fosfatos (inositol hexafosfato, inosina monofosfato e glicerofosfato) seriam fontes efetivas de fosfato para o crescimento do trigo, arroz, rabanete (LEE, 1988). NINOMIYA et alii (1977) isolaram a partir da cultura de célula do tabaco uma fosfatase ácida extracelular que teve sua atividade aumentada quando cultivada em meio sem fosfato. Uma fosfatase ácida de cultura de células da folha de *Brassica nigra* (couve-flor) foi purificada por DUFF et alii (1989), a qual apresentou uma alta atividade para o p-NPP, ADP, ATP, PEP e atividade moderada para vários outros fosfatos orgânicos; devido à alta afinidade pelo PEP, estes autores a classificaram como uma fosfoenolpiruvato fosfatase. Este resultado fez com que estes autores sugerissem uma possível participação desta enzima em via de desvio da reação catalisada pela piruvato quinase dependente de ADP em período extenso de privação do fosfato. Já a enzima intracelular parece ser ubíqua, uma vez que tem sido encontrada em sementes dormentes (CHING et alii., 1987; CHUNG & POLYA, 1992) e em germinação (NISHIMURA & BEEVERS, 1978; HARAGUCHI, 1990), folhas (DEO LEO & SACHER, 1970; RANDALL & TOLBERT, 1971), caules, raízes (PANARA, PASQUALINI & ANTONIELLI, 1990), tubérculos de estocagem (SUGIURA et alii., 1981; GELLATLY et alii., 1993), flores, frutos (HSU et alii., 1966; KANELIS et alii., 1989) e culturas de células (PAUL & WILLIAMSON, 1987; VOGELI-LANGE et alii., 1989; DUFF et alii., 1994). Das raízes de trigo HASEGAWA et alii. (1976) conseguiram isolar e caracterizar parcialmente três fosfatases citoplasmáticas (AP-1 - 64.000; AP-2 - 52.000; AP-3 - 28.000) e duas ligadas à parede celular (AP-4

- 62.000; AP-5 - 30.000). As fosfatases ligadas à membrana somente foram extraídas, em parte, após a incubação com NaCl. Estas fosfatases foram separadas por filtração em gel e cromatografia de troca-iônica; as quais apresentaram atividade máxima numa faixa de pH 4,7-5,0 e tiveram ampla especificidade pelo substrato, as quais apresentaram maior atividade para o ADP e ATP. Esta ampla especificidade poderia sugerir que possivelmente estas fosfatases seriam importantes para fornecer fosfato para a planta a partir de fosfatos orgânicos presentes no solo. Inibição da atividade enzimática foi observada para metais como:  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ . A alta extratibilidade pelo NaCl e sensibilidade por alguns cátions, sugere também que a atividade e liberação destas fosfatases poderiam ser reguladas pelos níveis de alguns cátions no solo.

A localização citoquímica da fosfatase ácida em tecidos vegetais mostrou a presença da enzima na parede celular, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndria e vacúolo (para revisão, GABARD & RUSSEL, 1986 e LEE, 1988).

#### 1.4. Características gerais das Fosfatases Ácidas de plantas

As fosfatases ácidas em plantas têm sido detectadas em formas moleculares múltiplas. PANARA et alii (1990) relataram que das raízes de cevada foi possível separar por uma coluna de filtração em gel 5 picos com atividade fosfatásica; três destas enzimas estavam ligadas à parede celular e as outras duas na porção solúvel. STROTHER et alii (1985) analisaram a composição da fosfatase ácida em duas variedades distintas de pólen. Identificaram uma isoenzima ligada à parede celular e duas solúveis, em cada um dos pólenes estudados. Independentemente da fonte verificaram propriedades similares entre as enzimas localizadas na parede celular e as solúveis. HARAGUCHI et alii (1990) verificaram por uma combinação de colunas de cromatografias e géis de eletroforese que cotilédones de *Vigna mungo* apresentavam pelo menos 6 formas de fosfatases ácidas.

As fosfatases ácidas podem também apresentar diferenças nas propriedades físico-químicas (DUFF et alii, 1994), tais como:

-*Massa molecular relativa* . a massa molecular relativa de fosfatases ácidas de plantas varia amplamente de 30.000 a 300.000: 53.000 para a fosfatase ácida de cotilédones de soja (ULLAH & GIBSON, 1988); 144.000 para a de células de

tabaco em cultura (KANEKO et alii, 1990); 200.000 para a de embriões de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987).

*-Ponto isoelétrico* . geralmente o pI destas fosfatases encontra-se entre 4,3 a 6,7: 4,7 para de proteína de estocagem de hipocotilédones de soja (DEWALD et alii, 1993); 5,8 para a de sementes de trigo em germinação (CHENG & TAO, 1989); 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%). Em função da natureza glicoprotéica das fosfatases ácidas de plantas, não é surpresa sua ligação com lectinas (proteínas que se ligam reversivelmente e especificamente à carboidratos), particularmente abundantes no gérmen de sementes de gramíneas. Esta ligação normalmente altera a atividade hidrolítica da enzima. FERENS & MORAWIECKA (1985) purificaram de gérmen de centeio uma fosfatase ácida que foi ativada cerca de 15 a 55% por várias lectinas de plantas, como aglutinina de gérmen de arroz, de soja, de trigo e concanavalina A. Estes autores relataram o decréscimo da Km e aumento da V<sub>máx</sub>, bem como o aumento da estabilidade térmica das fosfatases ácidas quando em presença de lectinas. Alteração da atividade enzimática também foi relatada por CONRAD & RÜDIGER (1994) para a fosfatase ácida do cogumelo comestível, *Pleurotus ostreatus*. Neste caso praticamente não houve alteração significativa da Km, mas verificou-se um aumento de cerca de 36% da atividade enzimática. Estes resultados sugerem que as lectinas podem ter um papel regulador na atividade destas enzimas.

*-Presença de mais de uma cadeia polipeptídica* . uma fosfatase das sementes de papoula apresentou uma massa molecular relativa de 106.000 por filtração em gel; na eletroforese em condições desnaturantes foram observadas duas bandas de proteínas, de massas moleculares relativas 57.000 e 63.000, respectivamente, mostrando que esta enzima se tratava de um dímero (CHUNG & POLYA, 1992). BASHA (1984) purificou das sementes de amendoim uma fosfatase com massa molecular relativa de 240.000, sendo que a mesma, era composta de 6 subunidades de 42.500. Estes autores não discutiram a diferença das massas moleculares obtidas em condições nativa e na eletroforese SDS-PAGE.

-*Presença de um centro metálico* . SUGIURA et alii (1981) purificaram de tubérculos da batata doce uma fosfatase ácida de cor violeta que apresentou manganês ligado à sua estrutura.

Da mesma maneira que as fosfatases ácidas de mamíferos, as de plantas apresentam um pH ótimo ao redor de 5,0. A temperatura ótima varia de tecido para tecido porém, comumente encontra-se entre 50-60°C. As propriedades cinéticas também variam conforme a fonte e a isoenzima isolada. Parece comum a inibição por metais e fluoretos, a independência de cátions e a inespecificidade para substratos, muito embora haja predileção por ésteres fosfato, açúcares fosfatados, nucleotídeos e pirofosfato (RENGASAMY et alii; 1981; BASHA, 1984; PASQUALINI et alii, 1992). Quanto à inibição por tartarato, FUJISAWA et alii (1993), compararam a inibição da fosfatase ácida do fluido seminal pelo tartarato com fosfatases de tecidos de várias plantas, e observaram que aproximadamente metade das fosfatases de tecidos de plantas superiores incluindo vegetais e frutas testadas, não foi inibida pelo tartarato, ao contrário da fosfatase do cogumelo que apresentou uma inibição significativa quando comparada com a inibição da fosfatase ácida do fluido seminal.

Em comum com muitas outras proteínas de plantas, a regulação dessas enzimas (síntese e atividade) é modulada por uma variedade de fatores de desenvolvimento e ambientais. 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 neste período, sua atividade está sempre aumentada e, algumas vezes, surge outra isoforma ativa. BISWAS & CUNDIFF (1991), purificaram 4 fosfatases ácidas (API, APII, APIII e APIV) das sementes de *Vigna sinensis* com 96 h de germinação. As frações API e APII são proteínas constitutivas, já as frações APIII e APIV, só apareceram depois de 4 a 15 horas de germinação. O aparecimento de novas isoformas durante a germinação, ainda não é entendido; há a hipótese que hormônios como ácido giberélico, ácido abscísico e auxina, importantes na germinação, estejam envolvidos neste processo. GABARD & JONES (1986) mostraram que havia um aumento da atividade de cerca de 3 vezes da fosfatase ácida da camada aleurônica da cevada, quando as mesmas eram embebidas e incubadas por 18 h em tampão contendo 50 µM de ácido giberélico. Outros processos como florescimento, frutificação, senescência também levam a um aumento da atividade fosfatásica (DE LEO & SACHER, 1970; KANELIS et alii., 1989 ). 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 em ferimentos causados à planta (DEWALD et alii, 1992; TADANO, et alii, 1993; THEODOROU & PLAXTON, 1993). PAN (1987) isolou e purificou parcialmente 3 fosfatases das folhas do espinafre, o qual foi cultivado em condições de aumento gradual da força iônica até 300 mM. Das 3 frações, somente uma apresentou um aumento da atividade, quando comparada com as folhas do espinafre cultivado em condições normais. BARRET-LENNARD et alii (1982) mostraram que fosfatases solúveis das folhas de trigo tiveram suas atividades aumentadas, cerca de 6 vezes, quando o trigo foi cultivado em condições de baixas concentrações de fosfato e água.

Paralelamente, outro aspecto de grande importância é o controle de processos metabólicos nas plantas superiores através de modificações pós-tradução, via fosforilação e desfosforilação (TREWAVAS, 1976; LIN & KEY, 1980; BUDDE & CHOLLET, 1988; MacKINTOSH & COHEN, 1989; MacKINTOSH et alii, 1991; CHUNG & POLYA, 1992; ARIÑO et alii, 1993; YUPSANIS et alii, 1993), da mesma forma como o que ocorre em animais (KREBS & BEAVO, 1979; COHEN, 1989).

MacKINTOSH & COHEN (1989) relataram ainda que as técnicas para a identificação e quantificação de proteínas fosfatases em células animais são aplicáveis para as plantas superiores. Apesar destes fatos, poucos relatos existem sobre a atividade Ser/Thr proteína fosfatase em plantas. POLYA & HARITOU (1988), purificaram duas proteínas fosfatases do embrião do trigo, as quais hidrolisaram fosfocaseína e a histona, mas não atuaram sobre a L-Serina-P, L-Treonina-P e L-Tirosina-P. CHENG & TAO, 1989, purificaram até homogeneidade uma fosfatase neutra (fosfotirosil proteína fosfatase) das sementes de trigo em germinação, que catalisou a hidrólise do p-NPP. Esta enzima (glicoproteína) apresentou uma massa molecular relativa de 35.000 e sua atividade não foi afetada por metais e altas concentrações de agentes quelantes. Estes autores relataram que esta enzima é distinta da fosfatase ácida dos gérmenes de trigo, uma vez que esta fosfatase neutra não hidrolisou grupos fosfoseril e fosfotreonil em proteínas. Outro fato importante, é que a enzima apresentou grande similaridade em suas propriedades com fosfotirosil proteínas fosfatases isoladas de várias fontes. A atividade desta fosfotirosil proteína fosfatase foi somente observada na germinação

das sementes do trigo, o que levou estes autores a sugerir que esta enzima seria importante para o crescimento e desenvolvimento do trigo.

Em células de mamíferos, algumas fosfatases ácidas purificadas apresentaram atividade de proteína fosfatase, mais especificamente, fosfotirosina proteína fosfatase (LAU et alii, 1987). A importância das proteínas fosfatases se deve a sua participação nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas podem regular a atividade de outras enzimas por desfosforilação (BUDDE & CHOLLET, 1988). Em plantas algumas fosfatases ácidas têm apresentado atividade proteína fosfatase. YANG et alii (1987) identificaram múltiplas fosfatases ácidas na membrana tilacóide de folhas do trigo e GELLATLY et alii (1993) purificaram uma fosfatase ácida de tubérculos da batata com características de uma proteína tirosina fosfatase.

No que diz respeito à soja, MAYER et alii. (1961) purificaram da farinha de soja uma fosfatase ácida não específica, envolvendo precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica. Esta enzima hidrolisou preferencialmente pirofosfato,  $\beta$ -glicerofosfato e fenilfosfato. Apresentou um pH ótimo de 4,5-6,5 e foi fortemente inibida por fluoreto e zinco. Estes autores sugeriram a presença de pelo menos mais duas fosfatases na farinha de soja, uma fosfoproteína fosfatase que desfosforilou a caseína, e uma fitase que atuou sobre o fitato.

ULLAH & GIBSON (1988) purificaram até a homogeneidade uma fosfatase ácida a partir de cotilédones das sementes da soja em germinação, por uma técnica que envolvia fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica, afinidade e cromatofocalização. A enzima exibiu uma ampla especificidade pelos substratos, apresentando uma alta afinidade pelo p-NPP ( $K_m = 70 \mu M$ ). O pI (6,7) da proteína foi demonstrado por cromatofocalização; a mesma apresentou um pH ótimo de 5,0 e massa molecular relativa de 53.000. Embora a enzima tenha exibido atividade catalítica máxima a 60 °C, estudos de inativação térmica indicaram perda de 100 % da atividade, depois do tratamento a 68 °C por 10 min.

LEBANSK et alii (1992) purificaram e sequenciaram parcialmente uma fosfatase ácida secretada por células da soja em cultura. A enzima era uma metaloproteína, que utilizava como cofator o manganês, apresentou carboidrato na sua estrutura e massa molecular de aproximadamente 130.000 na forma nativa, e 58.000 em condições desnaturantes, tratando-se portanto de um dímero. A enzima

apresentou um  $pI$  de cerca de 5,0, um  $pH$  ótimo próximo à 5,5, atividade específica de 512 UE/ mg de proteína e  $K_m$  de 0,3 mM para o p-NPP.

DEWALD et alii. (1992) demonstraram que proteínas de reserva das sementes de soja (VSP $\alpha$  e VSP $\beta$ ) seriam fosfatases ácidas que poderiam atuar sobre diferentes substratos como  $\beta$ -naftil-fosfato, carboxifenil-fosfato, açúcares fosfatados, gliceraldeído 3-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato, fosfoenolpiruvato ATP, ADP, PPi e polifosfatos de cadeia curta. Essas fosfatases exibiram  $pH$  ótimo em 5,0-5,5, não dependeram de metal para a atividade e foram inibidas por fluoreto e molibdato. Essas glicoproteínas seriam importantes no período de desenvolvimento da soja e em respostas a estímulos externos como deficiência de água e ferimentos.

STASWICK et alii (1994) purificaram uma fosfatase ácida das folhas de soja, que teve sua atividade 10 vezes aumentada depois da remoção das vagens 5 semanas após o florescimento, quando comparada com a atividade da mesma enzima em folhas da soja que tiveram as vagens retiradas na época normal. A enzima foi purificada 2.700 vezes por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica e adsorção, apresentando uma massa molecular relativa de 51.000 e  $pH$  ótimo para atividade em torno de 6.

### **1.5. Importância do estudo das Fosfatases Ácidas de plantas**

Apesar de já conhecido que as fosfatases ácidas de plantas têm participação no metabolismo de fósforo, elemento essencial para o desenvolvimento e crescimento normal dos órgãos da planta, não se sabe realmente a função fisiológica dessas enzimas. A determinação precisa da(s) função(s) *in vivo* para fosfatases de plantas é dificultada pelos seguintes fatores:

- a heterogeneidade das fosfatases ácidas dentro de um dado tipo celular raramente permite a purificação de todas as frações contendo atividade fosfatásica.

- falta de dados cinéticos para substratos não sintéticos para a maioria das fosfatases estudadas.

- muitas fosfatases são induzidas e as condições e mecanismos para esta indução precisam ser completamente entendidos.

Além do citado acima, quando comparado com mamíferos, existem poucos trabalhos na literatura sobre fosfatases ácidas de plantas, o que torna clara a necessidade de purificar e caracterizar as múltiplas formas de fosfatases a partir de diferentes fontes e tecidos de plantas. Desta forma talvez essas fosfatases possam ser agrupadas de acordo com determinadas características (especificidade pelo substrato, inibição, ativação, efeito de cátions) como acontece com as fosfatases de origem animal, o que facilitaria o entendimento da(s) função(s) celular(es) dessa importante classe de enzimas de plantas.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho escolhemos a semente de soja para trabalharmos, pois havia um interesse de purificar e realizar estudos cinéticos em nosso laboratório de fosfatase ácida de outra fonte que não animal, e além disto, na literatura não existe nenhum trabalho descrevendo a purificação de diferentes frações de fosfatases ácidas nas sementes quiescentes de soja, sendo que quando foram utilizados outros tecidos da soja, foi realizada a purificação de somente uma das frações contendo atividade enzimática.

Em vista disto, nos propusemos a realizar a identificação e purificação das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes e em seguida, determinar algumas das suas características cinéticas como:

- $V_{m\acute{a}x}$
- $K_m$
- Especificidade pelo substrato
- Efeito da temperatura
- Efeito do pH
- Efeito de potenciais inibidores e outros compostos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

As sementes de soja quiescentes (*Glycine max* L. Merr.var IAS-5) foram adquiridas no Comercial Agrícola Takaki Ltda, São Paulo.

#### *Reagentes*

Resinas para cromatografia: SP-Sephadex C50-120, DEAE-Sephadex, e ConA Sepharose 4B (Sigma Chemical Co.); Sephacryl-S200 (Pharmacia).

Reagentes para eletroforese: acrilamida, N'-N'-metilenebisacrilamida, TEMED, persulfato de amônio, azul de bromofenol, fucsina básica, coomassie brilliant blue, fast blue BB,  $\beta$ -naftil fosfato (Sigma Chemical Co.), ácido periódico (Merck).

Substratos: p-nitrofenil fosfato,  $\beta$ -naftil fosfato, flavina mononucleotídeo, tirosina fosfato, serina fosfato,  $\beta$ -glicerofosfato,  $\alpha$ -glicerofosfato, AMP, D-glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, ácido-6-fosfoglicurônico, pirofosfato, ácido fítico, frutose-6-fosfato, frutose-1,6 di-fosfato (Sigma Chemical Co.).

Inibidores: molibdato de amônio, fluoreto de sódio, (E. Merck Darmstadt), o-vanadato, m-vanadato, pCMB, piridoxal-5-fosfato, piridoxina-5-fosfato, piridoxamina, fluoreto de sódio, tartarato, fosfato inorgânico (Sigma Chemical Co.).

Reagentes para preparo dos tampões: ácido acético, glicina (E. Merck Darmstadt); imidazol, bis-tris, citrato (Sigma Chemical Co.).

Reagentes redutores de tióis: ditioneitol, glutathiona reduzida, 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.).

Padrões para determinação da massa molecular: para filtração em gel (Pharmacia) e SDS-PAGE (Sigma Chemical Co.).

Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico. Em todos os experimentos foi utilizada água destilada e deionizada.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática

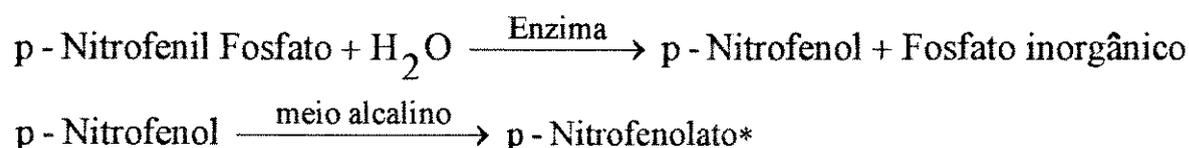
Para a determinação da atividade, a enzima foi diluída em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, a fim de se obter nos dois métodos de ensaio utilizados para a dosagem da atividade enzimática uma absorbância em torno de 0,4. Esta diluição foi realizada imediatamente antes do ensaio, e mantida em gelo.

A atividade enzimática foi determinada por dois métodos, dependendo do substrato utilizado:

#### *a-Dosagem do p-nitrofenol*

A atividade enzimática foi determinada a 37 °C usando p-nitrofenilfosfato 5,0 mM em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0) em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada 10 minutos após a adição da enzima (cerca de 0,08 μmol/min), com 1 ml de hidróxido de sódio 1N. A absorbância foi mensurada a 405 nm. 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 é  $1,83 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  em meio alcalino, o qual absorve em 405 nm.

Na purificação enzimática, a atividade das frações eluídas nas cromatografias foi determinada utilizando-se um tempo de reação de 2 minutos e p-NPP como substrato.

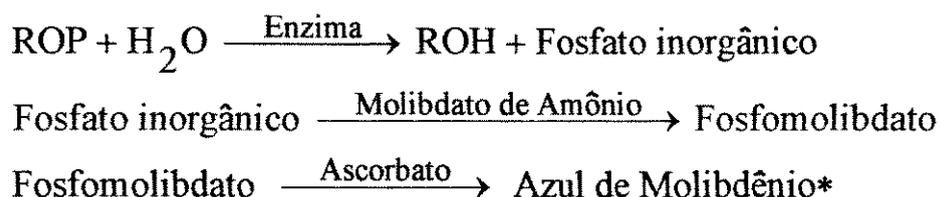


\* Absorve em 405 nm

#### *b-Dosagem do fosfato*

Este método foi utilizado no caso de substratos diferentes do p-NPP, os quais foram utilizados numa concentração final de 5 mM.

A reação procedeu como descrito em (a), exceto que a paralisação da mesma foi feita pela adição de 1 ml de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molibdico foi adquirida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0), como redutor, de acordo com o método descrito por LOWRY & LOPES (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  $4.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .



\* Absorve em 700 nm

### 3.2.2. Determinação de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por HARTREE (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da amostra. Após 10 min, adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin-Ciocalteau (1:1). A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm após 30 min da adição do reagente de Folin-Ciocalteau à temperatura ambiente.

- . Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 N
- . Reagente B -  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% em Citrato de Sódio 1%
- . Reagente C - 1 mL Reagente B + 50 mL Reagente A
- . Reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1:1 em  $\text{H}_2\text{O}$ )

O perfil protéico das amostras eluídas nas colunas foi estabelecido através da leitura direta da absorbância a 280 nm, de acordo com LAYNE (1957).

### **3.2.3. Concentração da solução protéica**

A concentração de soluções contendo mais de 1 mg de proteína por mililitro de solução foi realizada por precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação. A concentração de soluções diluídas das etapas finais da purificação foi realizada por ultrafiltração a pressão positiva de Nitrogênio, em um aparelho AMICON R-402, usando-se membrana do tipo PM-10.

### **3.2.4. Tratamento das resinas**

As resinas de troca iônica (SP-Sephadex e DEAE-Sephadex) e filtração em gel (Sephacryl S-200) foram hidratadas em água, de acordo com FISHER (1969) e, posteriormente, no tampão de equilíbrio.

A resina ConA Sepharose 4B foi equilibrada com tampão acetato 0,1 M pH 5,0.

Antes da montagem das colunas as resinas foram deaeradas.

### **3.2.5. Purificação**

A metodologia utilizada para a purificação das fosfatases ácidas das sementes de soja foi realizada 4 vezes. A metodologia descrita abaixo, trata-se da última preparação realizada.

Todas as etapas que se seguem foram realizadas a 4 °C.

#### **3.2.5.1. Obtenção do extrato**

2.000g das sementes de soja foram deixadas cerca de 12h em aproximadamente 6.000 ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, em câmara fria. Após o entumescimento das sementes, as mesmas foram trituradas em Waring Blendor, utilizando-se o mesmo tampão na proporção de 1:6 (6 mL de tampão/por grama da semente), durante 2 minutos à velocidade máxima; este material foi passado em uma centrífuga doméstica para retirada de material insolúvel. O homogeneizado obtido foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 x g em uma centrífuga refrigerada Sorval RC 2B com rotor GSA. O sobrenadante (porção solúvel) foi coletado por filtração através de 4 camadas de gaze. Este procedimento teve a finalidade de retirar partículas grosseiras e material insolúvel remanescente.

### **3.2.5.2.Precipitação com sulfato de amônio (90%)**

Ao extrato obtido, foi adicionado com agitação sulfato de amônio sólido até 90% de saturação (662g/L). Esta mistura permaneceu em agitação por 12 h. Logo após foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e dialisado contra água deionizada. A diálise foi realizada com trocas sucessivas da água até que não fosse detectado o íon amônio pelo reagente de Nessler na mesma. Após a diálise foi feita uma nova centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado na etapa posterior.

### **3.2.5.3.Precipitação cetônica (1:1)**

Aos 1.940 mL do sobrenadante obtido na etapa anterior, foram adicionados com agitação e aos poucos 1.940 mL de acetona a -20 °C; agitação foi mantida por 5 minutos. Logo após centrifugou-se por 20 minutos a 10.000 x g. O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e dialisado contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. Após a diálise foi feita uma centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado na etapa posterior.

### **3.2.5.4.Cromatografia em SP-sephadex**

A amostra da etapa anterior (285 mL) foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. O fluxo da coluna foi mantido em 165 mL/h e foram coletados 10 mL/tubo. O pico contendo atividade eluído com o tampão de equilíbrio foi denominado fração AP1 e os outros dois, eluídos com tampão fosfato 0,05 M e 0,3 M (gradiente linear descontínuo) foram denominados fração AP2 e fração AP3, respectivamente. Estas 3 frações foram concentradas: AP1 e AP3 por ultrafiltração e AP2 por saturação com sulfato de amônio (método 3.2.3). Entre a saída de um pico de atividade e outro, a coluna foi exaustivamente lavada com o tampão correspondente, até que a absorbância a 280 nm fosse próxima de zero.

