



ESTUDOS CINÉTICOS, FÍSICO- QUÍMICOS E CONFORMACIONAL DA FOSFATASE ÁCIDA DE SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Paulo Afonso Granjeiro e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroschi Aoyama

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	G 766 e
V.	Es.
TOMBO BC	46418
PROC.	16-393107
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC@	R\$ 11,00
DATA	15/09/01
N.º CPD	

CM00159618-5

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

Granjeiro, Paulo Afonso
G766e Estudos cinéticos, físico-químicos e conformacional da fosfatase
ácida de sementes de mamona (*Ricinus communis*)/Paulo Afonso
Granjeiro. – Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
131f: ilus.

Orientador: Hiroshi Aoyama
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Fosfatase ácida. 2. Mamona. 3. Enzimas. I. Aoyama,
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

BANCA EXAMINADORA

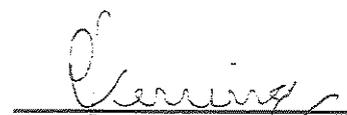
PROF. DR. HIROSHI AOYAMA (ORIENTADOR)
UNICAMP - INSTITUTO DE QUÍMICA


ASSINATURA

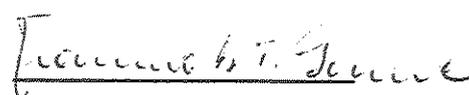
PROF. DR. ANTÔNIO ROSSI FILHO
USP - FAC. DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO


ASSINATURA

PROF. DR^A. CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA
UNICAMP - INSTITUTO DE BIOLOGIA


ASSINATURA

PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE
UNICAMP - INSTITUTO DE QUÍMICA


ASSINATURA

PROF. DR SÉRGIO MARANGONI
UNICAMP - INSTITUTO DE BIOLOGIA


ASSINATURA

PROF. DR. JOSÉ CAMILLO NOVELO
UNICAMP - INSTITUTO DE BIOLOGIA

ASSINATURA

PROF. DR^A. NILCE CORREA MEIRELLES
UNICAMP - INSTITUTO DE BIOLOGIA

ASSINATURA

Aos meus pais, Sebastião e Paschoalina, pela força, carinho e dedicação para com seus filhos. Pelos momentos que deixaram de usufruir na vida em prol da minha formação e de meus irmãos. Por fim por mais um sonho alcançado por eles: de ver mais um filho alcançar seus objetivos na vida.

Ao meu irmão Mauro, pelas inúmeras horas de discussão deste trabalho, dos momentos agradáveis em Congressos Científicos e pelo seu precioso exemplo de educador, pesquisador, irmão e amigo.

Aos meus irmãos, Vera e André, pelo incentivo e pela cooperação comigo. Pela compreensão nos momentos difíceis e pelas alegrias nos momentos divertidos.

Dedico este trabalho

Agradecimentos

Ao meu orientador, Hiroshi, grande Homem e exemplo de vida e de compreensão. Pelo acolhimento em seu laboratório desde o mestrado. Pela confiança depositada em mim. Pela paciência em lidar com as pessoas.

Ao Prof. Dr. Ângelo Savin, pela doação das sementes de mamona, as quais sem elas este trabalho não teria sido realizado.

Aos Profs. Drs Carmen, Marangoni e Pessine, pelas sugestões e críticas apresentadas na pré-banca.

Aos meus "irmãos" de departamento Paulo, pelas trocas de experiências em ensino, e Zeca, pelas trocas de experiências na pesquisa. E por ambos em momentos de reflexão e cumplicidade.

As minhas "irmãs" de departamento Carmen, pelo grande incentivo a Ciência e exemplo de dedicação e trabalho e Patrícia, pelas longas discussões sobre a pesquisa e ensino. E ambas pelos momentos de longas viagens para Congressos e pelo convívio nesta fase da vida.

Aos companheiros de laboratório, Márcio, Alexandre, André, Telma, Ana Cláudia, Cris, Paty, Karina e as funcionárias Marilena e Erika pela ajuda nos momentos difíceis e pelas gargalhadas nos momentos de festa e vitórias.

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório de enzimologia.

Aos amigos pós-graduandos da Bioquímica, que ainda enfrentam este desafio.

A FAPESP pelo fomento à pesquisa e confiança no meu projeto.

Aos funcionários da secretaria da Bioquímica, Marina e Andréia, pela eficiência nas resoluções de inúmeras burocracias e pela simpatia e amizade.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica da Unicamp em geral e especialmente para Paulo Baldasso e Neto, exemplos de eficiência e dedicação a profissão.

Aos professores do departamento de Bioquímica, pelo convívio.

Aos professores Dr. Mauro, Eulázio e Marília e aos funcionários Telma e Ovídio do departamento de Bioquímica da USP Bauru, pela realização da purificação das sementes de mamona e experimentos de sítio ativo.

Ao Prof. Dr. Rossi e aos pós-graduandos Nozawa e André, do departamento de Química da USP de Ribeirão Preto, pelo acolhimento e realização com êxito dos experimentos de análise de carboidratos realizados em seu laboratório.

ÍNDICE

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Material	15
3.2 Métodos	15
3.2.1 Determinação da atividade enzimática	15
3.2.2 Determinação de proteína	17
3.2.3 Estudos Cinéticos	18
a) Determinação das Constantes de Inibição	18
b) Mapeamento de sítio ativo	18
c) Estudos de estabilidade térmica	19
3.2.4 Estudos físico-químicos e conformacional	20
a) Estudos de desnaturação por uréia.	20
b) Estudos de desnaturação por cloreto de guanidina.	20
c) Estudos de desnaturação por temperatura.	21
d) Determinação do ponto isoelétrico	21
e) Determinação de carboidratos totais	22
f) Composição de carboidratos	23
3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos na ausência da porção de carboidrato	24
3.2.6 Estudos de germinação	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Estudos Cinéticos	27
4.1.1 Determinação das Constantes de Inibição	27
4.1.2 Estabilidade térmica	38
4.1.3 Mapeamento de sítio ativo	43
4.2 Estudos Físico-químico e conformacional	52
4.2.1 Desnaturação por uréia	52
4.2.2 Desnaturação por cloreto de guanidina	61
4.2.3 Desnaturação térmica	69
4.2.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI)	72
4.2.5 Determinação do Carboidrato Total	74
4.3 Composição do Carboidrato	74

4.3.1	Parâmetros cinéticos na ausência da porção de Carboidrato.	80
4.4	Estudos de germinação	85
<u>5</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>94</u>
<u>6</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>96</u>
<u>7</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>98</u>
<u>8</u>	<u>ANEXO 01</u>	<u>110</u>
<u>9</u>	<u>ANEXO 2</u>	<u>112</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Inibição da FAc por fosfato.	Página 30
Figura 02. Inibição da FAc por molibdato.	Página 31
Figura 03. Inibição da FAc por α -vanadato.	Página 33
Figura 04. Inibição da FAc por fluoreto.	Página 34
Figura 05. Gráfico de Cornish-Bowlden.	Página 36
Figura 06. Estabilidade térmica em diferentes temperaturas.	Página 41
Figura 07. Estabilidade térmica em diferentes compostos.	Página 42
Figura 08. Inativação por IAA em diferentes concentrações e pré-incubações.	Página 47
Figura 09. Gráfico do K_{app} do IAA.	Página 50
Figura 10. Gráfico do log do K_{app} do IAA.	Página 51
Figura 11. Gráfico da I_f em função do comprimento de onda máximo na presença de uréia.	Página 54
Figura 12. Curva de desnaturação por uréia.	Página 55
Figura 13. Efeito da concentração de uréia na atividade da enzima.	Página 58
Figura 14. Gráfico do efeito da uréia na fração desnaturada da enzima.	Página 59
Figura 15. Gráfico da I_f em função do comprimento de onda máximo na presença de GdnHCl.	Página 63
Figura 16. Curva de desnaturação por GdnHCl.	Página 64
Figura 17. Efeito da concentração de GdnHCl na atividade da enzima.	Página 66
Figura 18. Gráfico do efeito da GdnHCl na fração desnaturada da enzima.	Página 67
Figura 19. Gráfico de desnaturação térmica.	Página 71
Figura 20. Gráfico da focalização isoeétrica.	Página 73
Figura 21. Separação por HPLC dos padrões de monossacarídeos PMP-tratados.	Página 77
Figura 22. Separação por HPLC da FAc de mamona PMP-tratados.	Página 78
Figura 23. Efeito do pH na atividade da enzima desprovida da porção de carboidrato.	Página 82
Figura 24. Efeito da especificidade da enzima pelo pNPP na enzima desprovida de carboidrato.	Página 83
Figura 25. Gráfico de tamanho e peso das plantas germinadas.	Página 87
Figura 26. Gráfico de atividade enzimática utilizando diferentes substratos.	Página 89
Figura 27. Gráfico de fosfato e de proteína durante a germinação.	Página 93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. Tipos de inibição e valores de K_i para fosfato inorgânico, molibdato, <i>o</i> -vanadato e fluoreto.	Página 37
Tabela 02. Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos na atividade da fosfatase ácida de mamona.	Página 44
Tabela 03. Parâmetros característicos de desnaturação na presença de uréia.	Página 60
Tabela 04. Valores de ΔG (H_2O) para diferentes proteínas na presença de uréia.	Página 60
Tabela 05. Parâmetros característicos de desnaturação na presença de GdnHCl.	Página 65
Tabela 06. Valores de ΔG (H_2O) para diferentes proteínas na presença de GdnHCl.	Página 68
Tabela 07. Análise da composição total de monossacarídeos de glicoproteínas relatados na literatura.	Página 79