A partir desta etapa foram utilizadas as terminologias fração AP1, fração AP2 e fração AP3 para os picos contendo atividade fosfatásica obtidos nos cromatogramas.

### 3.2.5.5. Purificação da fração AP1

#### *a- Cromatografia em ConA Sepharose*

A fração contendo atividade obtida da cromatografia em SP-Sephadex foi concentrada (método 3.2.3) até 13 mL e aplicada a uma coluna de ConA Sepharose 4B (1,8 x 5,6 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0. A coluna foi então exaustivamente lavada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 1 M de NaCl. O fluxo da coluna foi de 60 mL/h, coletando-se 12 mL/tubo. O pico de atividade foi eluído com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 contendo 1 M de NaCl, 1 M de glicose e 0,2 M de  $\alpha$ -Metilmanopiranosídeo. As amostras coletadas que apresentaram atividade foram reunidas e concentradas por ultrafiltração (método 3.2.3).

#### *b- Cromatografia em Sephacryl S-200*

A fração (13 mL) proveniente da cromatografia de ConA-Sepharose foi cuidadosamente aplicada a uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 contendo 0,25 M de NaCl. Após a penetração da amostra no gel a cromatografia foi desenvolvida pela passagem do tampão de equilíbrio com fluxo de 60 mL/h, coletando-se 12 mL/tubo. As amostras eluídas contendo atividade foram reunidas, dialisadas contra tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 e concentradas por ultrafiltração (método 3.2.3).

#### *c- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

A fração (10 mL) obtida na cromatografia de Sephacryl, foi aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex (2,4 x 6,0 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. O fluxo da coluna foi de 165 mL/h e foram coletados 10 mL/tubo. A eluição foi realizada aplicando-se um gradiente linear constituído de 100 mL do tampão de equilíbrio e 100 mL do tampão em questão contendo NaCl 0,3 M. A fração contendo atividade foi dialisada contra tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e concentrada por ultrafiltração.

### 3.2.5.6. Purificação da fração AP2

#### *a- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

A fração (140 mL) obtida da cromatografia em SP-Sephadex, após ser concentrada com sulfato de amônio e dialisada contra tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 foi aplicada a uma coluna de cromatografia em DEAE-Sephadex (3,1 x 14,0 cm), equilibrada com o mesmo tampão da diálise. A atividade foi eluída com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 contendo 0,15 M de NaCl. O fluxo durante a corrida foi de 165 mL/h e foram coletados 10 mL/tubo.

#### *b- Cromatografia em SP-Sephadex*

A fração obtida na etapa anterior foi concentrada com sulfato de amônio e dialisada contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. 83 mL da amostra foram colocados em uma coluna de cromatografia em SP-Sephadex (2,7 x 9,2 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi feita aplicando-se um gradiente linear constituído de 250 mL do tampão de equilíbrio e 250 mL do mesmo tampão contendo 0,3 M de NaCl. O fluxo e o volume coletado/tubo foram os mesmos utilizados no item 3.2.5.4.

#### *c- Cromatografia em Sephacryl S-200*

A fração obtida na etapa anterior foi concentrada por ultrafiltração até 13 mL e aplicada cuidadosamente a uma coluna de Sephacryl S-200. As condições foram as mesmas descritas no item 3.2.5.5.b.

#### *d- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

A fração obtida na cromatografia em Sephacryl S-200 foi concentrada com sulfato de amônio e dialisada contra tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0. Logo após, a mesma (30 mL) foi aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex (2,7 x 9,2 cm); a maior parte da atividade enzimática foi eluída com o tampão de equilíbrio e uma outra pequena parte eluída aplicando-se um gradiente linear constituído de 250 mL de tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0 e 250 mL de tampão fosfato 0,5 M, pH 6,0. As condições de cromatografia foram as mesmas do item 3.2.5.5.c.

### **3.2.5.7. Purificação das frações AP3A e AP3B**

#### *a- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

A fração AP3 obtida na cromatografia em SP-Sephadex foi concentrada por ultrafiltração (método 3.2.3) e dialisada contra tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. Logo após a mesma (132 mL) foi aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex (3,1 x 14,0 cm) e a eluição foi feita com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, contendo 0,15 M de NaCl. Condições da cromatografia foram idênticas às do item 3.2.5.5.c.

#### *b- Cromatografia em SP-Sephadex*

As duas frações contendo atividade enzimática, eluídas na cromatografia em DEAE-Sephadex, foram concentradas por ultrafiltração e dialisadas contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. Ambas frações (AP3A - 62 mL e AP3B - 65 mL) foram aplicadas a colunas de SP-Sephadex 2,7 x 9,2 cm e 2,4 x 6,0 cm, respectivamente. A eluição da AP3B foi feita aplicando-se um gradiente constituído de 200 mL do tampão de equilíbrio e 200 mL do mesmo tampão contendo 0,3 M de NaCl. A eluição da AP3A foi realizada aplicando-se um gradiente constituído de 270 mL do tampão de equilíbrio e 270 mL de tampão fosfato 0,5 M, pH 6,0.

### **3.2.6. Armazenamento da enzima**

Todas as frações após a última cromatografia foram dialisadas contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0, concentradas por ultrafiltração (método 3.2.3) e armazenadas a -20°C, com 50% de glicerol e 10 mM de fosfato.

### **3.2.7. Determinação da massa molecular**

#### **3.2.7.1. Através de filtração em gel**

A massa molecular das frações (AP1, AP2, AP3A e AP3B) foi determinada por filtração em uma coluna SW 300 Waters Protein Glass (8 x 300 mm), acoplada a um sistema de LC, equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 contendo 0,25 M de NaCl. Os seguintes marcadores de massa molecular foram utilizados: Albumina de Soro Bovino (67.000), Ovalbumina (43.000), Quimotripsinogênio (25.000), e Azul de Dextrana (2.000.000).

### 3.2.7.2. Através de eletroforese em SDS-PAGE

A mobilidade eletroforética em condições desnaturantes foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS, de acordo com a técnica de WEBER & OSBORNE (1969). As seguintes proteínas foram utilizadas como padrão: Anidrase Carbônica (29.000), Ovalbumina (43.000), Albumina de Soro Bovino (66.300) e Fosforilase (97.400).

O géis de corrida (10%) e empacotamento (5%) foram preparados em tampão tris-HCl 300 mM (pH 8,8 e 6,8, respectivamente), contendo 1% de SDS e colocados para polimerizar em uma placa de 16 x 14 cm. Os dois compartimentos da cuba foram preenchidos com o tampão de corrida, o qual continha 200 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra (0,5 e 0,25 mg de proteína/mL) e 1 volume do "sample buffer" (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,08% do tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8 e 2 gotas do azul de bromofenol a 0,2%) momentos antes do início da corrida foi adicionado DTT numa concentração final de 0,1 M, logo após esta mistura foi fervida por 1 minuto. A corrida foi realizada à temperatura ambiente, por 5 horas. Durante a corrida da amostra no gel de empacotamento manteve-se uma corrente de 60 mA; no gel de corrida esta corrente foi aumentada para 100 mA. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador da corrida.

A coloração dos géis foi realizada durante toda noite com uma solução contendo 500 mg de "Coomassie Brilliant Blue" em uma mistura de 400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 500 mL de H<sub>2</sub>O. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 100 mL de ácido acético glacial, 400 mL de metanol e 500 mL de água deionizada. Logo após os géis foram fixados com ácido acético a 7%.

### 3.2.8. Estudos Eletroforéticos

#### *Eletroforese em pH 5,0 - Condições Não Desnaturantes*

Foi realizada conforme descrito por REISFELD et alii (1962), utilizando-se uma solução de hidróxido de potássio 50 mM pH 4,0 (pH acertado com ácido acético) no gel de separação (poliacrilamida - 10%). O gel foi colocado para polimerizar em uma placa de 16 x 14 cm, os dois compartimentos da cuba foram preenchidos com tampão  $\beta$ -alanina 35 mM, pH 5,0. Primeiramente foi realizada

uma pré-corrída de 1 hora e logo após foram aplicadas as amostras. A corrída foi realizada na câmara fria durante 9 horas, aplicando-se uma corrente de 100 mA. A fucsina foi utilizada como marcador da corrída.

#### *Eletroforese em pH 8,3 - Condições Não Desnaturantes*

Foi realizada conforme descrito no item 3.2.7.2. sem adicionar agentes desnaturantes.

A coloração para proteína e descoloração do gel foram realizadas como descrito no ítem anterior.

#### *Coloração para detecção de atividade enzimática no gel de eletroforese*

A atividade enzimática foi demonstrada no gel, de acordo com a técnica de GOMES (1978). Após a corrída o gel foi incubado a 37°C em tampão bis- tris (100 mM), pH 6,0, contendo 50 mM de  $\beta$ -naftil fosfato e 1 mg de fast blue BB/mL, até o aparecimento da coloração. Esta variou conforme a concentração de enzima utilizada na corrída. Logo após a coloração o gel foi descorado por lavagens em solução contendo 80 mL de ácido acético e 250 mL de etanol por litro e mantido em ácido acético a 7%.

#### *Coloração para detecção de carboidrato no gel de eletroforese*

A eletroforese foi realizada como descrito no item 3.2.7.2.; a natureza glicoprotéica foi demonstrada de acordo com a técnica descrita por KORN & WRIGHT (1973). Após a corrída o gel foi fixado por 1 hora em ácido tricloroacético 12,5 %, lavado com água deionizada, incubado por 1 hora com ácido periódico a 1% em ácido acético a 3%, lavado toda a noite com água deionizada, incubado por 1 hora com o reagente de Schiff, lavado repetidamente com metabissulfito a 0,5 % e mantido nesta solução.

### **3.2.9. Estudos cinéticos**

Com as frações (AP1, AP2, AP3A e AP3B) purificadas, realizou-se alguns estudos cinéticos, os quais foram feitos em quadruplicatas, sendo que os resultados mostrados foram obtidos a partir das suas médias.

### **3.2.9.1.Efeito do tempo de incubação**

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas no método 3.2.1.a, com exceção do tempo de paralisação da reação que variou de 0 a 60 minutos. Foram utilizadas concentrações de 0,12, 1,0, 6,4 e 4,4  $\mu\text{g}$  para as frações AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente, o que correspondeu a cerca de 0,08  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Para cada tempo foi feito um controle, sendo que neste tubo o hidróxido de sódio foi adicionado antes da adição da enzima.

### **3.2.9.2.Efeito da concentração da enzima**

As concentrações das frações foram variadas até uma concentração em que se obteve uma absorbância a 405 nm confiável. A atividade foi determinada como descrito no método 3.2.1.a.

### **3.2.9.3.Efeito do pH na atividade das frações**

O efeito do pH no meio de ensaio foi realizado em meios de incubação preparados com diferentes valores de pH (2,5-9,0). A atividade foi determinada como descrito em 3.2.1.a, foi feito um controle para cada pH e as concentrações das frações utilizadas foram idênticas às do item 3.2.9.1.

### **3.2.9.4.Estudo da especificidade**

A atividade das frações sobre alguns compostos fosforilados foi determinada dosando o fosfato liberado no meio de reação como descrito no método 3.2.1.b. sendo que a concentração das frações utilizadas foi 4 vezes maior que a usada no item 3.2.9.1. A atividade sobre o p-NPP foi considerada como 100%.

### **3.2.9.5.Determinação de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$**

A determinação da atividade das 4 frações foi realizada variando-se a concentração dos substratos p-NPP, PPi e Tyr-P (0,05-20 mM) de acordo com o método 3.2.1.b. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados pelo gráfico de duplos-recíprocos (LINEWEAVER & BURK, 1934).

### **3.2.9.6.Efeito de compostos na atividade das 4 frações**

A atividade das frações foi determinada na presença de metais, potenciais inibidores e outros compostos. A atividade das mesmas foi determinada de acordo com o método 3.2.1.a, e a atividade na ausência do composto foi considerada como 100%.

### **3.2.9.7.Efeito da concentração de NaCl na atividade das frações**

O efeito da concentração de NaCl foi estudado variando-se a concentração do mesmo de 5-500 mM no meio de reação, utilizando-se p-NPP como substrato. A determinação enzimática foi realizada como descrito no método 3.2.1.a. e a atividade sem NaCl foi considerada como 100%.

### **3.2.9.8.Efeito da temperatura na atividade das frações**

Antes de realizar o estudo do efeito da temperatura na atividade das 4 frações foi verificado o efeito da temperatura sobre o substrato p-NPP. Utilizou-se o p-NPP numa concentração de 5 mM o qual foi incubado em tampão acetato 100 mM, pH 5,0 num volume final de 1 mL, em diferentes temperaturas (0-90 °C) por 10 minutos, logo após foi adicionado NaOH e a absorbância medida a 405 nm.

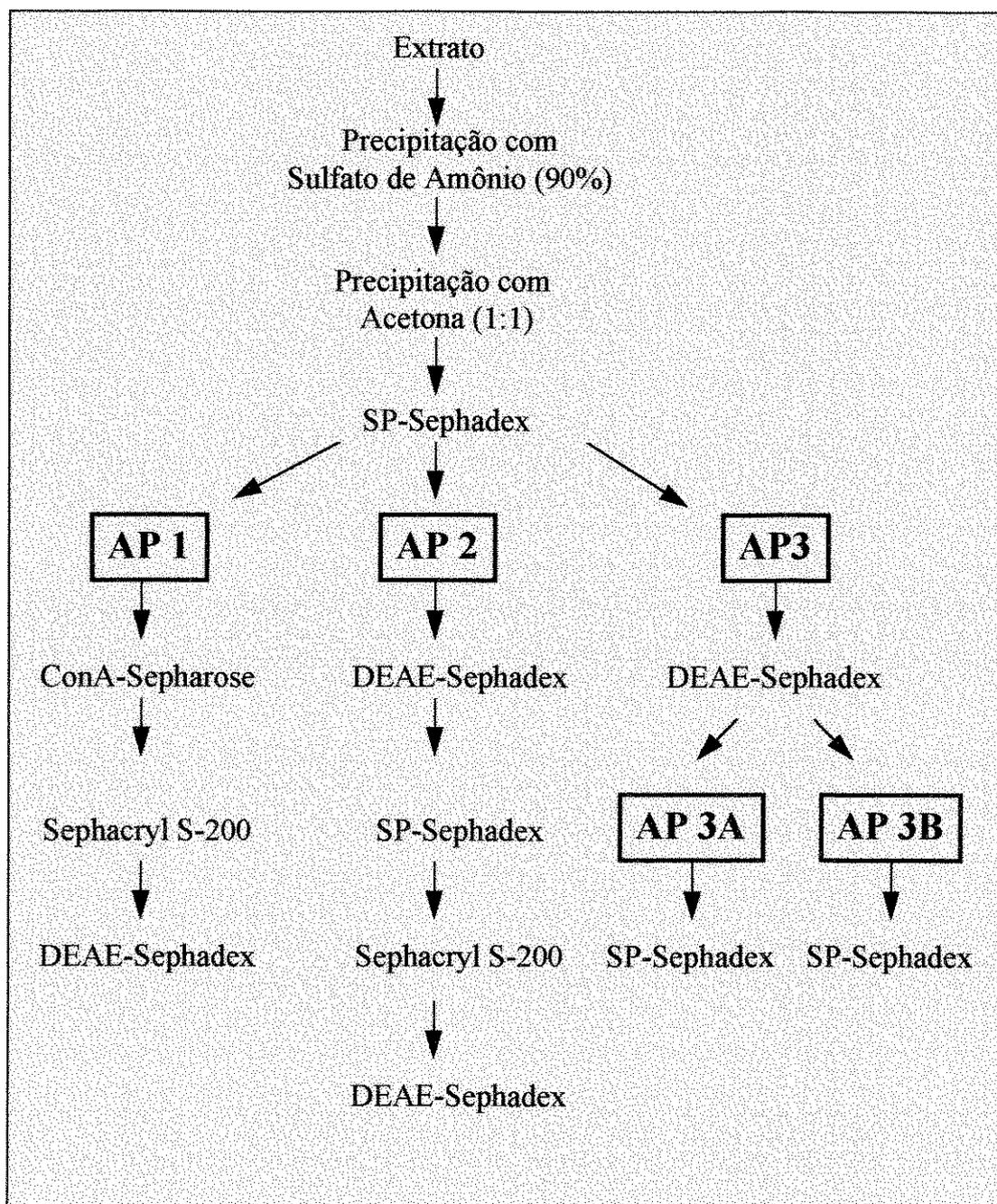
O estudo do efeito da temperatura na atividade das 4 frações foi realizado nas condições descritas no método 3.2.1.a com exceção da temperatura, pois a mesma foi variada de 0-80 °C. Realizou-se um outro experimento em que as frações foram pré-incubadas no tampão de ensaio (acetato 0,1 M, pH 5,0) em diferentes tempos a 80 °C, logo após a atividade foi determinada como descrito no método 3.2.1.a, a 37 °C. A atividade em que a enzima não foi pré-incubada foi considerada como 100%.

\* Nos itens 3.2.9.6-3.2.9.8 foram utilizadas concentrações das frações idênticas às usadas no item 3.2.9.1. a 37 °C.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Purificação

O esquema abaixo mostra as etapas de purificação das fosfatases ácidas das sementes quiescentes de soja.



Desde a identificação da fosfatase ácida por ROCHE, em 1931, um número imenso de trabalhos relatou a purificação de diversas fontes, porém a grande variabilidade de formas enzimáticas com características próprias, impediu a utilização de uma única técnica para sua purificação. Assim, de acordo com a forma enzimática de interesse e a fonte de estudo, lançou-se mão de procedimentos específicos. Para a purificação das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes, foram realizadas previamente 4 preparações a fim de se estabelecer uma metodologia que fosse capaz de fornecer uma boa atividade enzimática, um bom fator de purificação e rendimento. Resinas como fenil-sepharose e hidroxapatita não deram bons resultados.

A partir destas tentativas, estabelecemos uma metodologia que tornou possível isolar e purificar quatro frações de fosfatases ácidas (AP1, AP2, AP3A e AP3B) conforme mostra o esquema. As etapas em comum da purificação dessas 4 frações compreende a obtenção do extrato, precipitações com sulfato de amônio e acetona e cromatografia em SP-Sephadex (Tabela 1). As frações apresentaram no final da purificação atividades específicas de 50, 10, 0,8 e 4 UE/mg de proteína e fator de purificação de 910, 180, 15 e 73 vezes, respectivamente (Tabelas 2, 3 e 4). Estes valores podem parecer baixos quando comparados com os valores da purificação de fosfatases ácidas de origem animal, mas no caso específico de planta, estes resultados foram compatíveis com alguns encontrados na literatura, onde foram utilizadas técnicas convencionais para purificação (veja tabela abaixo).

<b>Fonte</b>	<b>Atividade Específica (UE/mg)</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Referência</b>
figado humano	102	2.616	TAGA & VAN ETTEN, 1982
próstata humana	1.298	68	LIN et alii, 1983
rim bovino	100	1.640	GRANJEIRO, 1994
sementes de amendoim	160	433	BASHA, 1984
endospermas do milho	3	6	MIERNYK, 1992
coleoptiles de cevada	25	57	PASQUALINI et alii, 1992

Obteve-se um rendimento final de 7, 3, 2 e 2% para as frações AP1, AP2, AP3A e AP3B, respectivamente, valores determinados a partir das unidades totais obtidas na primeira etapa da purificação. Estes valores foram significativamente maiores quando determinados a partir da primeira cromatografia em SP-Sephadex, uma vez que até nesta etapa, praticamente realizou-se a obtenção das frações para em seguida purificá-las, pois esta cromatografia nos permitiu uma separação nítida das três frações (AP1, AP2 e AP3), sendo assim, os valores de rendimento foram 44, 20, 13 e 17% (Tabelas 2, 3 e 4). Estes resultados foram bastante repetitivos nas 4 preparações realizadas.

#### **4.1.1. Obtenção do extrato**

As condições ótimas para a obtenção do extrato foram previamente determinadas no laboratório. O extrato (11.500 mL), contendo a enzima solúvel, apresentou 0,606 UE/mL, o que correspondeu a aproximadamente 3 UE/g de semente, com uma atividade específica de 0,054 e uma quantidade de proteína total que equivaleu a 6,4% do total das sementes utilizadas (Tabela 1). Fosfatases ácidas ligadas à parede celular não foram extraídas uma vez que não foi utilizado nenhum reagente como NaCl ou detergente durante a obtenção do extrato.

#### **4.1.2. Precipitação com sulfato de amônio (90%)**

O extrato bruto foi tratado com sulfato de amônio com 90% de saturação para garantir que as frações contendo atividade enzimática pudessem ser precipitadas. Isto foi conseguido, pois, após a centrifugação, somente cerca de 3% da atividade presente no extrato foi detectada no sobrenadante. Nesta etapa houve uma pequena perda da atividade enzimática (cerca de 12%), mas foi possível concentrar a amostra, obtendo-se um volume mais fácil para se trabalhar. Conseguimos eliminar nesta etapa 74% da proteína existente no extrato e a atividade específica passou de 0,054 para 0,183 UE/mg de proteína. Parte desta proteína, sem atividade enzimática, precipitou após diálise contra água deionizada, e foi removida por centrifugação. O fator de purificação nesta fase foi de aproximadamente 3 vezes (Tabela 1). Em preparações anteriores tentou-se realizar fracionamento com sulfato de amônio, mas isto não foi viável pois em todos os casos, grande parte da atividade (cerca de 30%) era perdida.

Tabela 1

**Etapas iniciais da purificação das Fosfatases Ácidas das sementes de soja quiescentes**

<b>Etapa</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>UE Totais</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>A.E. UE/mg</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Extrato Bruto	11.500	6.969	128.108	0,054	1	100
Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (90%)	1.940	6.111	33.297	0,183	3	88
Precipitação Cetônica (1:1)	285	5.386	12.626	0,426	8	77
SP-Sephadex AP1	124	1.128	3.831	0,294	5,4	16
AP2	140	1.015	6.692	0,151	3	15
AP3	132	818	1.496	0,542	10	12

#### 4.1.3. Precipitação cetônica (1:1)

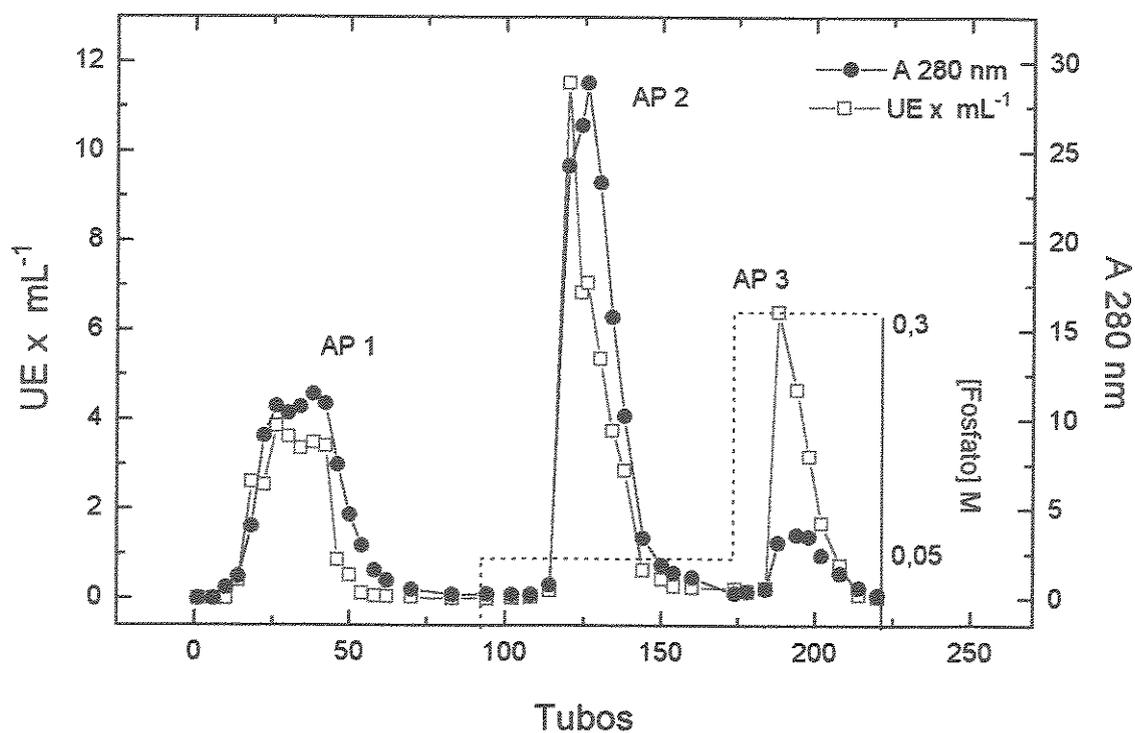
A precipitação cetônica foi de fundamental importância, pois além de ter sido possível concentrar a amostra para que a mesma pudesse ser utilizada em colunas de cromatografias, sem uma grande perda da atividade enzimática, uma grande parte de lipídios presente na amostra foi retirada. A amostra foi purificada 8 vezes, 62% da proteína da fase anterior foi eliminada e a atividade específica passou de 0,183 para 0,426 UE/mg de proteína (Tabela 1). Parte desta proteína contaminante foi eliminada após diálise contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0 e centrifugação. Quando se utilizou etanol em vez da acetona 50% da atividade era perdida.

#### 4.1.4. Cromatografia em SP-Sephadex

Através da cromatografia em SP-Sephadex foi possível separar nitidamente três frações contendo atividade (AP1, AP2 e AP3), coincidentes com três picos de proteína. A fração AP1 foi eluída com o tampão de equilíbrio (tampão acetato 0,01 M, pH 5,0), sugerindo portanto, que o *pI* desta enzima é menor ou igual a 5,0. As frações AP2 e AP3, foram eluídas com tampão fosfato 0,05 e 0,3 M, pH 6,0 (Fig. 1). Normalmente, a eluição de proteínas da coluna de troca iônica é feita pela mudança do pH ou da força iônica. Neste caso, a eluição foi realizada pelo fosfato de acordo com o método descrito por LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981, aproveitando-se a afinidade que o mesmo tem pela enzima, pois o mesmo é um inibidor competitivo clássico das fosfatases ácidas. Isto fez com que as fosfatases presentes na amostra fossem eluídas, possivelmente por alteração da suas cargas líquidas, e conseqüentemente das suas estruturas conformacionais. Este tipo de eluição é importante pois muitas outras proteínas contaminantes ficaram retidas na coluna. Após esta cromatografia, as frações AP1, AP2 e AP3 apresentaram uma atividade específica de 0,294, 0,151 e 0,542 UE/mg de proteína (Tabela 1).

A partir desta etapa a purificação das frações foi realizada separadamente.

\* Para a leitura da absorbância a 280 nm, as amostras foram diluídas quando a absorbância foi maior que 1, sendo assim, os valores expressos nos cromatogramas nas fases de purificação das frações foram obtidos após multiplicação pela diluição. Este tipo de procedimento é utilizado nos trabalhos encontrados na literatura de purificação de fosfatases ácidas (CHAIMOVICH & NOME, 1970; UEHARA et alii, 1974; BASHA, 1984).



**Figura 1 Cromatografia em SP-Sephadex**

A amostra dialisada e centrifugada após a precipitação cetônica contendo cerca de 12.600 mg de proteína foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) equilibrada com tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. O primeiro pico foi eluído com o tampão de equilíbrio e os outros dois com gradiente linear descontínuo (tampão fosfato 0,05 e 0,3 M, pH 6,0), a partir do tubo 87 e 174, respectivamente. Foram coletados 10 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 165 mL/h.

#### 4.1.5. Purificação da fração AP1

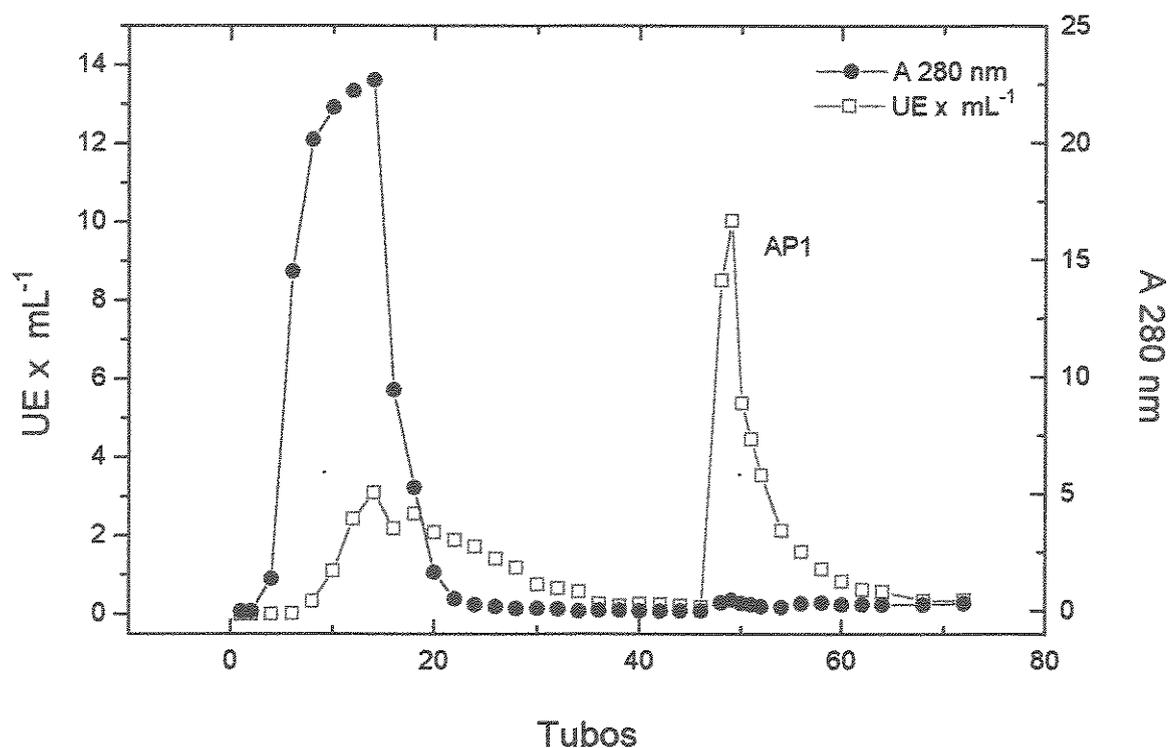
##### *a- Cromatografia em ConA-Sepharose*

Para a fração AP1, diferentemente das frações AP2 e AP3A (veja adiante) não foi realizada cromatografia em DEAE-Sephadex, logo após a primeira cromatografia em SP-Sephadex, pois em preparações anteriores ficou constatado que seria mais viável fazer primeiramente uma cromatografia em ConA-Sepharose, pois conseguíamos obter maior atividade da enzima no final da purificação. Como a fração AP1 se ligou à coluna de ConA-Sepharose, pode-se dizer que esta fosfatase é uma glicoproteína e tem na sua porção de carboidrato, manose ou glicose, uma vez que a concanavalina se liga especificamente a estes açúcares. Esta cromatografia foi muito eficaz pois o fator de purificação passou de 5 para 302 vezes e a atividade específica de 0,294 para 16,424 UE/mg de proteína, nesta etapa (Tabela 2). Pode-se ver no perfil cromatográfico que uma grande quantidade de proteína foi eluída com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 1 M de NaCl. A alta força iônica utilizada, foi para que proteínas ligadas fracamente à coluna fossem eluídas; estas foram eluídas juntamente com um pico de atividade. O pico contendo atividade foi descartado pois provavelmente seria contaminação de uma das outras frações. A fração contendo atividade foi eluída juntamente com uma pequena quantidade de proteína; esta eluição foi realizada com o  $\alpha$ -metilmanopiranosídeo, reagente amplamente utilizado neste tipo de coluna (Fig. 2). A resina de Concanavalina A Sepharose tem sido largamente utilizada na purificação de fosfatases ácidas em geral, pois quando a enzima que está sendo purificada se liga à esta resina normalmente se consegue uma aumento significativo no fator de purificação e da atividade específica (KRUZEL & MORAWIECKA, 1982; PARK & VAN ETEN, 1986; HEFLER & AVERILL, 1987; BHARGAVA & SACHAR, 1987; DUFFet alii, 1989)

Tabela 2  
Purificação da fração AP1

Etapa	Volume (mL)	UE Totais	Proteína Total (mg)	A.E. UE/mg	Purificação (X)	Rendimento (%)
ConA-Sepharose	13	675	41,09	16,424	302	10(60)
Sephacryl S-200	10	650	24,47	26,563	488	9(58)
DEAE-Sephadex	2	500	10,10	49,504	910	7(44)

*Os valores entre parênteses nas tabelas de purificação das frações foram calculados a partir das unidades totais (consideradas como 100% de rendimento) obtidas na cromatografia em SP-Sephadex, etapa em que houve a separação das frações AP1, AP2 e AP3.*



**Figura 2. Cromatografia em ConA-Sepharose 4B (AP1)**

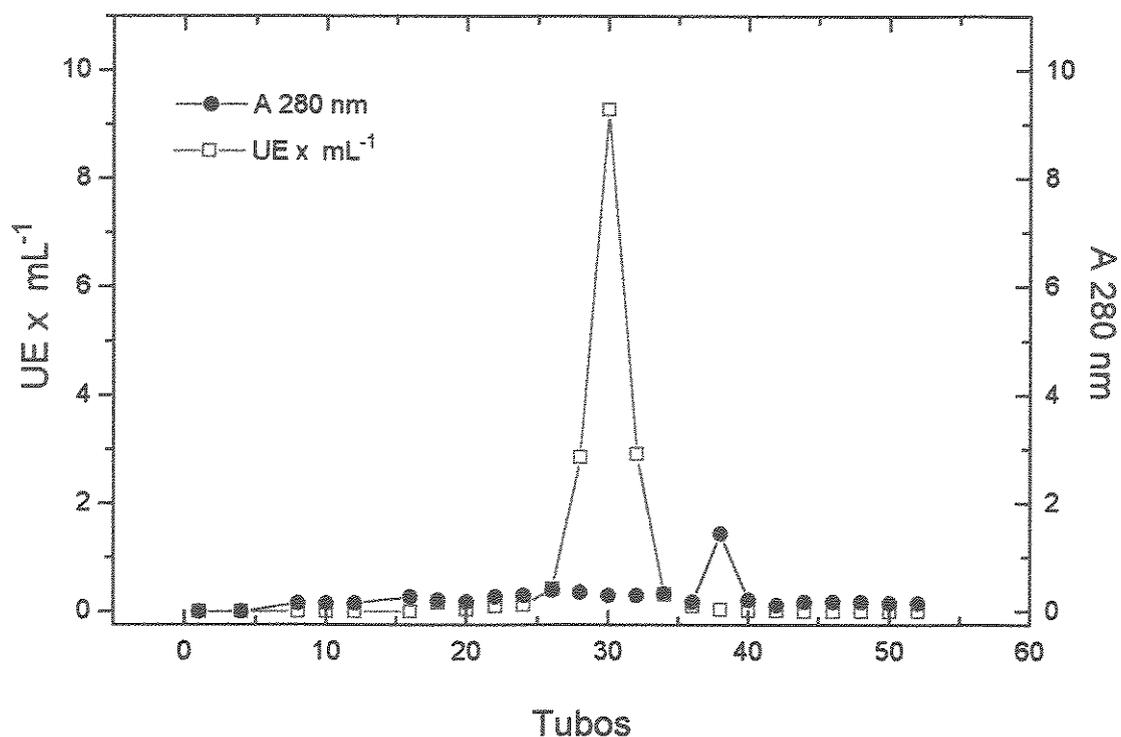
A amostra contendo cerca de 3.800 mg de proteína obtida da cromatografia em SP-Sephadex foi aplicada em uma coluna de ConA-Sepharose (1,8 x 5,6 cm) equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0. Logo após foi passado na coluna o mesmo tampão contendo 1 M de NaCl. A eluição foi realizada a partir do tubo 45 com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 1 M de NaCl, 1 M de glicose e 0,2 M de  $\alpha$ -Metilmanopiranosídeo. Foram coletados 12 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 60 mL/h.

### *b- Cromatografia em Sephacryl-S200*

Pelo perfil cromatográfico (Fig. 3) pôde-se ver que um pico de proteína sem atividade enzimática foi eluído logo após a eluição do pico contendo atividade. Nesta etapa, conseguimos eliminar cerca de 40% das proteínas contaminantes da etapa anterior e também compostos coloridos, possivelmente fenóis. O fator de purificação passou de 302 para 488 vezes e praticamente não houve perda da atividade enzimática (Tabela 2).

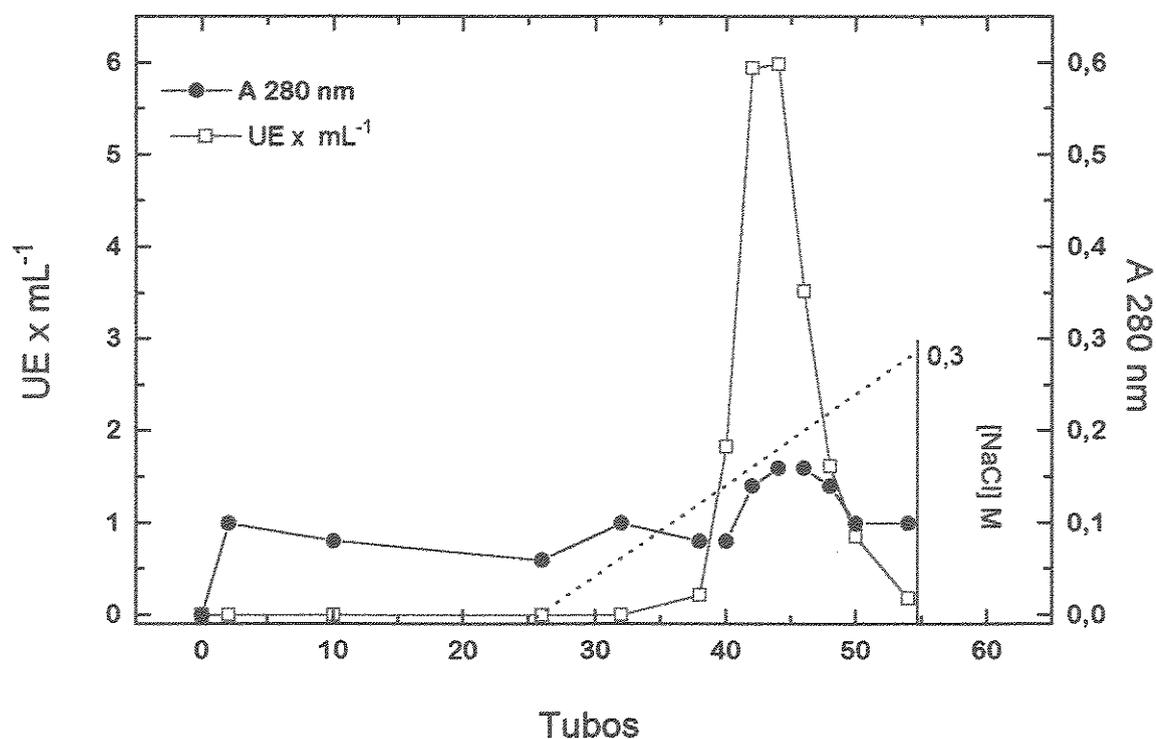
### *c- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

Esta foi a última etapa de purificação da fração API, e obtivemos 10,1 mg de proteína com fator de purificação de 910 vezes, uma atividade específica de 50 UE/mg de proteína e pequena perda da atividade enzimática (14%) em relação à etapa anterior (Tabela 2). A fração contendo atividade foi eluída com aproximadamente 0,23 M de NaCl (Fig. 4).



**Figura 3. Cromatografia em Sephacryl S-200**

A amostra contendo 41,09 mg de proteína foi aplicada em uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm), equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 contendo 0,25 M de NaCl. A eluição foi realizada com o tampão de equilíbrio, coletando-se 12 mL/tubo. Durante a cromatografia o fluxo da corrida foi mantido em 65 mL/h.



**Figura 4. Cromatografia em DEAE-Sephadex**

A coluna de DEAE-Sephadex (2,4 x 6,0 cm) foi equilibrada com tampão tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. A amostra aplicada nesta coluna continha cerca de 24,0 mg de proteína. A eluição foi realizada aplicando-se gradiente linear de NaCl (0-0,3 M), a partir do tubo 25. Foram coletados 10 mL/tubo e durante a cromatografia o fluxo da corrida foi mantido em 165 mL/h.

#### 4.1.6. Purificação da fração AP2

##### *a- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

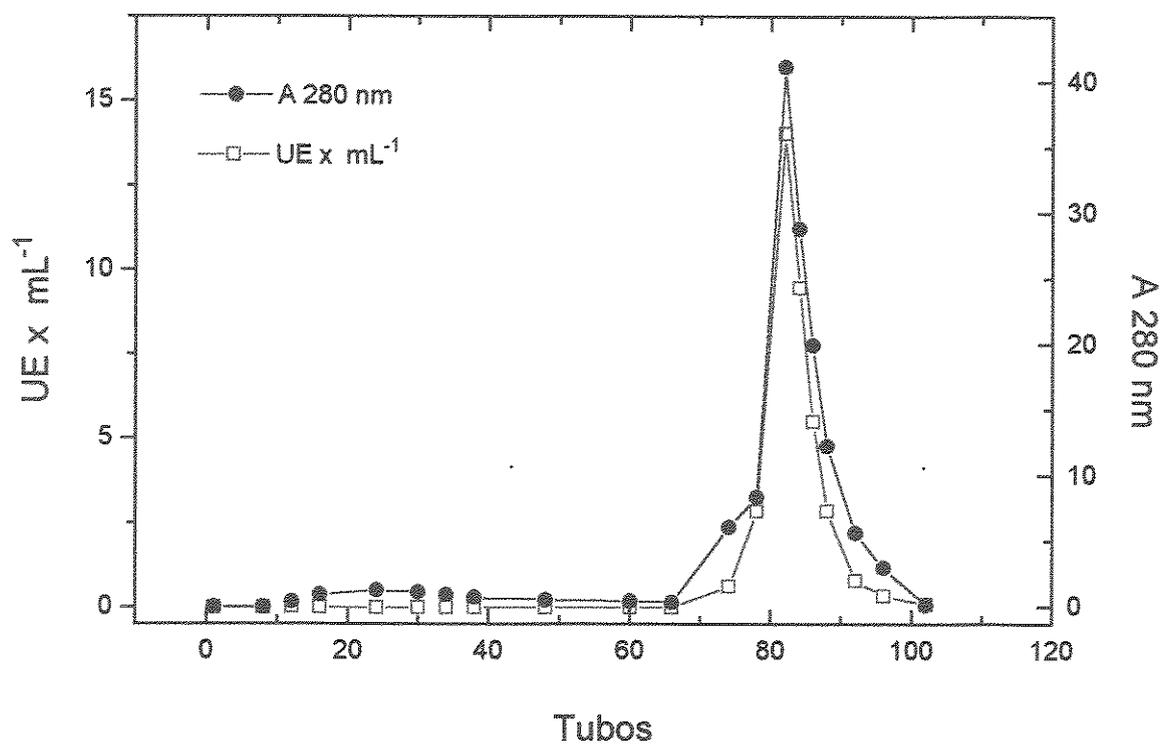
Pelo perfil cromatográfico obtido, pôde-se constatar que proteínas contaminantes foram eluídas junto com a fração contendo atividade (Fig. 5). No entanto, quando a amostra eluída da coluna foi concentrada com sulfato de amônio e dialisada contra tampão acetato 0,01 M, pH 5,0, houve uma perda de cerca de 40% das proteínas contaminantes em relação à etapa anterior, sem nenhuma perda da atividade enzimática (Tabela 3).

##### *b- Cromatografia em SP-Sephadex*

De acordo com o perfil cromatográfico (Fig. 6), pôde-se ver que esta etapa foi eficaz, pois uma quantidade de proteína contaminante juntamente com um pequeno pico contendo atividade enzimática foram eluídos com o tampão de equilíbrio. Provavelmente este pico seja contaminação da fração AP1, uma vez que a mesma não se ligou à esta coluna nas mesmas condições em que foi realizada esta cromatografia. A eluição com gradiente de NaCl também nos permitiu eliminar uma boa parte da proteína contaminante uma vez que esta foi eluída com uma maior concentração de NaCl (Fig. 6). Esta etapa apesar da perda de aproximadamente 40% da atividade em relação a etapa anterior, eliminou cerca de 80% da proteína presente na amostra aplicada nesta coluna (Tabela 3). A perda da atividade provavelmente corresponde a atividade do primeiro pico eluído e a parte da atividade do segundo pico que coincidiu com o maior pico de proteína, pois os mesmos foram descartados; e a amostra eluída apresentou as mesmas unidades enzimáticas antes e após de ser concentrada por ultrafiltração.

##### *c- Cromatografia em Sephacryl S-200*

A etapa de cromatografia nesta coluna (Fig. 7) foi indispensável pois, apesar de ter havido perda da atividade enzimática e uma diminuição do fator de purificação (Tabela 3) conseguimos retirar compostos coloridos, provavelmente fenóis, da amostra.



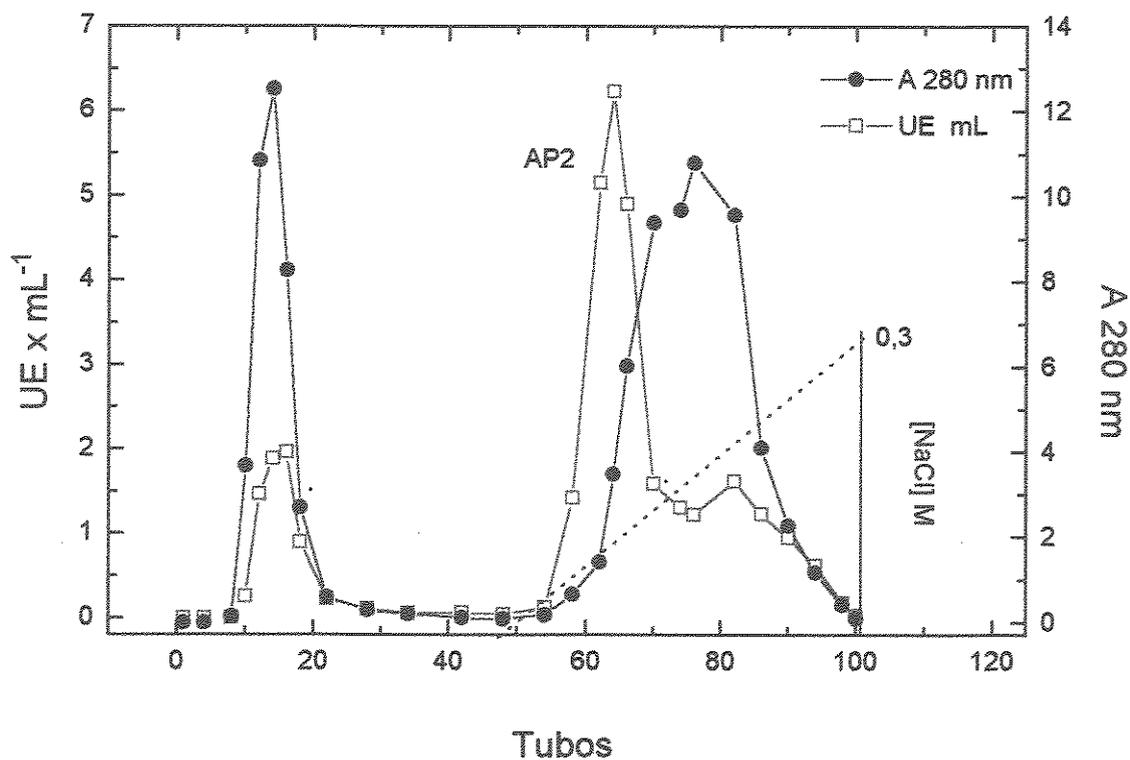
**Figura 5. Cromatografia em DEAE-Sephadex**

A coluna de DEAE-Sephadex (3,1 x 14,0 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. A amostra aplicada nesta coluna continha cerca de 6.690 mg de proteína. A fração contendo atividade foi eluída com o mesmo tampão de equilíbrio contendo 0,15 M de NaCl, a partir do tubo 64. Foram coletados 10 mL/tubo e o fluxo da corrida foi mantido em 165 mL/h.

Tabela 3

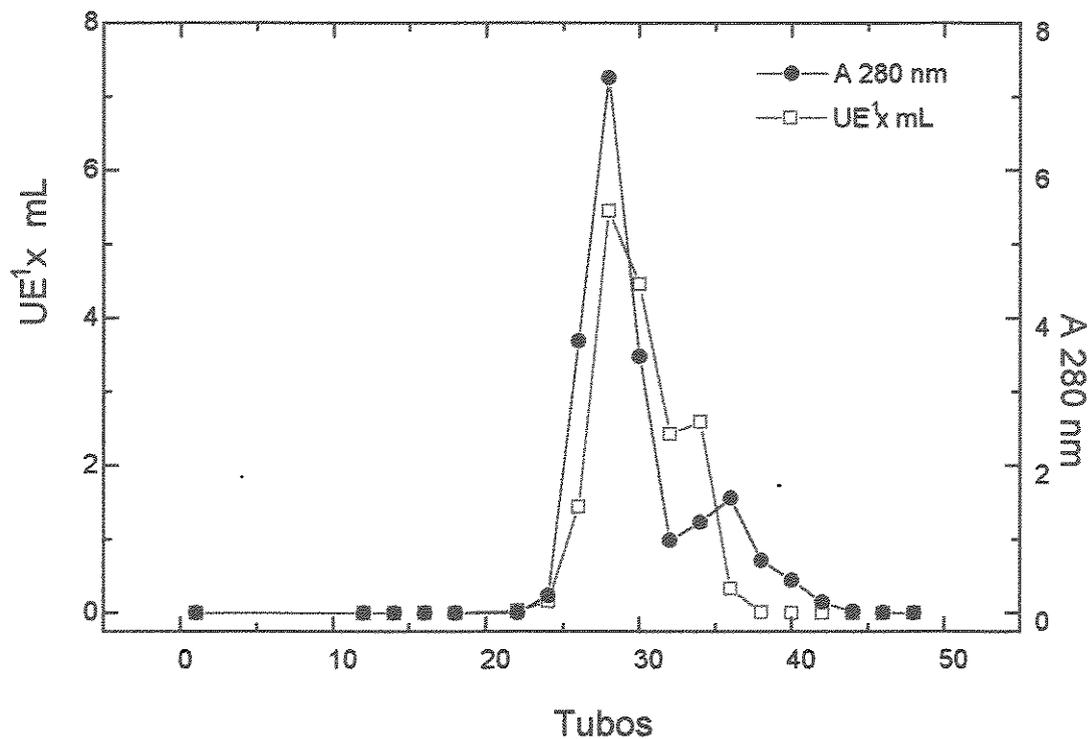
**Purificação da fração AP2**

<b>Etapa</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>UE Totais</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>A.E. (UE/mg)</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
DEAE-Sephadex	83	1.044	3.780	0,276	5	15(100)
SP-Sephadex	13	620	659	0,940	17	9(61)
Sephacryl S-200	30	314	581	0,540	10	5(31)
DEAE-Sephadex	2,4	240	24,5	9,803	180	3(20)



**Figura 6. Cromatografia em SP-Sephadex**

A coluna de SP-Sephadex (2,7 x 9,2 cm) foi equilibrada com tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. A amostra utilizada nesta cromatografia continha cerca de 3.780 mg de proteína. A eluição foi feita aplicando-se um gradiente linear de NaCl (0-0,3 M) a partir do tubo 47. Foram coletados 10 mL/tubo e durante a cromatografia o fluxo da corrida mantido em 165 mL/h.