ABREVIATURAS

- $\Delta G (H_2O)$: Variação de energia livre na ausência do agente desnaturante
- **ABA**: Ácido abscísico
- **AcF**: Ácido fítico
- **AMr**: Massa molecular relativa alta
- **BMr**: Massa molecular relativa baixa
- $D_{1/2}$: Concentração de desnaturante que desnatura 50% das enzimas
- **DCCD**: N,N'-diciclohexilcarbodiimida
- **DEP**: dietil-piromcarbonato
- **DTT**: ditioneitol
- **EDC**: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- **EndoH**: Endoglicosidase H
- **FAc**: Fosfatase ácida
- **Fd**: Fração desnaturada
- **GA**: Ácido giberélico
- **IAA**: ácido iodoacético
- **IMr**: Massa molecular relativa intermediária
- **JA**: Ácido jasmônico
- K_{app} : Constante aparente
- **kDa**: Kilo Dalton
- K_i : Constante de inibição
- K_{ic} : Constante de inibição competitiva
- K_m : Constante de Michaelis-Menten
- K_{uc} : Constante de inibição acompetitiva
- m : dependência do $\Delta G (H_2O)$ em relação a concentração do agente desnaturante
- **MJ**: Metil jasmonato
- **NAI**: N-acetilimidazol
- **NBS**: N-bromosuccinamida
- **NEM**: N-etilmaleimida

- $pCMB$: *p*-Cloromercúriobenzoato
- PEP: Fosfoenolpiruvato
- PGO: Fenilglioxal
- Pi: Fosfato inorgânico
- pI: Ponto isoelétrico
- PMP: Fenilmetilpirazolona
- pNP : *p*-Nitrofenol
- $pNPP$: *p*-Nitrofenilfosfato
- PPI: Pirofosfato
- PTP: Proteína tirosina fosfatase
- R: Constante dos gases
- SH: Sulfidrila
- T: Temperatura
- TFA: Ácido trifluoracético
- Tyr-P: Tirosina fosfato
- $V_{máx}$: Velocidade máxima
- γ_d : intensidade de fluorescência da fração desnaturada
- γ_n : intensidade de fluorescência da fração nativa
- γ_{obs} : intensidade de fluorescência observada

Resumo

O presente trabalho contém dados sobre estudos cinéticos, físico-químicos e conformacional da fosfatase ácida de sementes de mamona.

Através do enfoque cinético foram estudados efeitos de inibidores e determinados os aminoácidos presentes no sítio ativo ou importantes para a catálise. Para fosfato, molibdato e o-vanadato as inibições foram do tipo competitiva, com valores de K_i 0,14 mM, 10×10^{-6} mM e $1,6 \times 10^{-3}$ mM, respectivamente. Por outro lado, na presença de fluoreto a inibição foi do tipo mista, com valores de K_{ic} e K_{iu} de 0,91 mM e 0,42 mM, respectivamente. Nos estudos sobre estabilidade térmica observou-se que a enzima perdeu 80% de sua atividade quando incubada a 60°C por 15 min. Na presença de 10 mM de *p*-nitrofenol e fosfato inorgânico, a perda foi de 40%. Na determinação dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima utilizando-se agentes modificadores, observou-se que a fosfatase ácida de sementes de mamona era inativada em 50% por ácido iodoacético (IAA), que atua em grupos SH, sendo esta inativação tempo e concentração dependente. Observou-se a presença de duas cisteínas no sítio ativo, com valor de constante bimolecular igual $2,9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Do ponto de vista físico-químico e conformacional, determinou-se o ponto isoelétrico da enzima, o seu conteúdo em carboidrato e realizou-se um estudo de desnaturação da enzima, por temperatura e por agentes caotrópicos. A fosfatase ácida de sementes de mamona apresentou um ponto isoelétrico de 4,6 e um conteúdo de carboidratos de 40%, sendo glicose o único monossacarídeo detectado. A desnaturação da enzima na presença de agentes caotrópicos, como uréia e cloreto de guanidina, mostrou ser reversível. Foram determinados os parâmetros termodinâmicos como variação de energia livre $\{\Delta G(H_2O)\}$, concentração do composto que causa 50% de desnaturação ($D_{1/2}$) e o intercepto da transição desnaturante (m), cujos valores foram 4,9 Kcal mol⁻¹, 4,95 M e 0,991 Kcal mol⁻¹ M⁻¹, em presença de uréia, e 4,98 Kcal mol⁻¹, 2,35 M e 2,118 Kcal mol⁻¹ M⁻¹ em presença de GndHCl, respectivamente. Na desnaturação térmica o desnovelamento da enzima resultou em aumento da absorbância, com formação de agregados quando a temperatura foi superior a 90°C. Porém, este efeito não foi observado quando a desnaturação da enzima ocorreu na presença de 10 mM de pNP e Pi. Porém, o processo de desnaturação térmica da enzima apresentou ser irreversível em ambas as situações. Por fim foram estudadas algumas propriedades da enzima após remoção da porção de carboidrato pela endoglicosidase H. Observou-se o aparecimento de um pH ótimo adicional em 3,5, uma diminuição de duas vezes na

constante de especificidade para o substrato *p*-nitrofenilfosfato, um aumento do ponto isoelétrico para 4,75 e uma diminuição da heterogeneidade da banda de proteína em eletroforese de gel de poliacrilamida.

Nos estudos de germinação foram determinadas as atividades fosfatásicas dos extratos de plântulas germinadas durante um período. A enzima apresentou picos de atividade fosfatásica nos 7^o, 5^o e 9^o dias utilizando *p*NPP, PEP, PPI e Tyr-P como substratos, respectivamente. Porém, durante este período não foi observada atividade fosfatásica na presença de ácido fítico. A quantidade de proteínas aumentou durante a germinação ao passo que a quantidade de fosfato diminui.

Abstract

This work contains results about kinetic, physico-chemical and conformational studies of castor bean seed acid phosphatase.

About kinetic approaches we studied the effect of inhibitors and determined the amino acids present in the active site. Inorganic phosphate, molybdate and *o*-vanadate were competitive inhibitors, with K_i values of 0,14 mM, 10×10^{-6} mM e $1,6 \times 10^{-3}$ mM, respectively. On the other hand, fluoride inhibition was of the mixed-type, with K_{ic} and K_{iu} values of 0.91 mM and 0.42 mM, respectively. The thermal stability studies showed that the enzyme lost 80% of activity when incubated at 60°C for 15 min. But, in the presence of 10 mM of *p*-nitrophenol and P_i the enzyme lost 40% of activity. Studying the amino acids present in the active site by using modifying reagents, we observed that castor bean seed acid phosphatase was inactivated 50% in the presence of IAA, that acted sulfhydryl groups, in an inactivation time- and concentration-dependent. The acid phosphatase has two cysteines in its active site, with bimolecular constant value of $2.9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