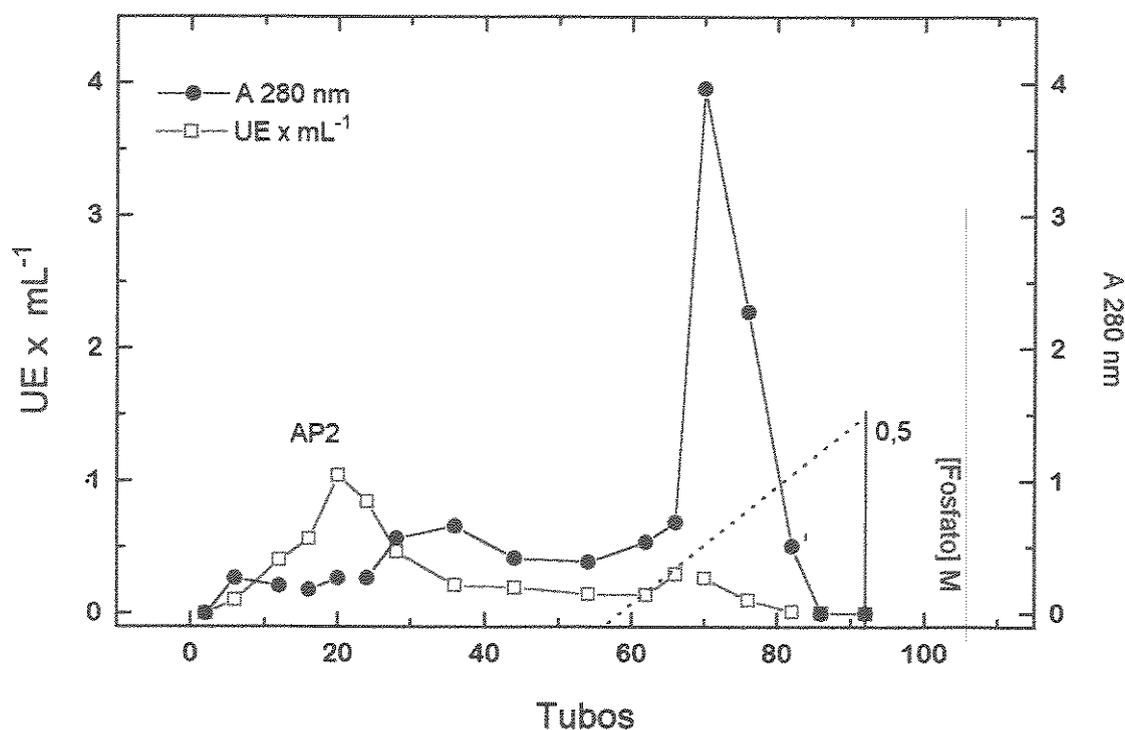


**Figura 7. Cromatografia em Sephacryl S-200**

A coluna de Sephacryl S-200 (3 x 110 cm) foi equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,25 M de NaCl. Aplicou-se nesta coluna uma amostra contendo cerca de 650 mg de proteína. A eluição foi realizada com o tampão de equilíbrio, foram coletados 12 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia mantido em 65 mL/h.

#### *d- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

O equilíbrio da coluna, foi feito com tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0, com o objetivo de que a fosfatase não se ligasse à coluna, diferentemente das proteínas contaminantes. Este objetivo foi alcançado, pois pelo perfil cromatográfico (Fig. 8), um pico de atividade foi eluído durante a lavagem (pelo efeito da afinidade da enzima pelo fosfato e possivelmente também pelo efeito do pH, pois em pH 6,0, a enzima apresentaria carga líquida com um caráter menos negativo). As proteínas contaminantes só foram eluídas com uma concentração de fosfato de cerca de 0,2 M (Fig. 8). A eficácia desta cromatografia, pôde ser vista pelo aumento expressivo do fator de purificação, que aumentou de 10 para 180 vezes (Tabela 3). Obteve-se nesta etapa final, 24,5 mg de enzima contendo 240 unidades totais, com atividade específica de 10 (Tabela 3).



**Figura 8. Cromatografia em DEAE-Sephadex**

A coluna de DEAE-Sephadex (2,7 x 9,2 cm) foi equilibrada com tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0. Foi aplicada nesta cromatografia uma amostra contendo cerca de 580 mg de proteína. O pico contendo maior atividade foi eluído com o tampão de equilíbrio e o outro pico com gradiente de fosfato (0,01-0,5 M) a partir do tubo 58. Foram coletados 10 mL/tubo e um fluxo de 165 mL/h foi mantido durante a cromatografia.

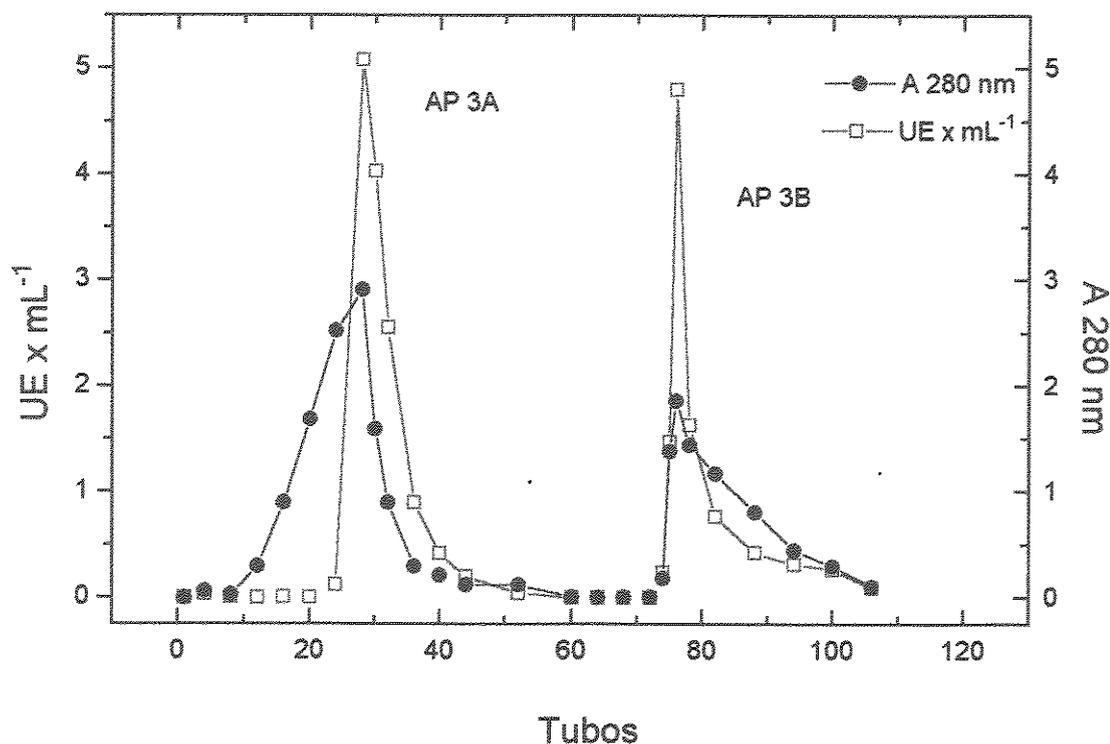
#### 4.1.7. Purificação das frações AP3A e AP3B

##### *a- Cromatografia em DEAE-Sephadex*

Esta cromatografia permitiu-nos separar a fração AP3 em duas frações (AP3A e AP3B), a primeira foi eluída com o tampão de equilíbrio e a segunda, com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, contendo 0,15 M de NaCl (Fig. 9). A fração AP3A apresentou 261 unidades totais e a AP3B 127 e em relação a UE totais da amostra aplicada nesta coluna, houve uma perda de cerca de 50% (Tabela 4). Parte da atividade foi perdida quando as frações AP3A e AP3B foram concentradas por ultrafiltração, pois antes de serem concentradas as duas frações apresentaram cerca de 350 e 230 UE totais, respectivamente. A outra parte da atividade provavelmente foi perdida durante a cromatografia.

##### *b- Cromatografia em SP-Sephadex*

As frações AP3A e AP3B foram submetidas à cromatografia em SP-Sephadex (Figs. 10 e 11). Esta coluna para a fração AP3A não apresentou um resultado muito satisfatório, uma vez não houve aumento da atividade específica e conseqüentemente do fator de purificação (Tabela 3). Já para a fração AP3B, conseguimos aumentar a atividade específica de 0,776 para 3,96, e o fator de purificação passou de 14 para 73 vezes (Tabela 4).

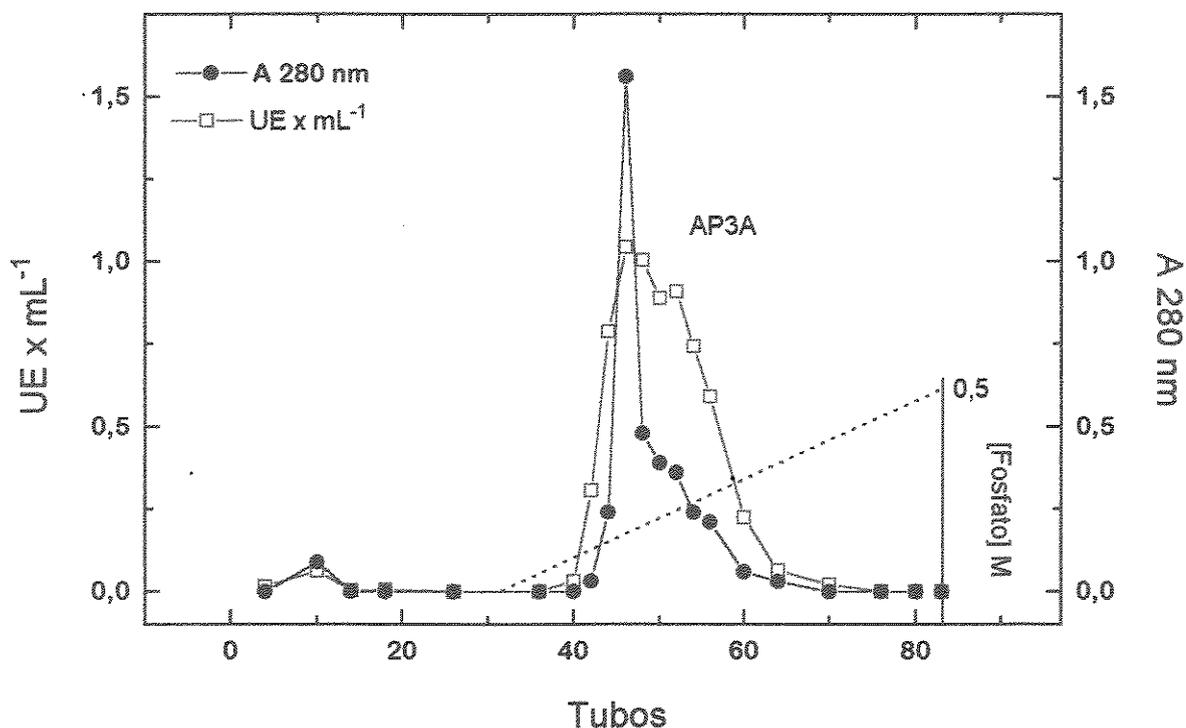


**Figura 9. Cromatografia em DEAE-Sephadex**

A coluna de DEAE-Sephadex (3,1 x 14 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. A amostra aplicada na coluna continha cerca de 1.490 mg de proteína. O primeiro pico contendo atividade enzimática (AP3A) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo (AP3B) com o mesmo tampão contendo 0,15 M de NaCl, a partir do tubo 64. Foram coletados 10 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 165 mL/h.

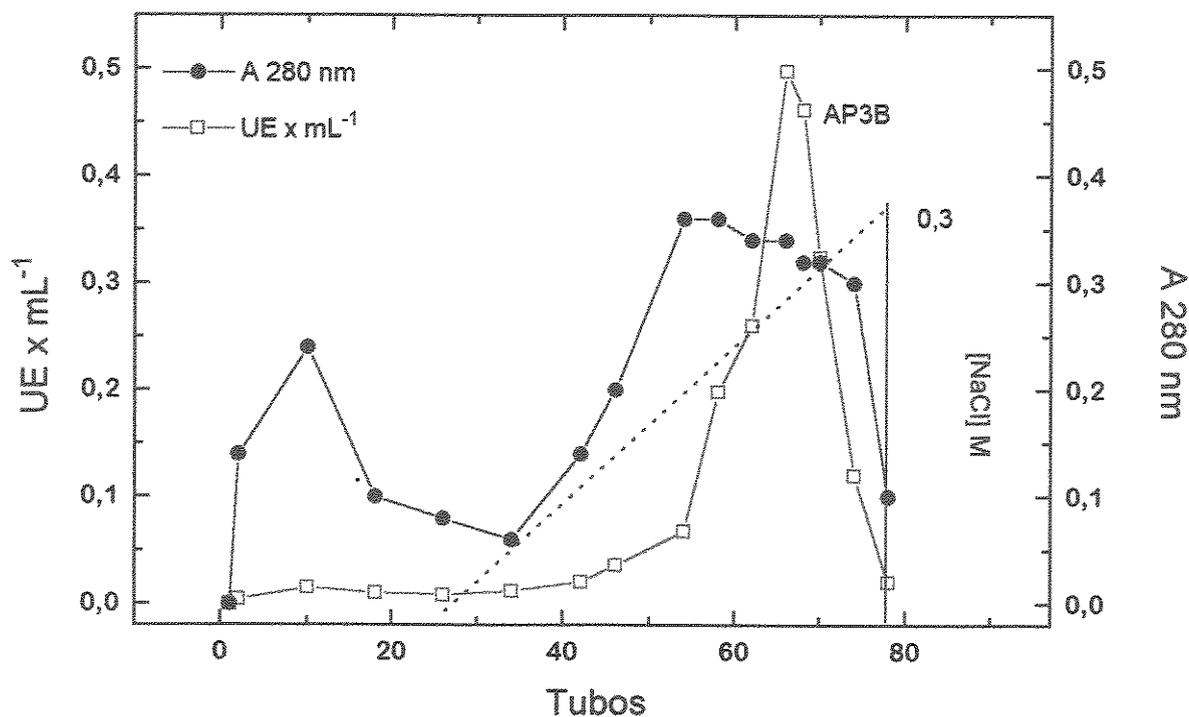
Tabela 4  
**Purificação das frações AP3A e AP3B**

<b>Etapa</b>		<b>Volume (mL)</b>	<b>UE Totais</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>A.E. (UE/mg)</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
DEAE-Sephadex	AP3A	62	261	375	0,695	13	4(32)
	AP3B	65	127	163	0,776	14	2(16)
SP-Sephadex	AP3A	2	109	129	0,842	15	1,6(13)
	AP3B	2	140	35	3,960	73	2(17)



**Figura 10. Cromatografia em SP-Sephadex**

O primeiro pico contendo atividade eluído da coluna de DEAE-Sephadex após ser concentrado por ultrafiltração, foi aplicado em uma coluna de SP-Sephadex (2,7 x 9,2 cm) equilibrada com tampão acetato 0,01 M, pH 5,0. A amostra continha cerca de 370 mg de proteína. A eluição foi realizada aplicando-se um gradiente de fosfato (0-0,5 M), a partir do tubo 32, foram coletados 10 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 165 mL/h.



**Figura 11. Cromatografia em SP-Sephadex**

A coluna de SP-Sephadex (2,4 x 6,0 cm) foi equilibrada com tampão acetato 0,01 M pH 5,0. Amostra aplicada (proveniente do segundo pico eluído na cromatografia em DEAE-Sephadex) nesta coluna continha cerca de 160 mg de proteína. A eluição foi feita com gradiente linear de NaCl (0-0,3 M), a partir do tubo 26, foram coletados 10 mL/tubo e o fluxo da corrida mantido em 165 mL/h durante a cromatografia.

Pelas cromatografias de troca iônica pôde-se ver que as 4 fosfatases ácidas das sementes de soja apresentam valores de pI diferentes, uma vez que tiveram comportamentos de eluições diferentes nestas colunas. Das 4 frações, a AP1 apresentou um menor pI (igual ou menor que 5), uma vez que a mesma não se ligou à coluna de SP-Sephadex (Fig. 1); na literatura há relato de fosfatases de planta com valores de pI menores que 5 (DUFF et alii, 1994). As frações AP2 e AP3B apresentaram comportamento semelhante nas colunas de SP-Sephadex e DEAE-Sephadex, porém é possível que a fração AP2 tenha um pI menor que a AP3B, uma vez que na primeira coluna de SP-Sephadex a mesma foi eluída com uma menor concentração de fosfato indicando que a sua ligação na resina foi mais fraca. Já a fração AP3A possivelmente apresenta o pI mais alto das 4 frações, pois não se ligou à coluna de DEAE-Sephadex equilibrada com tampão tris-HCl, pH 7,5, indicando que nestas condições esta fração estava com carga líquida positiva. A tabela abaixo mostra a possível faixa onde se encontra o pI de cada fração, baseando-se no perfil cromatográfico obtidos nas condições em que foram realizadas as cromatografias de troca iônica.

**Tabela 5 - Faixa de pH onde possivelmente se encontra o pI das frações AP1, AP2, AP3A e AP3B**

<b>Frações</b>	<b>SP-Sephadex (pH 5,0)</b>	<b>DEAE-Sephadex (pH 7,0)</b>	<b>Faixa de pH onde se encontra o pI</b>
AP1	-	+	$pI \leq 5,0$
AP2	+	+	$5 < pI < 7,5$
AP3A	+	-	$pI \geq 7,5$
AP3B	+	+	$5 < pI < 7,5$

(+) - retida

(-) - não retida

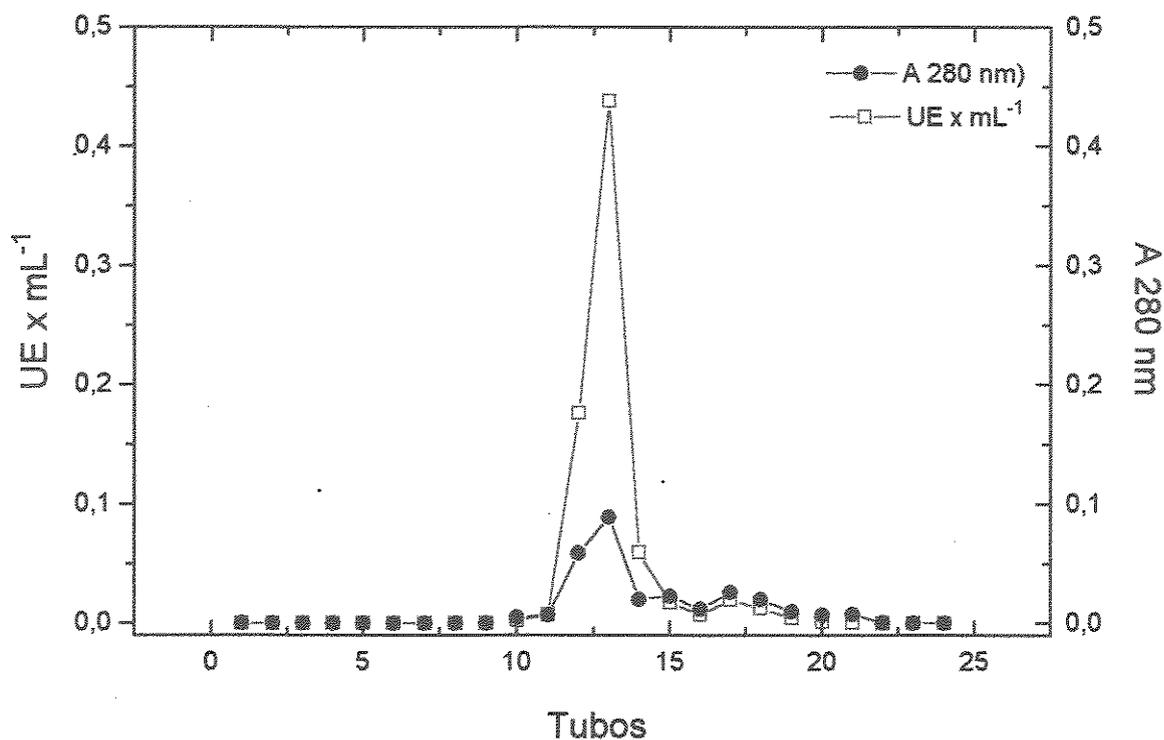
## **4.2. Determinação da massa molecular**

### **4.2.1. Através de filtração em gel**

O perfil de eluição das 4 frações na cromatografia em gel, utilizando-se coluna SW 300 (Waters Protein Glass) nos mostra que as frações AP2, AP3A e AP3B apresentaram um pequeno pico de proteína sem atividade enzimática eluído logo após o pico que apresentou atividade (Figs. 12, 13 e 14), no entanto, todas as 4 frações nesta cromatografia apresentaram somente um pico contendo atividade fosfatásica (Figs. 12, 13, 14 e 15). O cálculo da Mr foi obtido através do gráfico  $\log Mr \times TR/TR_0$  (fig. 16). A Mr das frações AP1, AP2, AP3A e AP3B foi de 51.000, 58.000, 52.000 e 30.000, respectivamente.

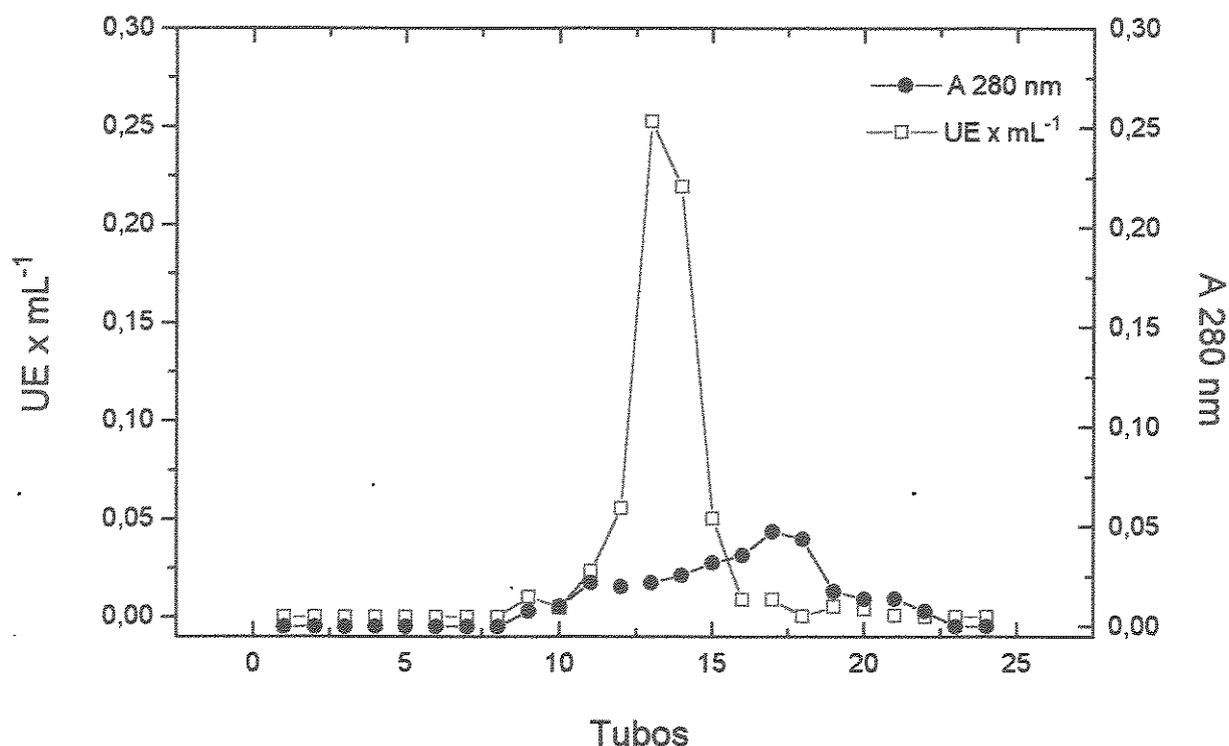
### **4.2.2. Através de eletroforese PAGE-SDS**

Através desta eletroforese (Fig. 17) não foi possível determinar a Mr das frações uma vez que foram detectadas várias bandas de proteínas. O aparecimento de mais de uma banda de proteína no gel já era esperado para as frações AP2 (géis 3 e 4), AP3A (géis 5 e 6) e AP3B (géis 7 e 8), uma vez que na cromatografia de filtração em gel foi constatado a presença de proteínas contaminantes. A fração AP1 (géis 1 e 2), também apresentou várias bandas de proteínas; parte destas bandas pode ser devido ao fato desta fração ser uma glicoproteína. Alguns autores já relataram que glicoproteínas normalmente apresentam heterogeneidade de migração em géis de eletroforese possivelmente devido à formação de agregados entre as moléculas de proteínas, causados por seus resíduos de carboidratos (MORRIS et alii, 1989; KANEKO et alii, 1990).



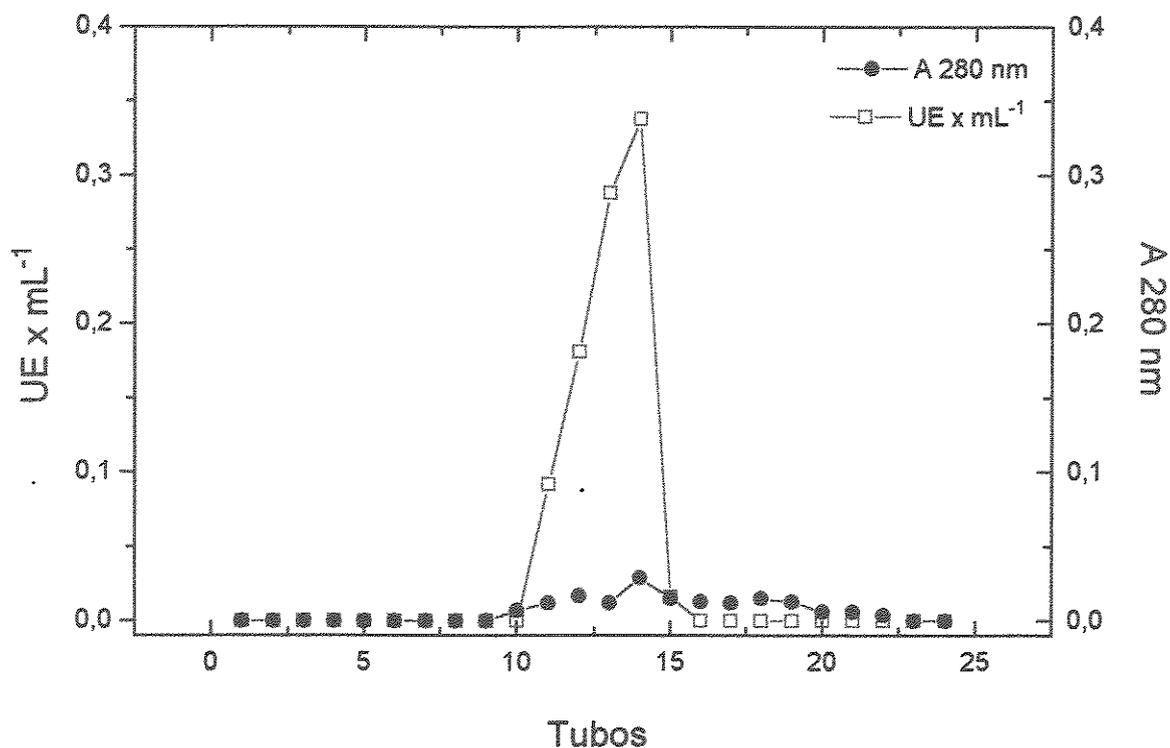
**Figura 12. Cromatografia em filtração em gel - AP2**

Uma alíquota da fração AP2 contendo 50 µg foi aplicada à uma coluna SW 300 Waters Protein Glass, acoplada a um sistema de LC e equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH5,0, contendo 0,25 M de NaCl. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e foram coletados 0,5 mL/tubo e fluxo durante a cromatografia foi mantido em 0,1 ml/minuto. A coluna foi pré-calibrada com os seguintes marcadores de Mr: BSA (67.000), Ovalbumina (43.000) e Quimotripsinogênio (25.000).



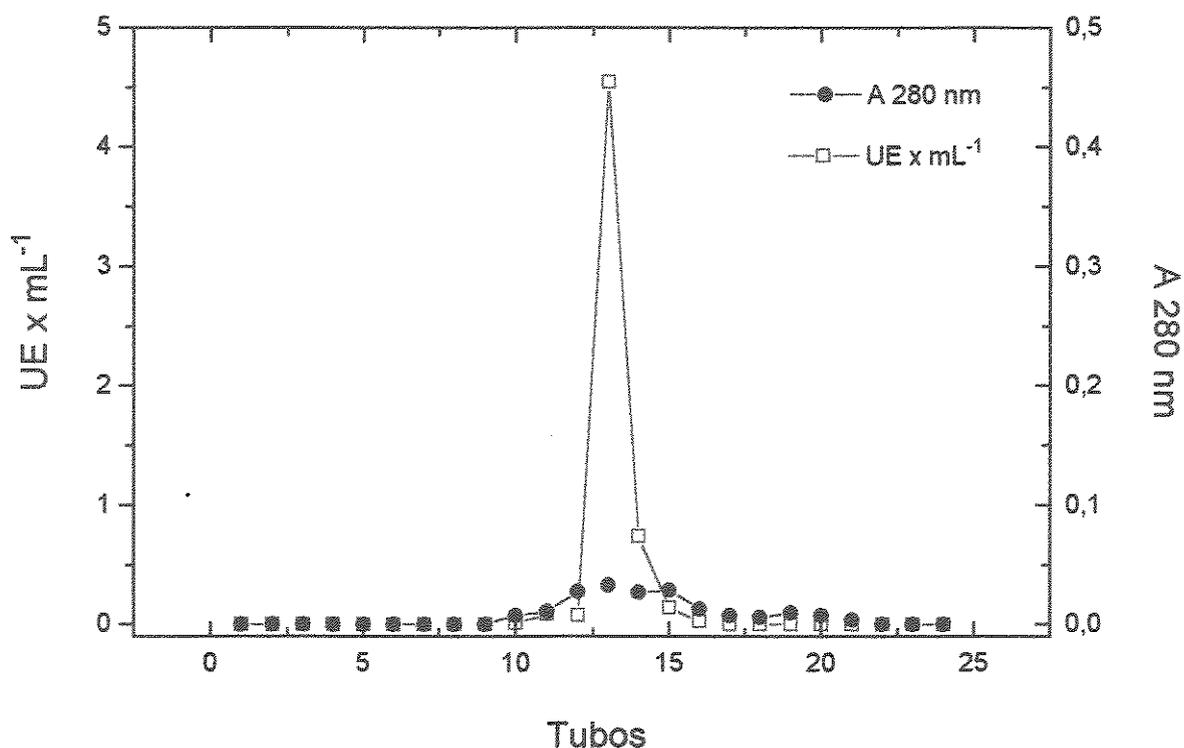
**Figura 13. Cromatografia de filtração em gel - AP3A**

Uma alíquota da fração AP3A contendo 50 µg foi aplicada à uma coluna SW 300 Waters Protein Glass, acoplada a um sistema de LC e equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH5,0, contendo 0,25 M de NaCl. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e foram coletados 0,5 mL/tubo e fluxo durante a cromatografia foi mantido em 0,1 ml/minuto. A coluna foi pré-calibrada com os seguintes marcadores de Mr: BSA (67.000), Ovalbumina (43.000) e Quimotripsinogênio (25.000).



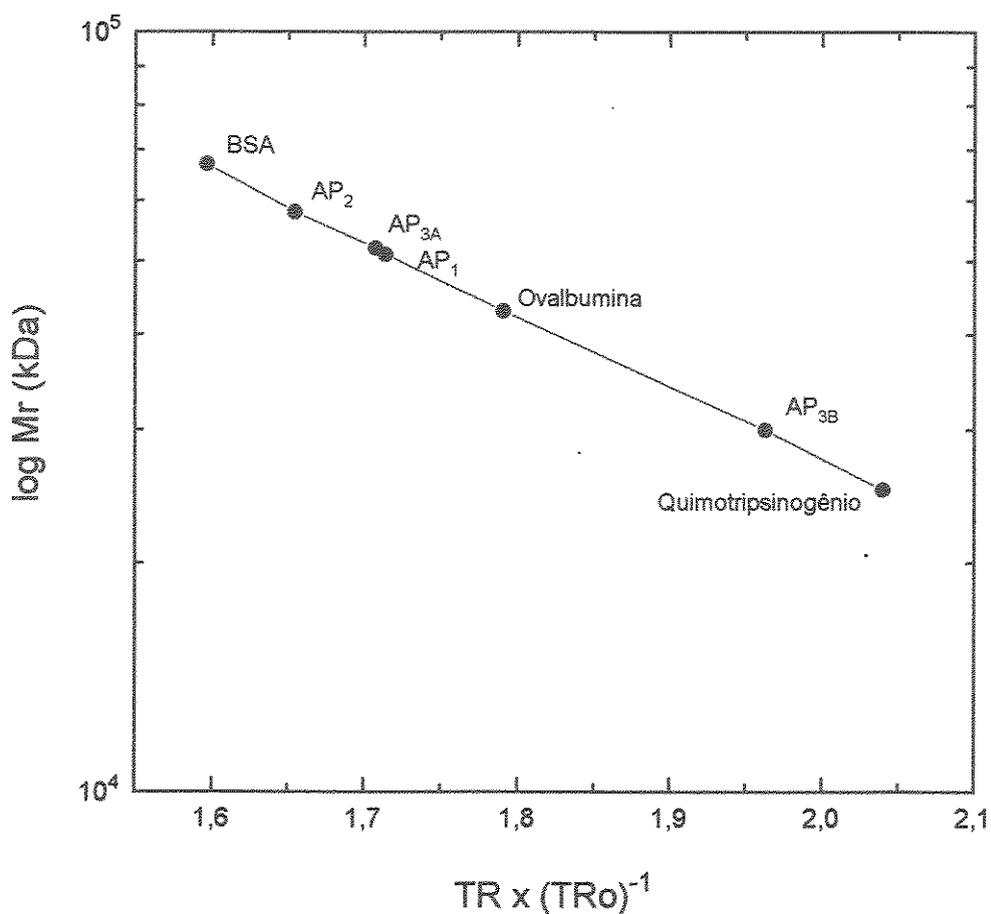
**Figura 14. Cromatografia de filtração em gel - AP3B**

Uma alíquota da fração AP3B contendo 50  $\mu\text{g}$  foi aplicada à uma coluna SW 300 Waters Protein Glass, acoplada a um sistema de LC e equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,25 M de NaCl. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e foram coletados 0,5 mL/tubo e fluxo durante a cromatografia foi mantido em 0,1 ml/minuto. A coluna foi pré-calibrada com os seguintes marcadores de Mr: BSA (67.000), Ovalbumina (43.000) e Quimotripsinogênio (25.000).



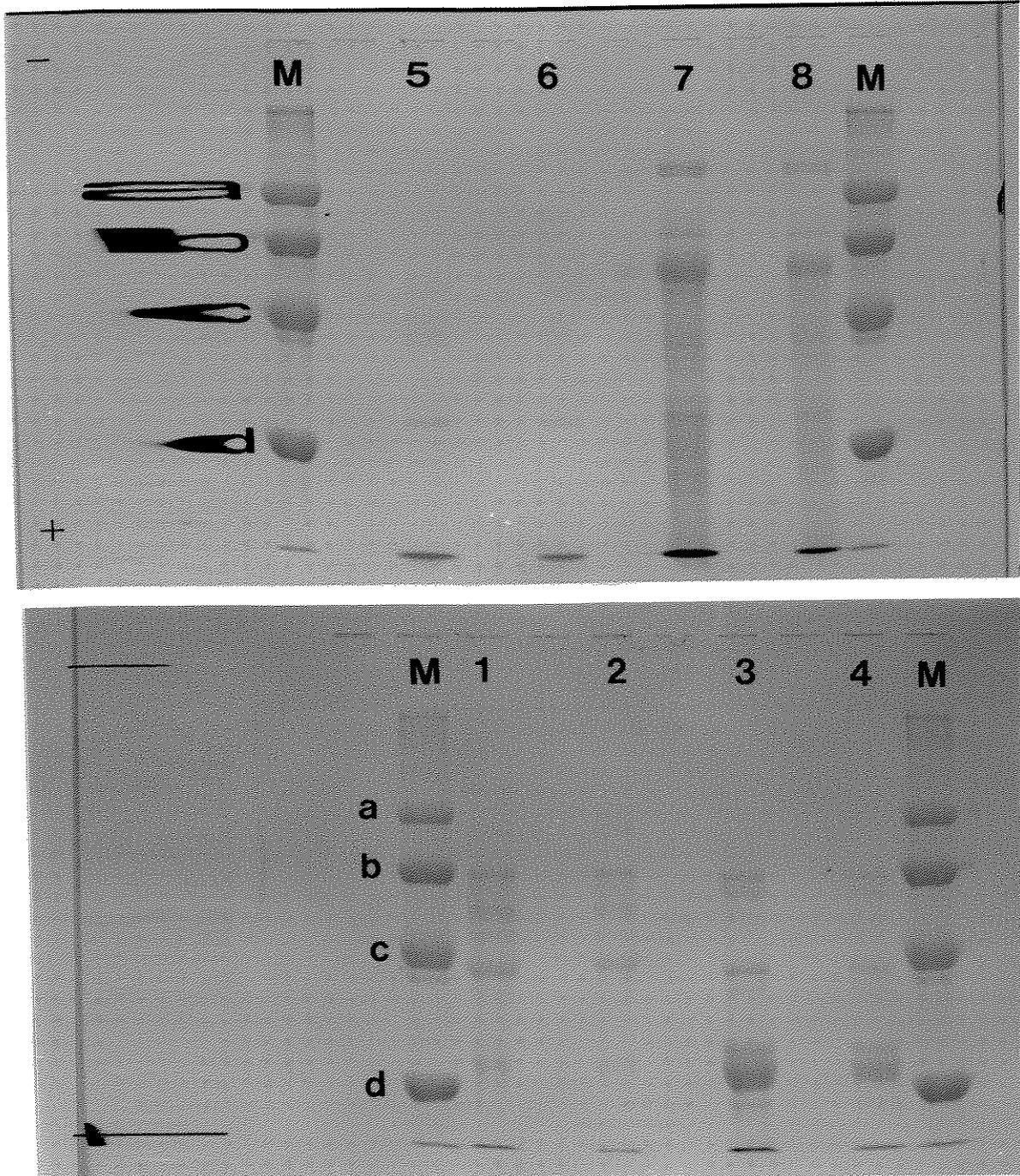
**Figura 15. Cromatografia de filtração em gel - API**

Uma alíquota da fração API contendo 50  $\mu\text{g}$  foi aplicada à uma coluna SW 300 Waters Protein Glass, acoplada a um sistema de LC e equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,25 M de NaCl. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e foram coletados 0,5 mL/tubo e fluxo durante a cromatografia foi mantido em 0,1 ml/minuto. A coluna foi pré-calibrada com os seguintes marcadores de Mr: BSA (67 kDa), Ovalbumina (43 kDa) e Quimotripsinogênio (25 kDa).



**Figura 16. Determinação da massa molecular relativa por filtração.**

A Mr foi determinada pela filtração em gel na coluna SW 300 Waters Protein Glass, acoplada a um sistema de LC. Foram utilizados os seguintes marcadores de Mr: BSA (67.000), Ovalbumina (43.000) e Quimotripsinogênio (25.000).



**Figura 17. Eletroforese em PAGE-SDS das frações AP1 (géis 1 e 2), AP2 (géis 3 e 4), AP3A (géis 5 e 6) e AP3B (géis 7 e 8)**

As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.7.2. Utilizou-se 50 e 25  $\mu\text{g}$  das 4 frações e os seguintes marcadores de Mr (M): a- fosforilase (97.400), b- BSA (66.000), c- Ovalbumina (45.000) e d- anidrase carbônica (29.000).

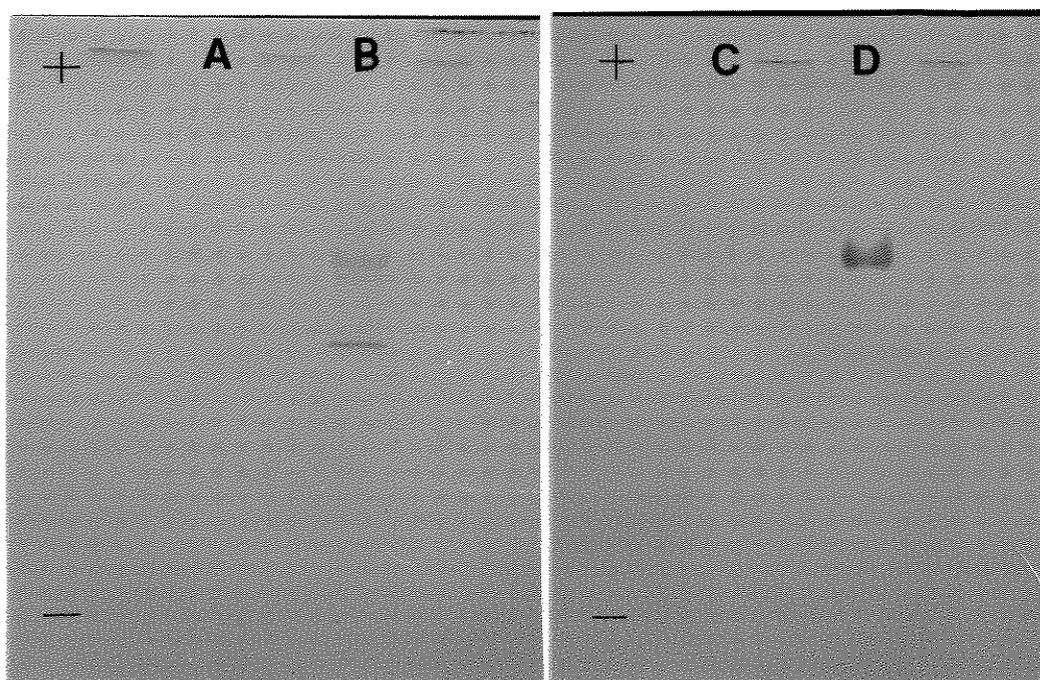
### 4.3. Estudos Eletroforéticos

#### 4.3.1. Eletroforese em condições não desnaturantes

A Fig. 18 mostra a eletroforese realizada em condições não desnaturantes em pH 5,0, das frações AP1 e AP2. Nos géis A e C foi aplicada a fração AP1, a qual não entrou no gel uma vez que não houve aparecimento de nenhuma banda tanto no gel corado para proteína (gel A) como no corado para atividade (gel C). Provavelmente esta fração apresentou carga líquida neutra ou negativa em pH 5,0, o que impediu a sua migração no gel. Já a fração AP2 apresentou uma banda na coloração para proteína (gel B) que coincidiu com a outra obtida na coloração para atividade. A outra banda presente no gel B foi devido à fucsina, utilizada como marcador da corrida, pois mesmo antes de ser realizada a coloração para proteína esta banda já era visível no gel. A banda referente à fucsina não apareceu quando a fração AP1 foi aplicada e não migrou, e nem quando foi aplicada sozinha no gel (demais géis não marcados com letras).

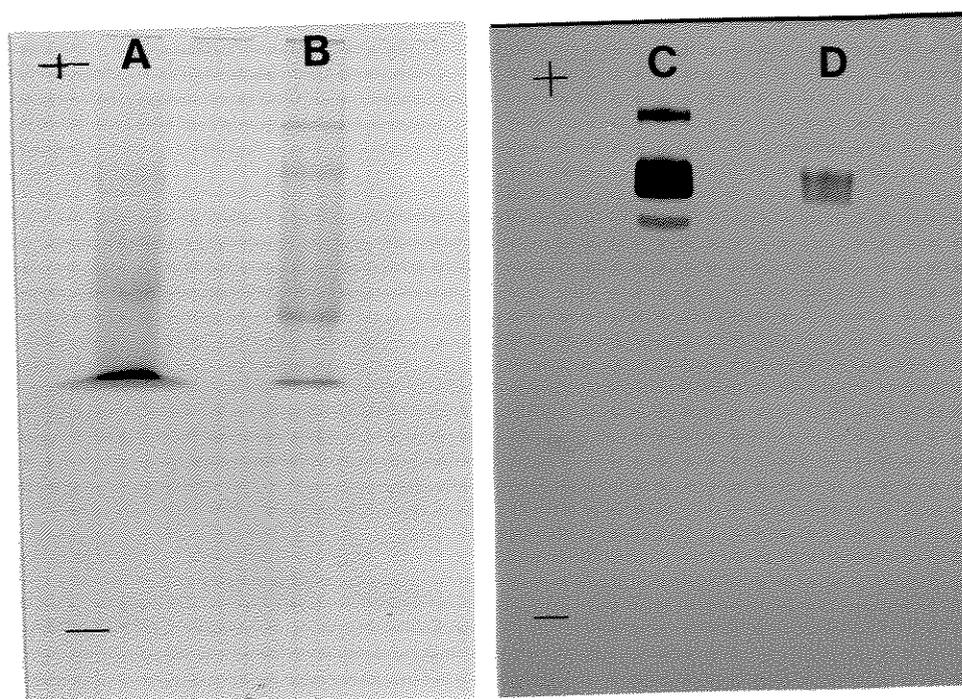
A fração AP3A apresentou mais de uma banda tanto na coloração para proteína como na coloração para atividade (géis A e C). Já a fração AP3B apresentou pelo menos 3 bandas de proteína (gel B) e somente uma banda foi verificada no gel corado para atividade (gel D) - (Fig. 19).

A Fig. 20 mostra a eletroforese em condições não desnaturantes em pH 8,3. A fração AP1 foi aplicada nos géis A e C, sendo que o gel A corado para proteína apresentou uma banda difusa que coincidiu com a banda presente no gel C que foi corado para atividade. Verificou-se ainda próximo ao topo do gel A uma banda de proteína contaminante. No gel B onde foi aplicada a fração AP2 e feita coloração para proteína observou-se duas bandas; a mais nítida coincidiu com a banda de atividade obtida no gel D.



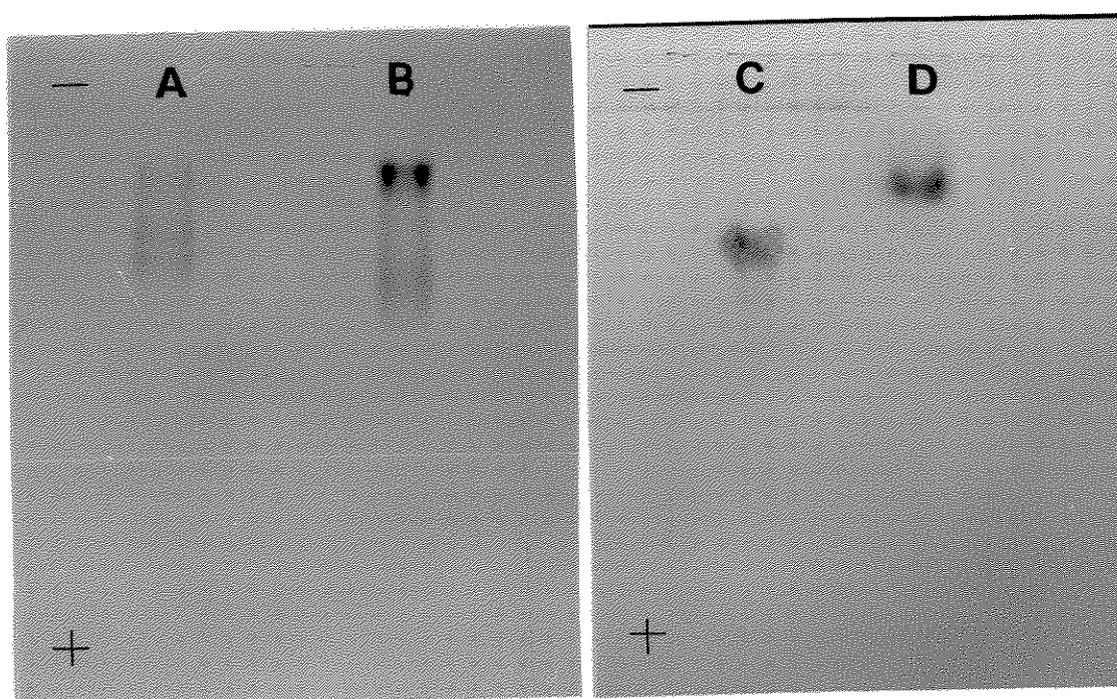
**Figura 18. Eletroforese em condições não desnaturantes em pH 5,0 das frações AP1 (géis A e C) e AP2 (géis B e D)**

As amostras foram coradas para proteína (géis A e B) e atividade enzimática (géis C e D). A quantidade de amostra aplicada foi: gel A 25  $\mu\text{g}$  AP1, gel B 40  $\mu\text{g}$  AP2, gel C 50  $\mu\text{g}$  AP1 e gel D 100  $\mu\text{g}$  AP2. As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.8.



**Figura 19. Eletroforese em condições não desnaturantes em pH 5,0 das frações AP3A (géis A e C) e AP3B (géis B e D)**

As amostras foram coradas para proteína (géis A e B) e atividade enzimática (géis C e D). A quantidade de amostra aplicada foi gel A 50  $\mu\text{g}$  AP3A, gel B 50  $\mu\text{g}$  AP3B, gel C 100  $\mu\text{g}$  AP3A e gel D 80  $\mu\text{g}$  AP3B. As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.8.