In the physico-chemical and conformational approaches, we determined the isoelectric point, the carbohydrate composition and denaturation studies in the presence of caotropic agents and temperature. The acid phosphatase has a pI value of 4.6 and contained 40% of carbohydrate in its structure, and glucose was the only

monosaccharide found in the composition. The enzyme denaturation in the presence of chaotropic agents, as urea and GdnHCl, showed to be reversible. The thermal parameters such as ΔG (H₂O), $D_{1/2}$ and m were determined to be 4.9 Kcal mol⁻¹, 4.95 M and 0.991 Kcal mol⁻¹, in the presence of urea, and 4.98 Kcal mol⁻¹, 2.35 M and 2.118 Kcal mol⁻¹, in the presence of GdnHCl, respectively. In the thermal denaturation, the enzyme unfolded as aggregate when the temperature was higher than 90°C. This aggregation was not observed when the enzyme was incubated in the presence of 10 mM pNP and Pi. In both cases the process of denaturation was irreversible. Finally, we studied some properties of the enzyme after carbohydrate removal by endoglycosidase H. We observed an additional optimum pH of 3.5, a decrease in the specificity constant using pNPP as substrate, an increasing in the pI value and a decrease in the carbohydrate heterogeneity migration in SDS-PAGE.

This work contains also some germination studies of castor bean seeds, with determination of acid phosphatase activity using pNPP, Tyr-P and PPI as substrates. The peaks of acid phosphatase activity using pNPP, PEP, PPI and Tyr-P as substrates were 7th, 5th and 9th, respectively. The protein concentration increase during germination while phosphate concentration decrease.

Estudos cinéticos, físico-químicos e conformacional da fosfatase ácida de sementes de mamona (*Ricinus communis*)

1 INTRODUÇÃO

A fosfatase ácida (FAc) ou ortofosfato monoéster fosfohidrolase [E.C. 3.1.3.2.] catalisa a hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e também reações de transfosforilação, tendo álcoois como aceptores. 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 catalisa esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

Diferentemente do que ocorre em animais, os estudos de fosfatases ácidas em plantas ainda são insuficientes para permitir qualquer tipo de generalização, por exemplo, quanto à classificação por massa molecular relativa, por sensibilidade a diferentes inibidores e por localização celular.

Distribuição das FAc em plantas

As FAc foram detectadas em plantas superiores (BOROUGHES, 1954), folhas de trigo (ROBERTS, 1956), milho (SLACK et al, 1969), tabaco (SHAW, 1966),

tubérculos de batata doce (UEHARA et al, 1974), nódulo de raízes de soja (PENHEITER et al,1997) no látex da *Hevea brasiliensis* (JACOB & SONTAG, 1974), na membrana tilacóide de *Sorghum vulgare* (RENGASAMY et al, 1981), em gérmen de trigo (KAWARASAKI et al, 1996), em escutela de semente de milho em germinação (ROSSI et al, 1981), nos pólenes de *Brassica campestris* e *Lilium regale* (STROTHER et al, 1985), em sementes de amendoim (BASHA, 1984), de girassol (PARK & VAN ETTEN, 1986), de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987), de soja (ULLAH & GIBSON, 1988; FERREIRA et al, 1998a), na camada aleurônica (GABARD & JONES, 1986) e coleóptilos da cevada (PASQUALINI et al, 1992), em culturas de endosperma de milho (MIERNYK, 1992).

Localização celular

A localização desta enzima no citoplasma e na parede celular de plantas tem sido confirmada por métodos citoquímicos sendo que diversas formas isoenzimáticas foram observadas (GABARD & RUSSEL, 1986; LEE, 1988). STROTHER et al (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. Múltiplas formas da FAc foram isoladas ainda de outros tecidos como caule de *Vigna radiata* em germinação (DE-KUNDU & BANERJEE, 1990), raiz de cevada (PANARA et al, 1990), semente em germinação de *Vigna sinensis*

(BISWAS & CUNDIFF, 1991), folhas (STASWICK et al,1994), gérmen de trigo (KAWARASAKI et al, 1996), sementes de soja (FERREIRA, 1998a) e de mamona (GRANJEIRO et al, 1999). As massas moleculares relativas das FAc variam de 30 a 200 kDa e, normalmente, estas enzimas apresentam mais de uma cadeia polipeptídica, além da presença de carboidratos em suas estruturas (ROSSI et al, 1981; KRUZEL & MORAWIECKA, 1982; PARK & VAN ETTEN, 1986; LEBANSK, 1992). Em função da natureza glicoproteica das FAc de plantas, não é surpresa sua ligação com lectinas, o que pode levar à alterações de seus parâmetros cinéticos (CONRAD & RÜDIGER, 1994; GRANJEIRO, 1997; FERREIRA, 1999).

Características físico-químicas e cinéticas

Da mesma maneira que as FAc 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, com exceção às FAc de sementes quiescentes de soja que apresentaram temperatura ótima de 80°C com *p*-nitrofenilfosfato como substrato (FERREIRA, 1998b). As propriedades cinéticas também variam conforme a fonte e a isoenzima isolada. Parece comum a inibição por metais e fluoretos, a independência por cátions e a inespecificidade para substratos, muito embora haja predileção por açúcares fosfatados, nucleotídeos e pirofosfato (RENGASAMY et al, 1981; BASHA, 1984; PASQUALINI et al, 1992,

FERREIRA et al, 1999). IZUMI et al (1996) relataram que a fosfatase ácida de *Cinnamomum camphora* é capaz de hidrolisar isoprenil difosfatos Quanto à inibição por tartarato, FUJISAWA et al (1993) compararam a atividade residual da fosfatase ácida do fluido seminal com a de fosfatases de tecidos de várias plantas, incluindo vegetais e frutas. Observaram que aproximadamente metade das fosfatases de tecidos de plantas superiores testadas não foi inibida pelo tartarato, exceto a fosfatase do cogumelo, a qual apresentou uma inibição significativa quando comparada com a exibida pela FAc do fluido seminal.

Importância fisiológica

A grande importância referida a FAc se deve a sua participação no processo de germinação e maturação. Neste período, provavelmente por ação de hormônios como ácido giberélico, e em condições de ausência de fosfato (FERNANDEZ & ASCENCIO, 1994; BOSSE & KOCK, 1998) sua atividade está sempre aumentada e, algumas vezes, surge outra isoforma ativa (GABARD & JONES, 1986; BISWAS & CUNDIFF, 1991). Estas enzimas estão intimamente relacionadas com o metabolismo do fósforo nas plantas (DUFF et al, 1994; TARAFDAR & MARSCHNER, 1994). Relata-se ainda que a excreção da FAc está associada aos níveis de fosfato inorgânico, sendo possivelmente regulada pelo nível deste íon no meio de cultura (GOLDSTEIN et al, 1988; MIERNYK, 1992). Em 1992, DEWALD e colaboradores

demonstraram ainda a existência de duas glicoproteínas de estocagem na soja com atividade fosfatásica e que podem liberar fosfato inorgânico (Pi) de vários substratos como β -naftilfosfato, carboxifenil-fosfato, açúcares fosfatados, gliceraldeído-3-fosfato, di-hidroxiacetona fosfato, fosfoenolpiruvato, ATP, ADP, pirofosfato inorgânico e polifosfatos de cadeia curta. Essas glicoproteínas seriam importantes no período de desenvolvimento e em resposta a estímulos externos como deficiência de água e ferimentos.

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; CHUNG & POLYA, 1992; ARIÑO et al, 1993, GUO & ROUX, 1995), da mesma forma como o que ocorre em animais (KREBS & BEAVO, 1979; COHEN, 1989; JIA Z., 1997). MacKINTOSH & COHEN (1989) relataram que as técnicas para a identificação e quantificação de proteínas fosfatases em células animais eram aplicáveis para as plantas superiores. Apesar destes fatos, poucos relatos existem sobre a atividade Ser/Thr-proteína fosfatase em plantas (YANG et al, 1987; POLYA & HARITOU, 1988; CHENG & TAO, 1989; MacKINTOSH et al, 1991; YUPSANIS et al, 1993, JIA, 1997).

Em 1996, SMITH & WALKER publicaram uma revisão sobre proteína fosfatase em plantas, mostrando que modificações pós-tradução de proteínas por fosforilação são um mecanismo universal para a regulação de diversas funções biológicas, bem como discutiram avanços recentes para o entendimento da estrutura, regulação e função de proteínas fosfatases em plantas.