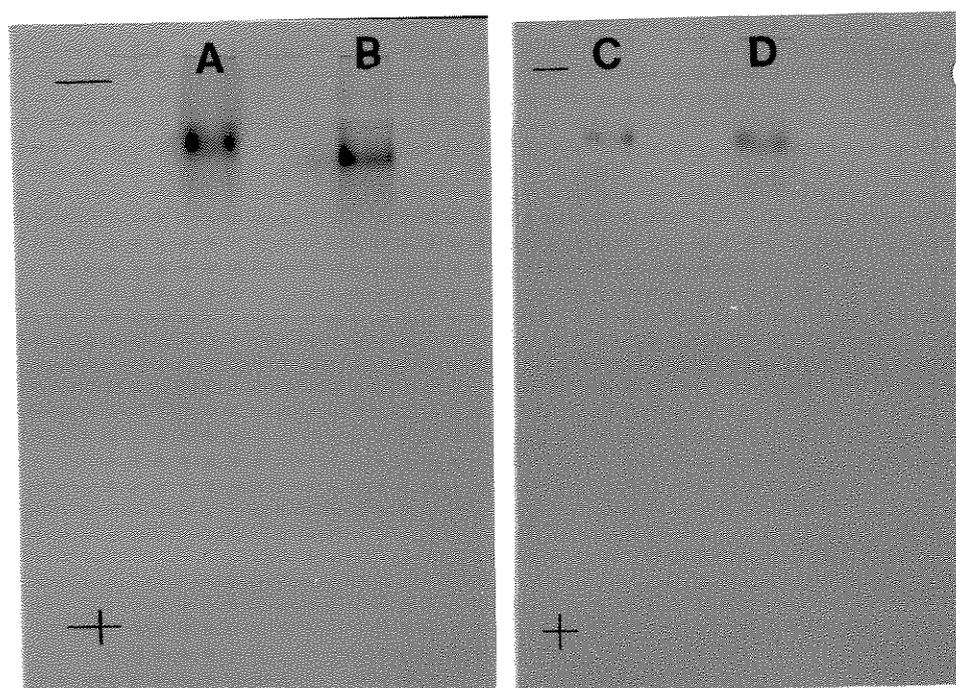
**Figura 20. Eletroforese em condições não desnaturantes em pH 8,3 das frações AP1 (géis A e C) e AP2 (géis B e D)**

As amostras foram coradas para proteína (géis A e B) e atividade enzimática (géis C e D). A quantidade de amostra aplicada foi: gel A 25  $\mu$ g AP1, gel B 50  $\mu$ g AP2, gel C 100  $\mu$ g AP1 e gel D 100  $\mu$ g AP2. As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.8.

A fração AP3A foi aplicada nos géis A e C (Fig. 21) os quais foram corados para proteína e atividade, respectivamente. Verificou-se a presença de uma banda em cada um dos géis. Este mesmo resultado foi obtido para os géis B, corado para proteína e D, corado para atividade, onde foi aplicada a fração AP3B.

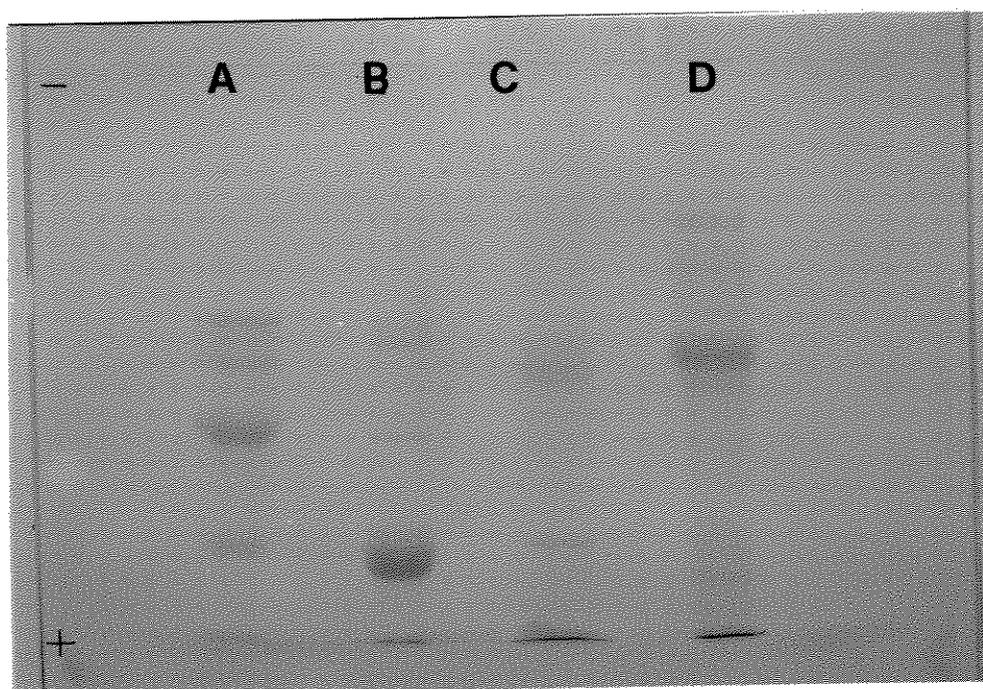
#### **4.3.2. Eletroforese em condições desnaturantes (coloração para carboidrato)**

Esta eletroforese foi feita com o objetivo de verificar se as frações AP2, AP3A e AP3B também seriam glicoproteínas, pois durante a purificação, constatou-se que a fração AP1 é uma glicoproteína, pelo fato da mesma ter se ligado à resina de Concanavalina A-Sepharose. De acordo com os resultados obtidos (Fig. 22) provavelmente a exemplo de AP1 (gel A), as outras 3 frações sejam glicoproteínas, pois foi verificado presença de bandas similares (géis B, C e D). Uma vez que as 4 frações não foram purificadas até a homogeneidade, não se pode descartar o fato de que parte dos carboidratos presentes possa ser proveniente de alguma proteína contaminante.



**Figura 21. Eletroforese em condições não desnaturantes em pH 8,3 das frações AP3A (géis A e C) e AP3B (géis B e D)**

As amostras foram coradas para proteína (géis A e B) e atividade enzimática (géis C e D). A quantidade de amostra aplicada foi gel A 50  $\mu$ g AP3A, gel B 50  $\mu$ g AP3B, gel C 150  $\mu$ g AP3A e gel D 150  $\mu$ g AP3B. As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.8.



**Figura 22. Eletroforese em condições desnaturantes das frações AP1 (gel A), AP2 (gel B), AP3A (gel C) e AP3B (gel D)**

As amostras foram coradas para carboidratos. As condições de corrida foram descritas em métodos 3.2.7.2. e a coloração 3.2.8. Utilizou-se 50  $\mu\text{g}$  das 4 frações.

## **4.4. Estudos Cinéticos**

### **4.4.1. Efeito do tempo de incubação**

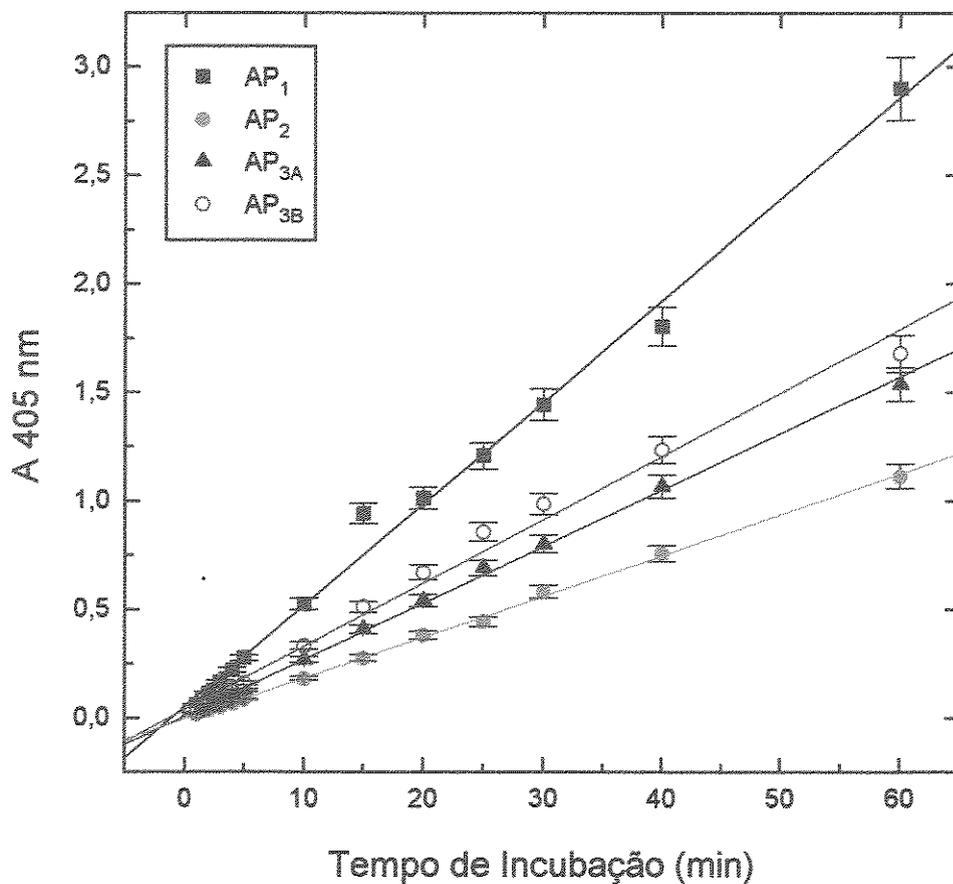
O estudo da influência do tempo de incubação (Fig. 23) nos mostra que a reação é linear até 60 minutos, para todas as frações. Este resultado foi importante, pois mostrou que estas fosfatases mantinham uma atividade proporcional em uma larga faixa de tempo de incubação. Nos experimentos cinéticos foi mantido o tempo de 10 minutos.

### **4.4.2. Efeito da concentração da enzima**

Para todas as frações, houve uma grande proporcionalidade entre a concentração da enzima utilizada no experimento e a velocidade da reação (Fig. 24). Nos experimentos cinéticos serão utilizadas concentrações de enzima de 0,12, 1,0, 6,4 e 4,4  $\mu\text{g}$  o que corresponde a cerca de 0,08 unidades enzimáticas, as quais nos permitiram obter valores de absorbância em torno de 0,3-0,4.

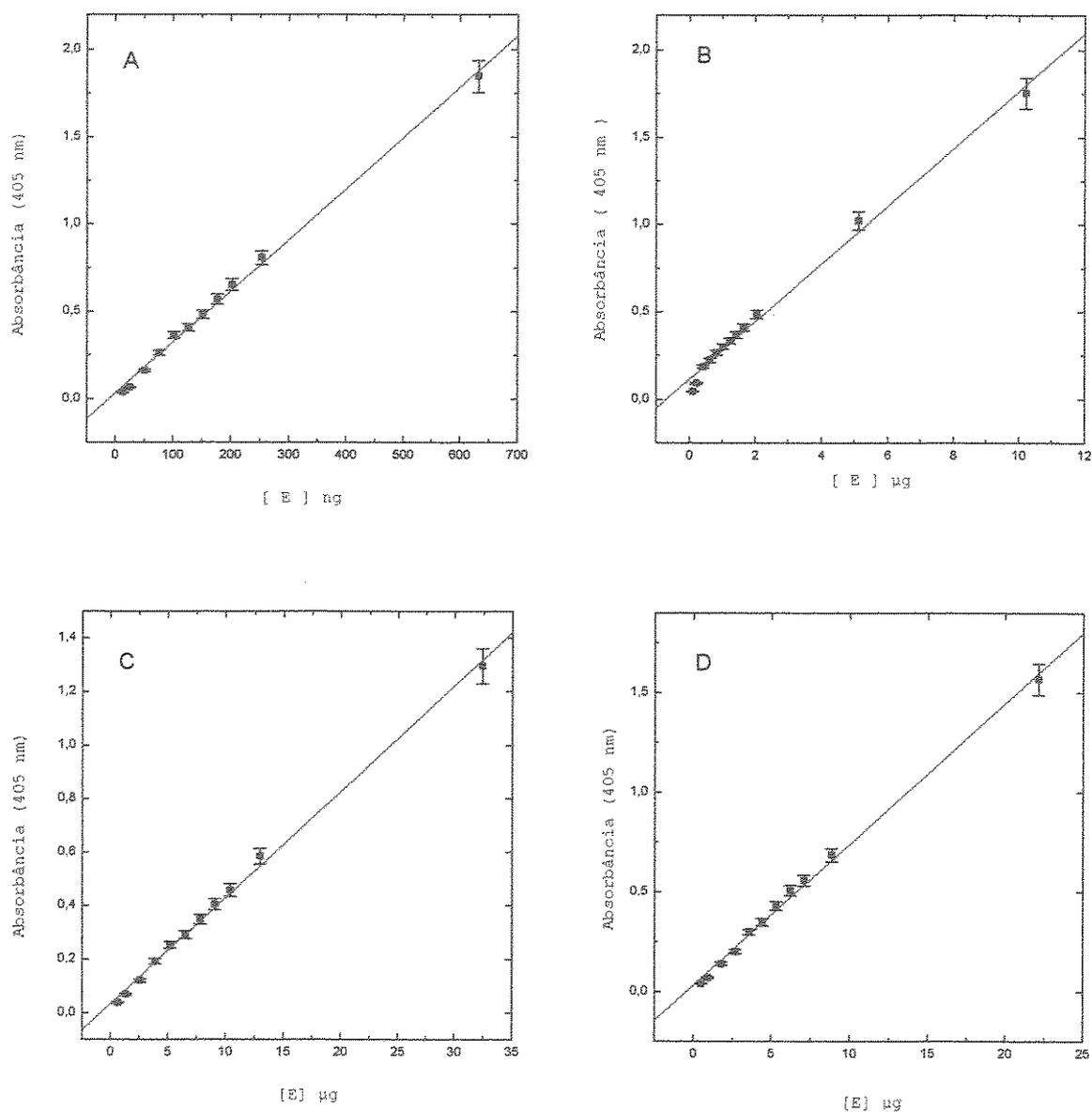
### **4.4.3. Efeito do pH**

Estudando-se o efeito do pH para as 4 frações, pôde-se constatar que para a fração AP1, a atividade foi ótima numa faixa de pH de 4,5-5,0 (Fig. 25); considerando-se como 100% a atividade neste intervalo de pH, nos valores de pH 4,0, e 5,5, a enzima ainda manteve aproximadamente 60% da atividade. As frações AP2 e AP3A, apresentaram pH ótimo em torno de 6,0. Em pH acima de 6, a fração AP3A mostrou ser mais ativa que a AP2. Assim, no pH 8, onde a fração AP2 não é mais ativa, a fração AP3A ainda mostra 48% de atividade. A fração AP3B, apesar de ter apresentado um pH ótimo entre 5,1 e 5,5, ainda mantinha cerca de 50% da atividade nos valores de pH 4,0 e 8,0. Resultados semelhantes foram obtidos para a fosfatase ácida das folhas de tabaco (SHAW, 1966) e fosfatase ácida púrpura secretada por células da soja em cultura (LEBANSKY et al., 1992), as quais mantiveram cerca de 80 % da atividade numa ampla faixa de pH 5,0-7,0. No geral, as 4 frações de soja apresentaram valores de pH ótimo compatíveis aos normalmente encontrados na literatura (STASWICK, 1994; KANEKO et alii, 1990; CHING, LIN & METZGER, 1987).



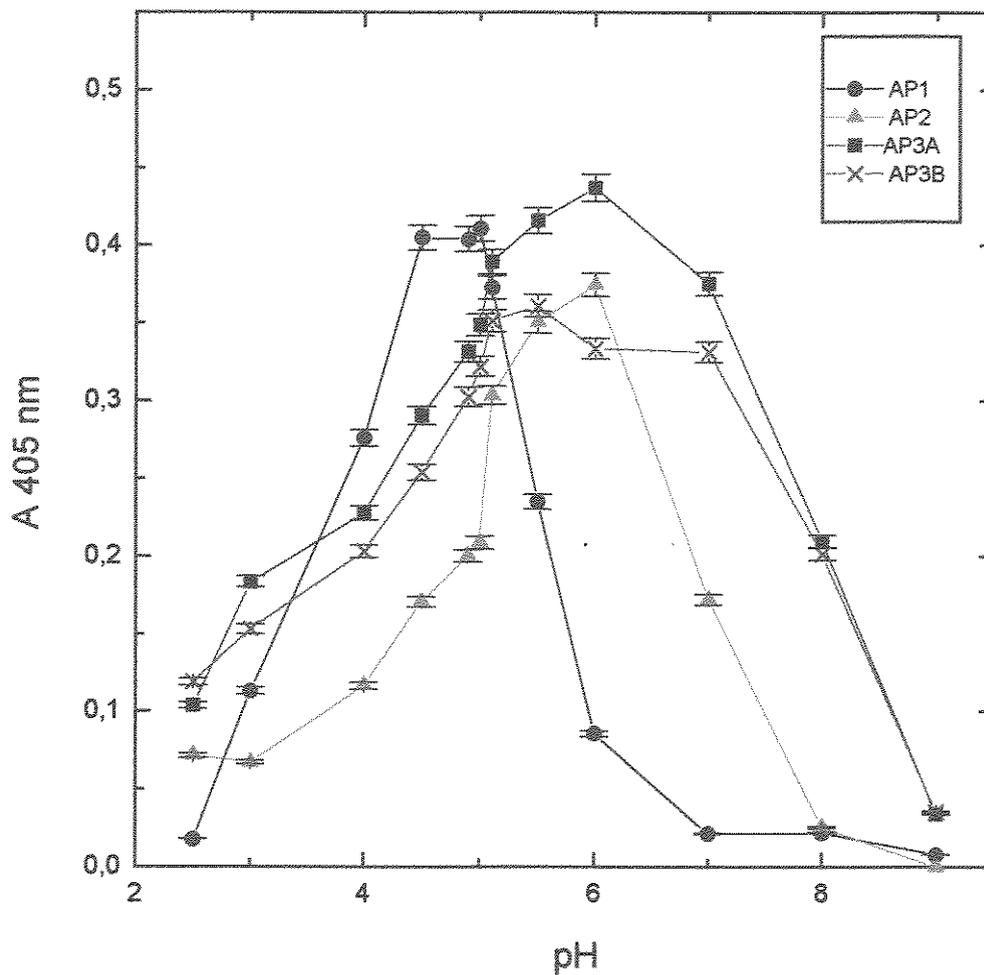
**Figura 23. Efeito do tempo de incubação na atividade das fosfatases ácidas.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em métodos (3.2.1a), utilizando o p-NPP (5mM) como substrato. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,08  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) e o tempo de reação foi de 10 minutos.



**Figura 24. Efeito da concentração da enzima.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos (3.2.1a) utilizando o p-NPP como substrato (5mM) e tempo de reação de 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição do substrato. A - AP1, B - AP2, C - AP3A e D - AP3B.



**Figura.25. Efeito do pH na atividade das enzimas**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Método (3.2.1.a), utilizando o p-NPP (5 mM) como substrato e tempo de reação de 10 minutos. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM, foram: Glicina (pH 2,5 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5), Bis-Tris (pH 6,0), Imidazol (pH 7,0 e 8,0).

#### 4.4.4. Estudo da especificidade por substrato

Neste experimento procurou-se utilizar o maior número de compostos fosforilados disponíveis, principalmente os potencialmente fisiológicos. As 4 frações de soja apresentaram uma ampla especificidade (Tabela 6), como é comum acontecer com fosfatases ácidas de planta (KAWABE, SUGIURA, TERAUCHI & TANAKA, 1984; BASHA, 1984; De-KUNDU & BANERJEE, 1990; BISWAS & CUNDIFF, 1991). Comparando as 4 fosfatases, as frações AP1 e AP2 foram mais específicas do que a AP3A e AP3B (Tabela 6). Dos compostos fosforilados testados em relação ao p-NPP, as primeiras hidrolisaram 33% dos mesmos com uma atividade acima de 50%. Já as outras duas frações, hidrolisaram 90% dos compostos testados, também com atividade acima de 50%. Nenhuma das frações hidrolisou o fitato, eliminando-se assim possíveis contaminações das frações com fitases, enzimas normalmente presentes em plantas (GIBSON & ULLAH, 1988). Apesar da alta atividade de todas as frações para o PPi, a hipótese de se tratar de pirofosfatases foi afastada por três motivos: a presença de cátion, normalmente o  $Mg^{2+}$ , é necessária para a reação catalisada pela pirofosfatase, as mesmas são bastante específicas e normalmente não são inibidas pelo fluoreto (POPLI and SINGH, 1977). Portanto, as 4 frações não são pirofosfatases pois não apresentaram nenhuma das características mencionadas acima (veja adiante).

#### 4.4.5. Determinação de Km e Vmáx.

O efeito da concentração do substrato foi verificado para o p-NPP, Tyr-P e PPi. A escolha destes compostos, baseou-se no fato de que os mesmos foram altamente hidrolisados pelas 4 frações e também pela possibilidade dos dois últimos serem substratos fisiológicos. A determinação de Km e Vmáx foi determinada variando-se a concentração dos substratos de 0,05 até 20 mM. Todas as fosfatases apresentaram uma curva típica de Michaelis-Menten, para esses substratos testados. Normalmente a velocidade máxima era atingida com concentrações dos substratos de cerca de 2 mM. Nos demais ensaios cinéticos as concentrações dos substratos foram fixadas em 5 mM. Os parâmetros cinéticos, Km e Vmáx, foram calculados graficamente (LINEWEAVER-BURK, 1934) (Tabela 7).

Em relação aos valores de Km, para o p-NPP, que é o substrato comumente utilizado nos estudos de fosfatases, as 4 frações apresentaram valores não muito diferentes entre si e próximos aos citados na literatura ( 0,56 mM - embrião de

algodão - BHARGAVA & SACHAR, 1983; 0,07 mM - cotilédones de soja - ULLAH & GIBSON, 1988; 0,3 mM - suspensão de células da soja - LEBANSK et al, 1992; 0,2 mM - semente de papoula - CHUNG and POLYA, 1992). A fração AP1 apresentou valores de  $V_{m\acute{a}x}$  maiores que as demais frações. A fração AP3A parece ter uma maior afinidade pelo substrato p-NPP. Para o PPi, a fração AP2, apresentou uma  $K_m$  maior que as outras frações. No caso da Tyr-P, as frações AP1 e AP2 apresentaram uma  $K_m$  10 vezes maior (1,14 mM) do que as outras duas (AP3A - 0,19 e AP3B - 0,17). Este resultado é interessante, pois os baixos valores de  $K_m$  obtidos para as frações AP3A e AP3B podem sugerir um papel fisiológico para estas enzimas uma vez que as mesmas poderiam regular a atividade de outras enzimas por desfosforilação. Além disso os valores de  $K_m$  para Tyr-P foram diferentes daqueles obtidos para fosfatases de origem animal, as quais apresentaram baixa afinidade por este substrato ( $K_m$  de 14 mM para FAc do coração bovino - ZHANG & VAN ETTEN, 1990;  $K_m$  de 7,9 mM para FAc do rim bovino - GRANJEIRO, 1994;), além disto, as frações AP3A e AP3B, apresentaram praticamente a mesma afinidade para os substratos PPi e Tyr-P. A afinidade da fração AP3B pelo PPi e Tyr-P foi cerca de 2 vezes menor que para o p-NPP

Uma reação enzimática é melhor analisada através da chamada eficiência catalítica, que é a razão entre a  $V_{m\acute{a}x}$  e a  $K_m$ . Assim, por exemplo, apenas pelos valores de  $V_{m\acute{a}x}$ , as frações AP2 e AP3B são aparentemente similares. No entanto, esta última é muito mais eficiente devido aos valores mais baixos de  $K_m$  para os substratos estudados. Pela tabela 6 pode-se observar ainda que, das 4 frações enzimáticas, a AP2 é menos eficiente, o que não se poderia concluir apenas pelos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  ou de  $K_m$ .

A eficiência catalítica das 4 frações com relação aos três substratos estudados pode ser listada da seguinte forma:

**AP1 - p-NPP > PPi > Tyr-P**

**AP2 - p-NPP > Tyr-P = PPi**

**AP3A - PPi > p-NPP = Tyr-P**

**AP3B - p-NPP > Tyr-P = PPi**

Tabela 6  
Especificidade pelo Substrato

Substrato (5 mM)	Atividade Relativa (%)			
	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>	AP <sub>3A</sub>	AP <sub>3B</sub>
Tirosina-P	82 (±3)	80 (±1)	83 (±3)	86 (±1)
Serina-P	24.(±1)	42 (±2)	67 (±1)	59 (±2)
β-Naftil-P	85.(±3)	76 (±1)	108 (±2)	92 (±1)
FMN	32.(±2)	14 (±2)	41 (±2)	49 (±2)
Pirofosfato	67.(±3)	81 (±3)	96 (±4)	78 (±2)
β-Glicero-P	31.(±1)	36 (±1)	77 (±1)	67 (±2)
α-Glicero-P	33.(±1)	22 (±2)	59 (±2)	59 (±1)
Ác. Fítico	10.(±1)	3 (±1)	14 (±1)	17 (±1)
Glicose 1-P	9.(±1)	7 (±1)	47 (±1)	44 (±1)
Glicose 6-P	28.(±1)	6 (±1)	54 (±1)	56 (±2)
AMP	20 (±1)	12 (±1)	56 (±2)	53 (±2)
Frutose 6-P	35 (±2)	14 (±2)	55 (±2)	57 (±1)
Frutose 1,6 di-P	31 (±1)	22 (±1)	58 (±3)	62 (±4)
Ác. P-Glicurônico	55 (±3)	33 (±1)	82 (±1)	72 (±3)

A atividade enzimática foi considerada 100% com o p-NPP como substrato. Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito em métodos 3.2.1.b. Os valores entre parênteses são referentes ao desvio padrão.

**Tabela 7**  
**Parâmetros Cinéticos**

<b>Fração</b>	<b>Substrato</b>	<b>V<sub>máx</sub> (<math>\mu\text{mol}/\text{min}</math>)</b>	<b>K<sub>m</sub> (mM)</b>	<b>V<sub>máx</sub> /K<sub>m</sub></b>
AP1	p-NPP	114,50 ( $\pm 4$ )	0,49 ( $\pm 0,02$ )	233,67 ( $\pm 3$ )
	PPi	72,80 ( $\pm 5$ )	0,51 ( $\pm 0,03$ )	142,74 ( $\pm 4$ )
	Tyr-P	89,88 ( $\pm 2$ )	1,14 ( $\pm 0,06$ )	78,84 ( $\pm 2$ )
AP2	p-NPP	21,82 ( $\pm 1$ )	0,38 ( $\pm 0,02$ )	57,52 ( $\pm 2$ )
	PPi	20,09 ( $\pm 1$ )	1,33 ( $\pm 0,10$ )	15,71 ( $\pm 1$ )
	Tyr-P	21,05 ( $\pm 2$ )	1,14 ( $\pm 0,11$ )	18,46 ( $\pm 2$ )
AP3A	p-NPP	37,04 ( $\pm 2$ )	0,20 ( $\pm 0,01$ )	185,20 ( $\pm 3$ )
	PPi	37,18 ( $\pm 3$ )	0,16 ( $\pm 0,01$ )	232,37 ( $\pm 2$ )
	Tyr-P	34,70 ( $\pm 2$ )	0,19 ( $\pm 0,02$ )	182,63 ( $\pm 2$ )
AP3B	p-NPP	16,37 ( $\pm 1$ )	0,086 ( $\pm 0,01$ )	190,13 ( $\pm 2$ )
	PPi	15,63 ( $\pm 1$ )	0,17 ( $\pm 0,03$ )	91,94 ( $\pm 1$ )
	Tyr-P	16,01 ( $\pm 1$ )	0,17 ( $\pm 0,02$ )	94,18 ( $\pm 2$ )

Os parâmetros cinéticos foram determinados através dos gráficos dos duplos recíprocos de LINEWEAVER-BURK de acordo com o método 3.2.1.b.

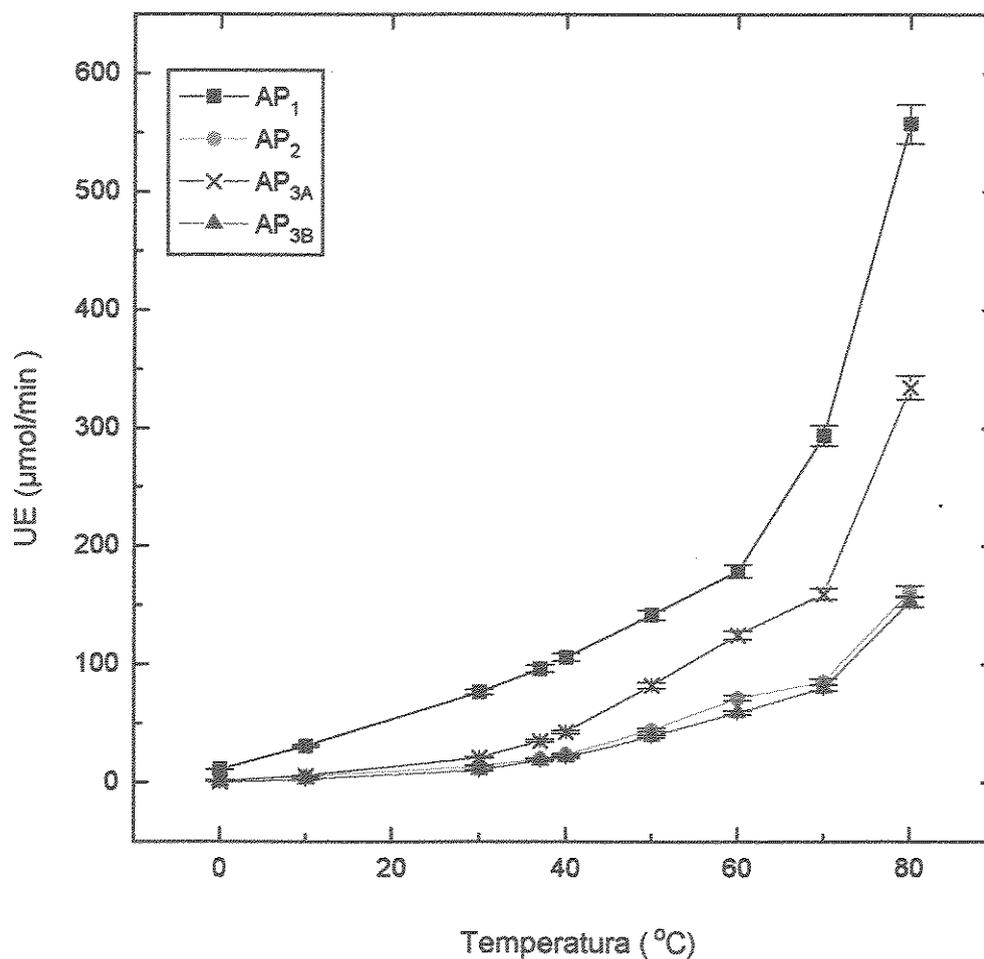
#### 4.4.6. Efeito da temperatura na atividade das fosfatases

Neste ensaio foi feito um controle para cada temperatura, sendo portanto que a hidrólise térmica do p-NPP foi descontada e os resultados obtidos são referentes à hidrólise enzimática deste substrato. A Fig. 26 mostra o efeito da temperatura na atividade das fosfatases ácidas. Este resultado foi bastante interessante, pois nenhum trabalho na literatura cita fosfatases com alta atividade em temperatura acima de 60°C: algodão (50 °C) - BHARGAVA & SACHAR, 1987; cotilédone de soja (60 °C) - ULLAH & GIBSON, 1988. As 4 frações apresentaram alta atividade enzimática numa temperatura em torno de 80°C. Não foi possível determinar a temperatura na qual houvesse queda da atividade, pois realizamos um experimento a 90°C e a atividade ainda foi maior que a 80 °C, só que nesta temperatura a hidrólise espontânea do p-NPP foi grande (Fig. 27). A hidrólise não enzimática do substrato a 90 °C, além de poder modificar a sua concentração inicial (5mM) no meio de ensaio, teria um problema adicional que seria o alto valor da absorbância do controle, o que dificultaria o acerto do “zero” no espectrofotômetro.

Apesar das 4 frações terem apresentado alta atividade a 80 °C, os ensaios cinéticos foram feitos a 37 °C a fim de comparar os nossos resultados com os descritos na literatura, que geralmente são realizados nesta temperatura.

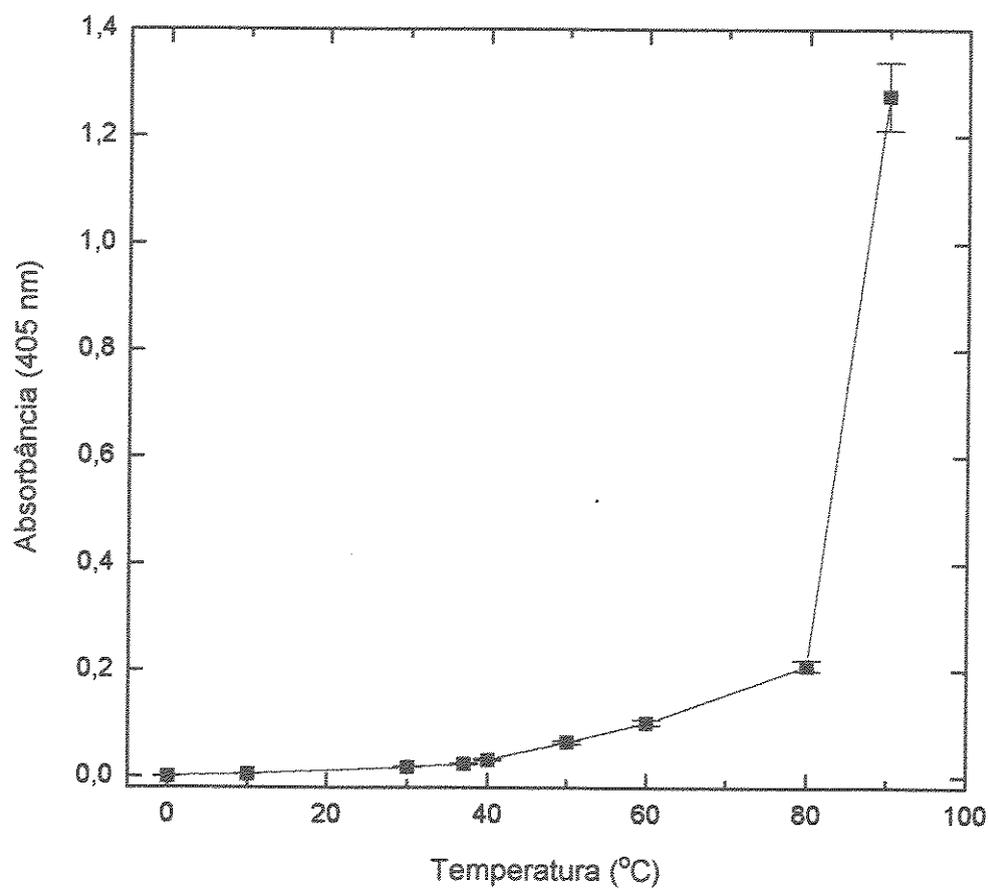
#### 4.4.7. Inativação térmica das fosfatases

A Fig. 28 mostra a inativação térmica das 4 fosfatases quando pré-incubadas em diferentes tempos em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 a 80 °C. Pode-se observar que as enzimas são praticamente inativadas em menos de 5 min quando pré incubadas a 80 °C. A presença do substrato no meio de incubação protege as enzimas desta inativação, uma vez que nesta temperatura, as fosfatases apresentaram alta atividade (Fig. 27). Resultado semelhante foi obtido por ULLAH & GIBSON (1988) para a fosfatase ácida de cotilédones de soja, a qual apresentou atividade máxima a 60 °C, no entanto, quando pré-incubada à 68 °C foi totalmente inativada.



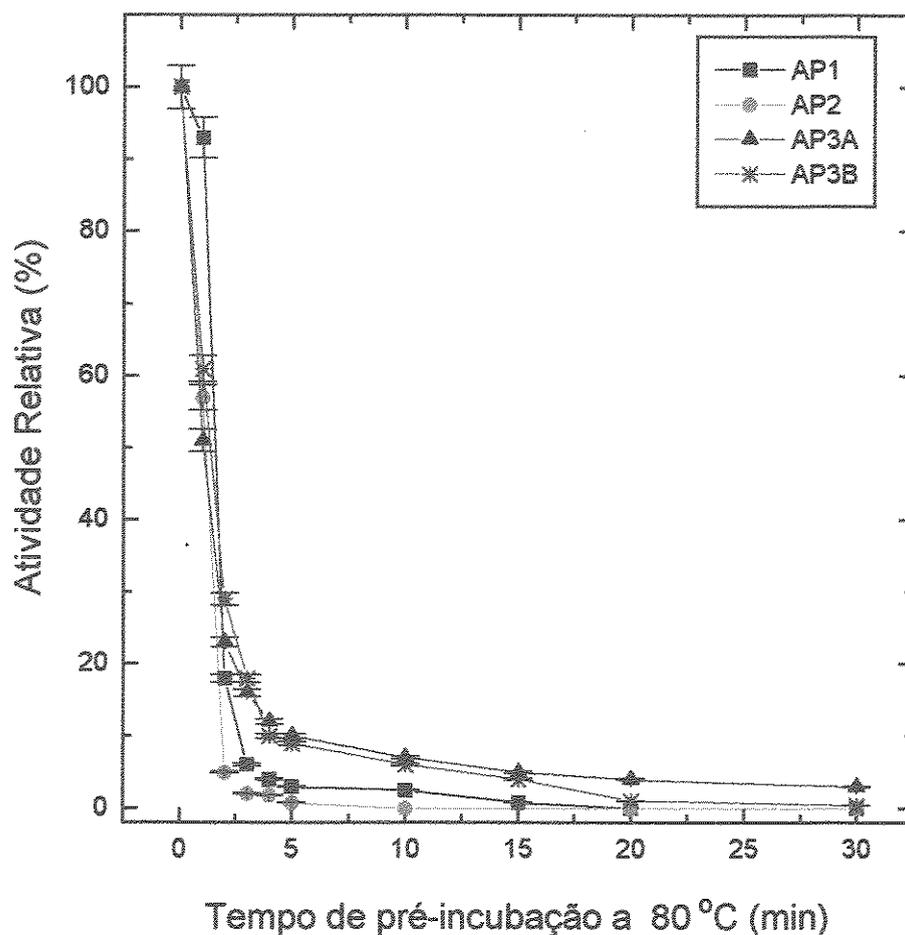
**Figura 26. Efeito da temperatura na atividades das fosfatases ácidas**

O ensaio foi realizado conforme descrito em métodos 3.2.1.a, utilizando o p-NPP (5 mM) como substrato e a reação paralisada após 10 minutos.



**Figura 27. Efeito da temperatura sobre o p-NPP**

O p-NPP foi incubado juntamente com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, num volume final de 1 mL a diferentes temperaturas por 10 minutos, logo após foi adicionado NaOH 1M e a absorbância medida a 405 nm.



**Figura 28. Inativação térmica das fosfatases ácidas**

A enzima foi pré incubada a 80 °C nos tempos indicados e depois deixada a 0 °C logo após a atividade foi determinada conforme descrito em Métodos (3.2.1.a), iniciando-se a reação com o substrato p-NPP (5mM). A atividade enzimática, sem pré-incubação, foi considerada 100%.

#### 4.4.8. Efeito de íons metálicos

Os metais foram testados em 3 concentrações diferentes (0,1, 1 e 10 mM) para que se os mesmos tivessem algum efeito, houvesse a possibilidade de determinar se o efeito seria dose dependente (Tabela 8). Os íons metálicos foram acrescentados ao meio de ensaio e a atividade residual foi determinada conforme método 3.2.1.a. A atividade relativa foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do íon.

A escolha dos metais utilizados neste ensaio foi baseada na literatura, e pode-se separá-los em dois grupos: os que geralmente inibem as fosfatases ácidas por se ligarem aos grupos -SH livres ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ) e os que às vezes têm um efeito ativador (MORAWIECKA et al, 1992) ou que na maioria das vezes não apresentam efeito nenhum ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ). A importância de se testar o  $\text{Mg}^{2+}$  por exemplo, é que o mesmo tem que estar presente no meio de reação para que enzimas como pirofosfatases e fosfatases alcalinas se tornem ativas (KRISHNAN & GNANAM, 1988; MAYER et alii, 1961), o que torna possível diferenciar essas enzimas de fosfatases ácidas.

No caso específico das 4 frações das sementes de soja o  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  não tiveram nenhum efeito. Uma exceção foi a ativação da AP3A e AP3B pelo potássio, independentemente da concentração utilizada. Além disto, houve uma ativação da AP3B, pelo  $\text{Zn}^{2+}$  na concentração de 0,1 mM; concentrações maiores deste metal inibiram as 4 frações enzimáticas. As frações foram inibidas por  $\text{Cu}^{2+}$ , a partir da concentração de 1 mM; somente a fração AP2 foi inibida por  $\text{Fe}^{2+}$  (1mM). De modo geral, estes resultados foram similares aos relatados na literatura (SUGIURA et al, 1981; RENGASAMY, A., SELVAM & GNANAM, 1981; DEKUNDU & BANERJEE, 1990).

#### 4.4.9. Efeito da concentração de NaCl

Além dos íons metálicos estudados nas concentrações citadas anteriormente, testou-se o efeito de NaCl em concentrações maiores. Este estudo foi realizado porque o NaCl tem sido largamente utilizado em processos de extração de fosfatases ligadas à parede celular em concentrações geralmente em torno de 500 a 800 mM, dependendo da fonte, sem causar alteração na atividade da enzima ou das propriedades eletroforéticas. HASEGAWA et alii (1976) demonstraram que a

capacidade do NaCl para liberar fosfatases ácidas da parede celular é dependente da sua concentração. No caso da fosfatase ácida das raízes do trigo, uma concentração de 0,8 M de NaCl, resultou em um aumento da liberação da fosfatase ligada à parede celular. Outros cátions como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  não tiveram efeito apreciável na extração desta enzima.

A variação da força iônica no meio de reação, não teve efeito significativo na atividade das 4 frações (Fig. 29). As fosfatases AP3A e AP3B, praticamente não tiveram suas atividades alteradas, pois com 500 mM de NaCl, ainda obteve-se 90% da atividade das mesmas. A AP1, até 200 mM de NaCl não apresentou variação na sua atividade, mas em concentrações acima, houve uma perda de aproximadamente 35% da atividade. A AP2, apresentou um leve decaimento da atividade desde a adição de 5 mM de NaCl, mesmo assim, com 500 mM deste sal a enzima ainda apresentou 60% da sua atividade. Estes resultados mostram que a concentração de NaCl até 500 mM não interfere de forma significativa na atividade das 4 frações.

#### 4.4.10. Efeito de potenciais inibidores

Quanto ao estudo de inibidores, as 4 frações foram inibidas pelo o- e m-Vanadato (análogos do fosfato), molibdato (potente inibidor), fosfato e fluoreto (Tabela 9). O tartarato (5mM) não apresentou nenhum efeito na atividade enzimática. A insensibilidade ao tartarato é comum em fosfatases ácidas de plantas (ROSSI et alii, 1981, PASQUALINI et al, 1992 FUJISAWA et al, 1993).

O p-CMB somente inibiu as 4 frações em uma concentração de 1 mM ao contrário das fosfatases ácidas de baixa massa molecular de animal que são completamente inibidas com uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  (BALDIJÃO, et alii, 1975; BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1976; DAVIS & VAN ETTEN, 1992; GRANJEIRO, 1994). A inibição das 4 frações pelo p-CMB e molibdato se deu pelo fato de que estes reagentes se ligam especificamente a grupos -SH livres essenciais para a catálise enzimática. Entretanto o molibdato apresentou um poder de inibição bem maior do que o p-CMB, pois numa concentração 10 vezes menor inibiu cerca de 90% da atividade de todas as frações, enquanto o p-CMB nesta concentração não teve efeito. Provavelmente o tipo de conformação estrutural das frações permitiu a interação do molibdato com os grupos -SH mais facilmente do que com o p-CMB pelo fato do mesmo (p-CMB) apresentar em sua molécula um anel.

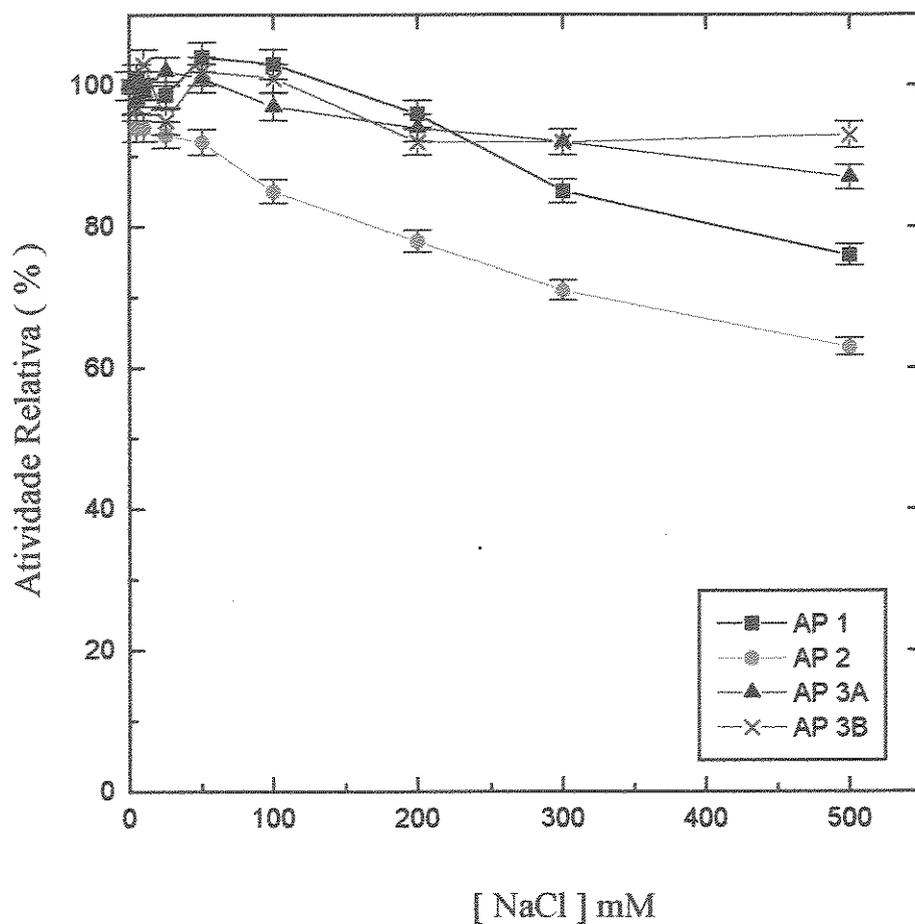
A não inibição das enzimas pelo piridoxal 5-P indica que provavelmente as mesmas não apresentam resíduo de lisina essencial para a catálise, pois este composto forma base de schiff com esses resíduos impedindo a catálise enzimática. Normalmente quando se testa o piridoxal 5-P, testa-se também os seus análogos (piridoxamina 5-P e piridoxina 5-P) pois os mesmos não apresentam esse mesmo comportamento sobre fosfatases ácidas (SAEED et alii, 1988). A riboflavina foi testada por ser o produto da hidrólise da FMN, reação catalisada por certas fosfatases ácidas, para verificar se o mesmo (produto da reação) poderia ser um inibidor assim como o fosfato.

Tabela 8

## Efeito de íons metálicos na atividade das fosfatases ácidas

Íon Metálico (mM)		Atividade Relativa (%)			
		AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>	AP <sub>3A</sub>	AP <sub>3B</sub>
Mn <sup>2+</sup>	0,1	98 (±4)	96 (±2)	112 (±2)	104 (±3)
	1,0	91 (±5)	89 (±3)	95 (±4)	91 (±2)
	10,0	80 (±3)	75 (±4)	86 (±2)	80 (±3)
Cu <sup>2+</sup>	0,1	87 (±2)	79 (±5)	91 (±4)	100 (±4)
	1,0	41 (±2)	33 (±2)	57 (±3)	57 (±2)
	10,0	19 (±2)	14 (±2)	30 (±2)	34 (±1)
Ca <sup>2+</sup>	0,1	102 (±5)	94 (±3)	105 (±5)	102 (±2)
	1,0	105 (±3)	92 (±4)	103 (±4)	103 (±2)
	10,0	108 (±2)	100 (±)	102 (±3)	108 (±2)
Fe <sup>2+</sup>	0,1	97 (±5)	91 (±3)	96 (±2)	95 (±4)
	1,0	97 (±4)	47 (±2)	80 (±3)	79 (±3)
	10,0	78 (±2)	25 (±2)	67 (±3)	54 (±2)
Mg <sup>2+</sup>	0,1	93 (±3)	100 (±3)	103 (±5)	100 (±3)
	1,0	100 (±4)	91 (±3)	102 (±4)	103 (±5)
	10,0	91 (±2)	93 (±4)	102 (±3)	103 (±4)
Zn <sup>2+</sup>	0,1	88 (±1)	98 (±3)	112 (±4)	121 (±2)
	1,0	43 (±1)	57 (±5)	82 (±2)	88 (±4)
	10,0	63 (±2)	13 (±2)	25 (±1)	30 (±3)
K <sup>+</sup>	0,1	104 (±4)	111 (±3)	119 (±5)	125 (±6)
	1,0	96 (±4)	106 (±2)	116 (±4)	130 (±7)
	10,0	98 (±2)	104 (±3)	120 (±3)	127 (±6)

Os metais foram adicionados ao meio de ensaio e atividade enzimática determinada como descrita em método 3.2.1.a. A atividade foi considerada como 100% na ausência do metal. Os valores entre parênteses mostram os valores dos desvios padrões.



**Fig. 29. Efeito da concentração de NaCl na atividade das fosfatases ácidas.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos (3.2.1a), utilizando o p-NPP (5mM) e tempo de reação de 10 minutos.

Tabela 9

**Efeito de potenciais inibidores na atividade das fosfatases ácidas**

Inibidor	Atividade Relativa (%)			
	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>	AP <sub>3A</sub>	AP <sub>3B</sub>
o-Vanadato 100 µM	25 (±2)	47 (±2)	59 (±3)	63 (±1)
m-Vanadato 100 µM	28 (±1)	43 (±2)	57 (±2)	62 (±2)
p-CMB 100 µM	100 (±4)	104 (±3)	106 (±2)	102 (±4)
p-CMB 1 mM	31 (±2)	77 (±2)	84 (±4)	66 (±3)
Molibdato 100 µM	2 (±1)	5 (±2)	6 (±1)	13 (±3)
Pi 1 mM	73 (±4)	84 (±3)	86 (±2)	88 (±4)
Pi 10 mM	18 (±2)	26 (±2)	32 (±2)	41 (±3)
Tartarato 5 mM	98 (±3)	101 (±4)	102 (±5)	101 (±4)
Piridoxal-5P 100 µM	102 (±4)	97 (±5)	94 (±3)	96 (±2)
Piridoxina-5P 100 µM	103 (±3)	89 (±4)	97 (±3)	100 (±4)
Piridoxamina 100 µM	100 (±3)	93 (±3)	97 (±5)	99 (±3)
Riboflavina 100 µM	110 (±4)	107 (±4)	97 (±6)	101 (±4)
NaF 1 mM	72 (±3)	37 (±1)	38 (±5)	52 (±4)
NaF 5 mM	32 (±2)	15 (±2)	14 (±4)	22 (±3)

A atividade enzimática sobre o p-NPP (5mM) foi considerada 100% na ausência do composto e determinada como descrito em método 3.2.1.a. Os valores dos desvios padrões estão indicados entre parênteses.