Em plantas, algumas fosfatases ácidas tem demonstrado atividade proteína fosfatase; GELLATLY et al (1994) purificaram uma FAc de tubérculos de batata com características de uma proteína tirosina fosfatase. As Fac purificadas de bulbo de cebola (GUO & PESACRETA, 1997) e nódulo de raízes de soja (PENHEITER et al, 1997) reconheciam também como substrato tirosina-fosfato, além de outros compostos fosforilados.

Especificamente com relação a fosfatase ácida de sementes de mamona, existem apenas três artigos publicados sobre a enzima. Dois deles pertencem a um mesmo grupo de pesquisa, e relatam o aumento do nível da FAc durante o processo de germinação (DUA et al, 1984 e 1985). O terceiro é de nosso laboratório, sobre purificação e caracterização cinética da FAc de mamona (GRAN JEIRO et al, 1999).

Estudos de desnaturação de proteínas

O estudo de desnaturação de proteínas por ação de agentes caotrópicos, como uréia e cloreto de guanidina, e temperatura é uma das ferramentas mais

importantes para se entender como as proteínas se enovelam. Uma das importantes aplicações de tais estudos reside na medicina. O Mal de Alzheimer, doença da vaca louca, fibrose cística e até mesmo algumas formas de câncer são doenças que, através de descobertas recentes e que aparentemente não apresentam nenhuma relação entre si, resultam do enovelamento defeituoso de proteínas dentro das células (YON, 2001). Portanto estudar como as proteínas se enovelam torna-se um dos tópicos de grande importância da Bioquímica moderna e a possibilidade de se combater doenças relacionadas ao mau enovelamento de proteínas.

Dentre os vários métodos espectroscópicos desenvolvidos para estudar a desnaturação de proteínas, a fluorescência é uma convincente ferramenta para detectar mudanças conformacionais em proteínas. A simplicidade da transição do estado nativo para o estado desnaturado e suas características de reversibilidade permite uma descrição detalhada dos aspectos termodinâmicos. Assim o modelo de dois estágios (nativo e desnaturado) exprime que o equilíbrio das proteínas existe somente nestas duas formas alternativas. (CHITI et al, 1998).

Apesar de existir inúmeros relatos na literatura sobre a desnaturação de proteínas em geral, poucos são os trabalhos que envolvem as FAc. Em 1990, KUCIEL e colaboradores demonstraram que a FAc da próstata, um enzima dimérica, necessitava dos dois monômeros para a total atividade enzimática quando

submetidos a desnaturação por cloreto de guanidina. Em 1993, OSTROWISKI e colaboradores demonstraram para a FAc da próstata que após a renaturação da proteína a natureza do sítio ativo da enzima é restabelecida e que a proteína nas formas nativa, desnaturada e renaturada os resíduos de triptofano encontravam-se em ambientes diferentes. Já em 1996, CASHIKAR & RAO demonstraram que o fosfato, um ligante fisiológico, aumentava a estabilidade da fosfatase ácida púrpura de rim, quando desnaturada por cloreto de guanidina.

Importância da glicosilação para as glicoproteínas

Atualmente pouco se sabe sobre o papel da porção de carboidrato na estrutura das proteínas. A importância da porção de carboidrato para a estabilidade das glicoproteínas merece atenção uma vez que mudanças na catálise, na estabilidade térmica, na mobilidade eletroforética e na solubilidade das glicoproteínas ocorrem quando o carboidrato é removido (SZALEWICZ et al, 1997). Mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da RNase B foram observadas por JOAO et al (1997) e que a presença do carboidrato não protegia somente a região de resíduos de aminoácidos próxima ao sítio de glicosilação, mas também um grande número de resíduos de aminoácidos da proteína inteira. Para a FAc de próstata, a remoção da porção de carboidrato contribuiu para a perda da heterogeneidade nas bandas eletroforéticas destas glicoproteínas (MORRIS et al,

1989). Em 1997, KWON & YU demonstraram que a porção de carboidrato contribuía para a estabilidade estrutural da α_1 -antitripsina frente à ação de agentes desnaturantes, como uréia. O efeito protetor da porção de carboidrato também foi observado para a pirofosfatase e glicose 6-fosfato desidrogenase de levedura de padeiro na presença de cloreto de guanidina e que a trealose aparecia como o açúcar mais efetivo contra a ação desnaturante deste agente caotrópico (SOLA-PENNA et al, 1997).