#### 4.4.11. Efeito de compostos na atividade das fosfatases.

Os trabalhos encontrados na literatura mostrando estudos cinéticos de fosfatases ácidas de várias fontes, relatam que alguns compostos podem alterar a atividade destas enzimas, seja ativando ou inibindo. Neste experimento foram testados alguns destes compostos verificando o efeito dos mesmos na atividade das 4 frações (tabela 10).

Reagentes redutores de grupos sulfidrilas como DTT, GSH e  $\beta$ -mercaptoetanol, não apresentaram efeito sobre a atividade das frações. Estes reagentes às vezes podem causar um aumento da atividade enzimática por poderem proteger da oxidação os seus grupos -SH essenciais para a catálise.

A guanosina ao contrário da adenina, normalmente é um ativador das fosfatases de baixo peso molecular (GRANJEIRO, 1994; TANIZAKI, BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1977; DISSING, RANGAARD & CHRISTENSEN, 1993), mas não apresentou este efeito para as 4 frações. Estas enzimas não foram inibidas pelo EDTA o que mostra que essas frações não dependem de metal para catalisar a reação.

As 4 frações também não catalisaram reação de transfosforilação, uma vez que nenhuma ativação e sim inibição foi observada na presença de aceptores de fosfato (metanol, etanol e glicerol); sacarose, glicose e lactose foram testadas para verificar se esses açúcares serviriam como aceptores de fosfato nesta reação. SDS inibiu completamente as 4 frações; esta inibição é devido a alteração da estrutura terciária das proteínas, pois este detergente faz com que seus resíduos hidrofóbicos fiquem expostos. Exceção para este tipo de inibição foi vista para a fosfatase ácida do feijão, que na concentração de 0,1% deste detergente, apresentou ainda 72% da atividade (DE-KANDU & BANERJEE, 1990). Já o triton não teve efeito na atividade das frações AP2, AP3A e AP3B. Entretanto causou uma ativação de 42% na fração AP1, ativação esta, comumente encontrada em fosfatases de origem animal e algumas vezes em plantas (GRANJEIRO, 1994; PANARA et alii, 1992).

Tabela 10

**Efeito de vários compostos na atividade das fosfatases ácidas.**

Composto	Atividade Relativa (%)			
	AP1	AP2	AP3A	AP3B
DTT 1 mM	92 ( $\pm$ 3)	99 ( $\pm$ 4)	93 ( $\pm$ 4)	96 ( $\pm$ 3)
GSH 1 mM	110 ( $\pm$ 2)	97 ( $\pm$ 4)	92 ( $\pm$ 3)	99 ( $\pm$ 4)
$\beta$ -Mercaptoetanol 1 mM	71 ( $\pm$ 3)	95 ( $\pm$ 4)	90 ( $\pm$ 5)	100 ( $\pm$ 2)
Guanosina 1 mM	103 ( $\pm$ 3)	108 ( $\pm$ 2)	94 ( $\pm$ 3)	105 ( $\pm$ 2)
Adenina 1 mM	113 ( $\pm$ 4)	103 ( $\pm$ 2)	91 ( $\pm$ 4)	97 ( $\pm$ 3)
EDTA 5 mM	103 ( $\pm$ 2)	100 ( $\pm$ 1)	94 ( $\pm$ 2)	98 ( $\pm$ 3)
Sacarose 15 mM	110 ( $\pm$ 3)	103 ( $\pm$ 2)	88 ( $\pm$ 4)	101 ( $\pm$ 2)
Glicose 15 mM	106 ( $\pm$ 2)	83 ( $\pm$ 1)	81 ( $\pm$ 4)	89 ( $\pm$ 3)
Lactose 15 mM	111 ( $\pm$ 5)	88 ( $\pm$ 2)	88 ( $\pm$ 3)	94 ( $\pm$ 4)
Metanol 10%	73 ( $\pm$ 3)	86 ( $\pm$ 3)	74 ( $\pm$ 4)	87 ( $\pm$ 6)
Etanol 10%	92 ( $\pm$ 3)	92 ( $\pm$ 5)	81 ( $\pm$ 2)	90 ( $\pm$ 4)
Glicerol 2 M	96 ( $\pm$ 4)	78 ( $\pm$ 4)	74 ( $\pm$ 4)	75 ( $\pm$ 5)
BSA 0,1 mg/mL	146 ( $\pm$ 5)	108 ( $\pm$ 3)	97 ( $\pm$ 5)	106 ( $\pm$ 4)
SDS 0,05%	3 ( $\pm$ 2)	5 ( $\pm$ 1)	7 ( $\pm$ 3)	10 ( $\pm$ 4)
Triton X-100 0,2%	142 ( $\pm$ 5)	110 ( $\pm$ 2)	99 ( $\pm$ 4)	110 ( $\pm$ 2)

O composto foi adicionado ao meio de ensaio e atividade determinada como descrito em método 3.2.1.a, sendo que na ausência do mesmo a atividade sobre o p-NPP (5mM) foi considerada como 100%. Os valores entre parênteses mostram os valores dos desvios padrões.

De acordo com os resultados cinéticos ficou constatado que as 4 frações purificadas a partir das sementes de soja quiescentes não apresentaram diferenças significativas em suas propriedades cinéticas nas condições que foram utilizadas nos ensaios. Resultados semelhantes foram obtidos por HASEGAWA et alii (1976) que observaram que as 5 frações contendo atividade fosfatásica obtidas das raízes do trigo apresentaram o mesmo comportamento frente aos substratos e compostos testados por eles. Já as duas frações (AP1 e AP2) purificadas por DE-KUNDU & BANERJEE (1990), a partir das sementes de feijão, apresentaram diferença na estabilidade térmica; a fração AP2 manteve cerca de 80% da sua atividade quando pré incubada por 30 minutos a 55°C, no entanto a fração AP1 cerca de 20% da sua atividade nas mesmas condições. Nos outros estudos realizados por estes autores as 2 frações apresentaram praticamente o mesmo comportamento.

## 5. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho, são estimulantes no sentido de realizar estudos cinéticos mais detalhados das frações AP1, AP2, AP3A e AP3B. Estes estudos são de fundamental importância, pois como foi mencionado no início, pouco se sabe sobre o mecanismo de reação e papel fisiológico desta classe de enzimas (fosfatases ácidas), o que torna indispensável estudos minuciosos com enzimas purificadas de várias fontes, a fim de se obter o maior número de dados possível visando-se entender mais o mecanismo de reação destas enzimas.

Primeiramente, será interessante estudar com detalhes a estabilidade térmica das 4 frações, pois como foi mostrado, as mesmas a 80 °C, apresentaram alta atividade, comportamento atípico para outras fosfatases ácidas de planta. Outro ponto, é realizar estudos de eletroforese em condições não desnaturantes e corar o gel para detecção de carboidratos, proteína e atividade enzimática, pois assim poderá ser confirmado se as frações AP2, AP3A e AP3B são glicoproteínas. Outro experimento que poderá ser feito com a fração AP1 e com as outras 3 frações, caso as mesmas sejam glicoproteínas, é determinar a porção de carboidrato e em seguida realizar alguns estudos cinéticos e eletroforéticos após deglicosilação das 4 frações, no sentido de verificar possíveis influências da presença de carboidratos. Como foi relatado na introdução, lectinas podem ter efeito ativador em fosfatases que apresentam porção de carboidrato. Assim, um estudo interessante será verificar o efeito de algumas lectinas na atividade das mesmas.

Ainda com relação a estudos cinéticos pode-se investigar o efeito dos compostos testados neste trabalho que causaram inibição das enzimas, fazendo a pré-incubação dos mesmos com as frações, verificando-se assim se o substrato poderia proteger estas enzimas desta inibição, como ocorreu com a proteção destas frações da inativação térmica pelo p-NPP. Além disto os trabalhos de fosfatases ácidas de plantas encontrados na literatura, normalmente não mostram estudos detalhados de inibição. A determinação de  $K_i$  dos inibidores descritos nesta tese e de outros compostos que possam atuar como inibidores, assim como o tipo de inibição são importantes nos estudos do mecanismo de reação enzimática. Poderá ser feito também estudos cinéticos com substratos fisiológicos, tais como PPI, tirosina fosfato, etc..

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIÑO J.PÉREZ-CALLEJÓN, E., CUNILLERA, N., CAMPS, M., POSAS, F. & FERRER, A.(1993) - **Protein phosphatases in higher plants: multicplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana***, *Plant Mol. Biol.*, 21: 475-485.
- BALDIJÃO, C. E. M., GUIJA, E., BITTENCOURT, H. M. S. & CHAIMOVICH, H. (1975) - **Steady state kinetics and effect of SH inhibitors on acid phosphatase from bovine brain**, *Biochim. Biophys. Acta*, 391: 316-325.
- BASHA, S.M. (1984) - **Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed**, *Can. J. Bot.*, 62:385-91.
- BARRETT-LENNARD, E. G., ROBSON, A. D. & GREENWAY H. (1982) - **Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves**, *J. Exp. Bot.*, 33:682-693.
- BECK, J. L., McCONCHIE, L. A., SUMMORS, A. C., ARNOLD, W, N., De JERSEY & ZERNER, B, (1986) - **Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme**, *Biochim. Biophys. Acta*, 869: 61-68.
- 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.
- BITTENCOURT, H. &CHAIMOVICH, H. (1976) - **Importance of SH groups in catalysis by bovine brain acid phosphatase**, *Biochim. Biophys. Acta*, 438: 153-158.
- BOROUGHES, H. (1954) - **Studies on the acid phosphatases of green leaves**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49:30-42.

- BUDDE, R.J.A. & CHOLLET, R. (1988) - **Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation**, *Physiol. Plant.*, 72:435-439.
- CHAIMOVICH, H. & NOME, F. (1970) - **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
- CHENG, H.-F. & TAO, M. (1989) - **Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings**, *Biochim. Biophys. Acta*, 998:271-276.
- CHING, T. M., LIN, T. P. & METZGER, R. J. (1987) - **Purification and properties of acid phosphatase from plump and shriveled seeds of triticale**, *Plant Physiol.*, 84:789-795.
- CHUNG, R. P-T. & POLYA, G. M. (1992) - **Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities**, *Plant Sci.*, 84: 153-162.
- COHEN, P. (1989) - **The structure and regulation of protein phosphatases**, *Ann. Rev. Biochem.*, 58:453-508.
- CONRAD, F. & RÜDIGER, H. (1994) - **The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase**, *Phytochemistry*, 30:277-283.
- DASSA, E. CAHU, M., DESJOYAU-CHEREL B. & BOQUET, P. L. (1982) - **The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli***, *J. Biol. Chem.*, 257:6669-6676.
- DAVIS, J. P., ZHOU, M. & VAN ETTEN, R. L. (1992) - **Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase**, *J. Biol. Chem.*, 269: 8734-8740.
- De ARAÚJO, P.S.; MIES, V. & MIRANDA, O. (1976) - **Subcellular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases**, *Biochim. Biophys. Acta*, 452:121-30.

- DE-KUNDU, P. & BANERJEE, A.C. (1990) - **Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *Vigna radiata***, *Phytochemistry*, 29:2825-2828.
- De-LEO, P. & SACHER J. A. (1970) - **Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections**, *Plant Physiol.*, 46: 806-811.
- DEWALD D. B., MASON H. S. & MULLET J. E. (1993) - **The soybean vegetative storage proteins VSP $\alpha$  and VSP $\beta$  are acid phosphatases active on polyphosphates**, *J. Biol. Chem.*, 267: 15958-15964.
- DI PIETRO, D.L. & ZENGERLE, F.S. (1967) - **Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta**, *J. Biol. Chem.*, 242:3391-3396.
- DIBENEDETO, G. & COZZANI, I. (1975) - **Nonspecific acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe***, *Biochemistry*, 14: 2847-2852.
- DISSING, J. & SVENSMARK, O. (1990) - **Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B and C isozymes**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1041 232-242.
- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1989) - **Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells**, *Plant Physiol.*, 90: 734-741.
- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1991) - **Purification, characterization and subcellular localization of and acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase**, *Arch. Biochem. Biophys.* 286:226-232.
- DUFF, S. M. G., SARATH, G. & PLAXTON, W. C. (1994) - **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism**, *Physiol. Plant.*, 90:791-800.
- FERENS, M. & MORAWIECKA, B. (1985) - **Rye germ acid phosphatase: properties of the enzyme and its activation by lectins**, *Phytochemistry*, 24:2839-2842.

- FISHER, L. (1969) - **An introduction to gel chromatography**. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. I. Edited by T. S. Work and E. Work.
- FUJIMOTO, S., URATA, Y., NAKAGAWA, T. & OHARA, A. (1984) - **Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex**, *J. Biochem.*, 96:1079-1088.
- FUJISAWA, K., KATSUMATA, Y. & YOSHINO M. (1993) - **Human seminal phosphatase: properties and comparison with plant phosphatases**, *Int. J. Biochem.*, 25: 627-630.
- GABARD, K. A. & JONES, R. L. (1986) - **Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley**, *Physiol. Plant.*, 67: 182-192.
- GALKA, M. DZIEMBOR-GRYSZKIEWICZ, D., KOS, S. & OSTROWSKI, W. (1980) - **Properties of low-molecular-weight acid phosphatases isolated from cytosol and chromatin of rat liver**, *Acta Biochim. Polon.*, 27:281-293.
- GELLATLY, K., MOORHEAD, G. B. G., DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1993) - **Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase**, *Plant. Physiol.*, 102:S-27.
- GIBSON, D. M. & ULLAH, A. H. J. (1988) - **Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 503-513.
- GOMES, P. B. (1978) - **Caracterização e comparação de fosfatases ácidas**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química/U.S.P..
- GONZÁLEZ, F. J., FAUSTE, C., BURGUILLO, F. J. & DOMINGUEZ A. (1993) - **Kinetic behaviour of a repressible acid phosphatase from the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1162: 17-27.

- GRANJEIRO, J. M. (1994) - **Purificação e caracterização da fosfatase ácida do rim bovino**, Tese de mestrado, Instituto de Biologia/UNICAMP.
- HAN, S. W., MICHELIN, M. A., BARBOSA, J. E. & ROSSI, A. (1994) - **Purification and constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa***, *Phytochemistry*, 30: 1131-1135.
- HARAGUCHI, H., YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA T. (1990) - **Multiple forms of acid phosphatase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings: immunological detection and quantitation**, *Plant Cell Physiol.*, 31: 917-923.
- HARTREE, E.F. (1972) - **Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response**, *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- HASEGAWA, Y., LYNN, K. R. & BROCKBANK W. J. (1976) - **Isolation and partial characterization of cytoplasmic and wall-bound acid phosphatases from wheat roots**, *Can. J. Bot.* 54:1163-1169.
- HAYMAN, A.R. WARBURTON, M. J., PRINGLE, J. A. S., COLES, B. & CHAMBERS T. J. (1989) - **Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclasts**, *Biochem. J.* 261:601-609.
- HEFLER, S. K. & AVERILL, B. A. (1987) - **The “manganese(III)-containing” purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146:1173-1177.
- HELWIG, J.J., FAROOQUI, A. A., BOLLACK, C. & MANDEL, P. (1977) - **Distribution of lysosomal hydrolases in glomerular and tubular fractions of rabbit kidney cortex**, *Int. J. Biochem.*, 8:323-327.
- HSU, R. Y., CLELAND, W. W. & ANDERSON, L. (1966) - **Mechanism of action of the nonspecific phosphomonoesterase from potatoes**, *Biochemistry*, 5: 799-807.
- JACOB, J.L. & SONTAG, N. (1974) - **Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis***, *Biochimie*, 56:1315-1322.

- 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.
- KANELLIS, A. K., SOLOMOS, T. & MATTOO A. (1989) - **Changes in sugars, enzymic activities and acid phosphatase isoenzyme profiles of bananas ripened in air or stored in 2,5% O<sub>2</sub> with and without ethylene**, *Plant Physiol.*, 90: 251-258.
- KAWABE, H., SUGIURA, Y., TERAUCHI, M. & TANAKA, H. (1984) - **Mn(III)-containing acid phosphatase: Properties of Fe(III)-substituted enzyme and function of Mn(III) and Fe(III) in plant and mammalian acid phosphatases**, *Biochem. Biophys. Acta*, 784: 81-89.
- KORN, E. D. & WRIGHT, P. L.(1973) - **Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane**,*J. Biol. Chem.*, 248:439-447.
- KREBS, E.G. & BEAVO, J.A. (1979) - **Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes**, *Ann. Rev. Biochem.*, 48:923-959.
- KRISHNAN, V. A. & GNANAM, A. (1988) - **Properties and regulation of Mg<sup>2+</sup>-dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from Sorghum vulgare leaves**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260:277-284.
- 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.
- LAIDLER, P. M., TAGA, E. M. & VAN ETTEN, R. L. (1982) - **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 512-521.
- LAU, K.-H.W.; FARLEY, J.R. & BAYLINK, D.J. (1987) - **Bone acid phosphatase is a neutral pH phosphotyrosyl protein phosphatase**, *Adv. Prot. Phosphatases*, 4:165-198.
- LAWRENCE, G. L. & VAN ETTEN, R. L. (1981) - **The low-molecular-weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition and chemical modifications studies**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206:122-131.

- LAYNE, E. (1957) - **Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins**, *Meth. Enzymol.* III:447-454.
- 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.
- LEFEBVRE, D. D., DUFF, S. M. G., FIFE, C., PLAXTON, W. C. (1990) - **Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate**, *Plant Physiol.* 93:504-511.
- LIN, M. F., LEE, C., LI, S. S. L. & CHU, T. M. (1983) - **Purification and characterization of a new human prostatic acid phosphatase isoenzyme**, *Biochemistry*, 22:1055-1062
- LIN, P.P.C. & KEY, J.L. (1980) - **Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties and substrate specificities**, *Plant Physiol.*, 66:360-367.
- LINEWEAVER & BURK, D. (1934) - **The determination of enzyme dissociation constants**, *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-666.
- LOVELACE, J.K.; DWYER, D.M. & GOTTLIEB, M. (1986) - **Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani***, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20:243-251.
- 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.
- MacKINTOSH, C. & COHEN, P. (1989) - **Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants**, *Biochem. J.*, 262:335-339.

- MacKINTOSH, C.; COGGINS, J. & COHEN, P. (1991) - **Plant protein phosphatases: Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major quinate dehydrogenase phosphatase**, *Biochem. J.*, 273:733-738.
- MAYER F. C., CAMPBELL, R. E., SMITH, A. K. & MCKINNEY, L. L. (1961) - **Soybean phosphatase. Purification and properties**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 301-307.
- MIERNYK, J.A., 1992 - **Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures**, *Phytochemistry*, 31:2613-2616.
- MORRIS, M. F., WAHEED, A., RISLEY, J. M. & VAN ETTEN, R. L. (1989) - **Carbohydrate removal fails to eliminate the heterogeneity of human prostatic acid phosphatase**, *Clin. Chim. Acta*, 182:9-20.
- NEUMAN, H. (1968) - **Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase**, *J. Biol. Chem.*, 243:4671-4676.
- NISHIMURA, M. & BEEVERS, H. (1978) - **Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm**, *Plant. Physiol.*, 62:44-48.
- 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.
- PAN, S. (1987) - **Characterization of multiple acid phosphatase in salt-stressed spinach leaves**, *Aust. J. Plant. Physiol.*, 14: 117-124.
- PANARA, F.; PASQUALINI, S. & ANTONIELLI, M. (1990) - **Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme**, *Biochim Biophys. Acta*, 1037:73-80.
- PARK, H.-S.C. & VAN ETTEN, R.L. (1986) - **Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase**, *Phytochemistry*, 25(2):351-357.

- PASQUALINI, S., PANARA, F., BRACARDI, P. & ANTONIELLI, M. (1992) - **High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles**, *Phytochemistry*, 31:3703-3706.
- PAUL, E. M. & WILLIAMSON, V. M. (1987) - **Purification and properties of acid phosphatase-1 from a Nematode Resistant Cultivar**, *Plant Physiol.*, 84: 399-403.
- POLYA, G.M. & HARITOU, M. (1988) - **Purification and characterization of two wheat-embryo protein phosphatases**, *Biochem. J.*, 251:357-363.
- POPLI, S. & SINGH, R. (1977) - **Alkaline inorganic pyrophosphatase from guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) cotyledons**, *Phytochemistry* 16: 885-888.
- RANDALL, D. D., TOLBERT, N. E. & GREMEL, D. (1971) - **3-Phosphoglycerate phosphatase in plants II. Distribution, physiological considerations and comparison P-glycolate phosphatase**, *Plant Physiol.*48:480-487.
- REID, T. W. & WILSON, I. B. (1971) - ***E. coli* alkaline phosphatase**. In *The Enzymes*, 2<sup>nd</sup>, IV:375-415. edited by Boyer, P. D. Academic Press., N. Y..
- REISFELD, R. A., LEWIS, V. J. & WILLIAMS, D. E. (1962) - **Disk electrophoresis of basis proteins and peptides on polyacrylamide gels**, *Nature*, 195:281-283.
- REMALEY, A. T., KUHNS, D. B, BASFORD, R. E., GLEW, R. H. & KAPLAN, S. S. (1984) - **Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub> production**, *J. Biol. Chem.*, 25: 11173-11175.
- 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.
- ROBERTS, D.W.A. (1956) - **The wheat leaf phosphatases. II. Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5.5**, *J. Biol. Chem.*, 222:259-270.
- ROCHE, M. J. (1931) - **Sur les phosphatases du sang**, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 13:841-856.

- 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.
- SAEED, A., TREMORI, E., MANAO, G., CAMICI, G., CAPPUGI, G. & RAMPONI, G. (1990) - **Bovine brain Low M<sub>r</sub> acid phosphatase: Purification and properties**, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 22: 81-94.
- SCHELL, D., STIERHOF, Y.-D. & OVERATH, P. (1990) - **Purification and characterization of tartrate-sensitive acid phosphatase of *Trypanosoma brucei***, *FEBS Lett.*, 271:67-70.
- SHAW, J.G. (1966) - **Acid phosphatase from tobacco leaves**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117:1-9.
- SHIBKO, S. & TAPPEL, A.L. (1963) - **Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver**, *Biochim. Biophys. Acta* 73:76-86.
- SLACK, C.R.; HATCH, M.D. & GOODCHILD, D.J. (1969) - **Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis**, *Biochem. J.*, 114:489-498.
- STASWICK, P. E., PAPA, C., HUANG, J. & RHEE, Y. (1994) - **Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal**, *Plant Physiol.*, 104:49-57.
- STROTHER, S., SINGH, M., BERESFORD, G. & KNOX R. B. (1985) - **Phosphatases from pollen of *Brassica campestris* and *Lilium regale***, *Phytochemistry*, 24:1447-1449.
- 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(20): 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.**

TAGA, E.M. (1979) - **Fosfatase ácida de fígado de cobaia: purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades. Tese de Doutorado, Instituto de Química/USP.**

TAGA, E.M. & VAN ETEN R.L. (1982) - **Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 214:505-515.**

TANIZAKI, M. M., BITTENCOURT, H. M. S. & CHAIMOVICH, H. (1977) - **Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol, *Biochem. Biophys. Acta.*, 485: 116-123.**

THEODOROU, M. E. & PLAXTON, W. C. (1993) - **Metabolic adaptations of respiration to nutritional phosphate deprivation, *Plant Physiol.*, 101: 339-344.**

TREWAVAS, A. (1976) - **Post-translational modification of proteins by phosphorylation, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 27:349-374.**

UEHARA, K.; FUJIMOTO, S. & TANIGUCHI, T. (1974) - **Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato: Purification and some physical properties, *J. Biochem.*, 75:627-638.**

UEKI, K. & SATO, S. (1977) - **Regulation of phosphatase synthesis by orthophosphate in cultured tobacco cells, *Plant Cell Physiol.*, 18: 1253-1263.**

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.**

VICENT, J. B., CROWDER, M. W. & AVERILL B. A. (1992) - **Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 105-110.**

- VÖGELLI-LANGE, R., HOLLÄNDER-CZYTKO & AMRHEIN N. (1989) - **Characterization and subcellular compartmentation of acid phosphatases in glyphosate-treated buckwheat cell cultures**, *Plant Sci.*, 64: 259-266.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969) - **The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresys**, *J. Biol. Chem.*, 244:4406-4412.
- YAMAGATA, H., TANAKA, K. & KASAI, Z. (1980) - **Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains**, *Plant & Cell Physiol.*, 21: 1449-1460.
- YANG, C.-M.; DANKO, S.J. & MARKWELL, J.P. (1987) - **Thylakoid acid phosphatase and protein phosphatase activities in wheat (*Triticum aestivum* L.)** *Plant. Sci.*, 48:17-22.
- YUPSANIS, T., ELEFThERIOU, P., PANTAZAKI, A. & GEORGATSOS J. G. (1993) - **Multiplicity of metal-independent protein phosphatases of germinated alfalfa seeds**, *J. Plant Physiol.*, 141:257-262.
- ZANG, Z. Y. & VAN ETTEN, R. L. (1990) - **Purification and characterization a low-molecular-weight acid phosphatase - a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart**, *Arch. Biochem. Biophys*, 282: 39-49.