Estudos de mapeamento de sítio ativo

O estudo de mapeamento de sítio ativo é um dos mais populares métodos para determinar a topografia dos sítios ativos das enzimas, seja para elucidar os mecanismos de ação enzimáticos ou para, também, ser utilizado como base para o desenvolvimento de novas drogas (PLAPP, 1982). O estudo é realizado na presença de agentes modificadores específicos para determinados aminoácidos, tendo como consequência a perda da atividade enzimática. A confirmação de que determinados aminoácidos fazem parte do sítio ativo da enzima é realizada na presença de compostos protetores da atividade enzimática, como por exemplo, os produtos da reação na presença dos quais a enzima não é inativada pelos agentes modificadores específicos para aminoácidos. Caso a reação continue sendo inativada, o aminoácido

testado pode também se encontrar em outro local que não seja necessariamente o sítio ativo, mas que é importante para a atividade da enzima.

Estudos de germinação

As sementes contêm um embrião dormente e está estrutural e fisiologicamente equipada para seu papel como unidades de dispersão e contém reservas de alimentos para sustentar o crescimento da plântula até seu estabelecimento como auto-suficiente. Ao final do desenvolvimento da semente, o conteúdo de água pode cair de 90% para 5% (BEWLEY & BLACK, 1986; ALBERTS, 1994). Para o embrião reassumir seu crescimento a semente deve germinar, um processo dependente de fatores externos e internos (dormência) e fatores ambientais incluindo água, temperatura e oxigênio (ALBERTS, 1994) e o sucesso do novo indivíduo é largamente determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente (BEWLEY & BLACK, 1986). Os cotilédones de leguminosas contêm principalmente materiais de reserva que suplementam o embrião durante a germinação (BISWAS et al, 1996).

Inúmeros são os eventos que ocorrem durante a germinação, os quais começam com a absorção de água pela semente quiescente seca e completam quando uma parte do embrião, usualmente a radícula, estende para penetrar as estruturas que a circundam. Estes eventos, na germinação, incluem, por exemplo, hidratação de

proteínas, mudanças estruturais subcelulares, respiração, síntese de macromoléculas e alongação celular. O visível indício de que a germinação está completa é a protusão da radícula ao redor das estruturas do embrião; o resultado é algumas vezes conhecido como germinação visível. Eventos subseqüentes, incluindo a mobilização dos maiores estoques de reservas, estão associados com o crescimento da plântula (BEWLEY & BLACK, 1986; BEWLEY, 1997).

As estruturas e enzimas necessárias para a retomada inicial da atividade metabólica estão presentes na semente. A atividade de enzimas hidrolíticas bem como sua função metabólica nos cotilédones das sementes aumentam com a germinação para liberar o material de reserva para o crescimento do embrião (BISWAS et al, 1996). Estas atividades enzimáticas nos cotilédones são aumentadas por um anexo do embrião, sugerindo que há alguma comunicação entre os cotilédones e o embrião para regular a hidrólise do material de estoque de acordo com seu requerimento.

Durante a germinação as fosfatases ácidas parecem ter uma grande importância, pois neste período, sua atividade está sempre aumentada e algumas vezes, surge uma outra isoforma ativa. BISWAS & CUNDIFF (1991) purificaram 4 fosfatases ácidas (API, APII, APIII e APIV) das sementes de *Vigna sinensis* com 96h de germinação. As frações API e APII são proteínas constitutivas, enquanto

APIII e APIV são expressas após 4 a 15 horas de germinação. BHARGAVA & SACHAR (1987) observaram um aumento de aproximadamente 16 vezes na atividade da fosfatase ácida durante os estágios de germinação de embriões de algodão. Neste trabalho, eles mostraram que a FAc durante germinação era ativada pela síntese *de novo* da enzima. ULLAH & GIBSON (1988) purificaram uma FAc a partir de cotilédones das sementes de soja em germinação, através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica, afinidade e cromatofocalização. Com estas técnicas foi possível obter uma enzima com ampla especificidade pelos substratos, principalmente por p NPP.

O aparecimento de novas isoformas durante a germinação ainda não é entendido; há a hipótese que hormônios como ácido giberélico (GA_3), ácido abscísico (ABA), auxina (IAA), ácido jasmônico (JA) e metil jasmonato (MJ), importantes na germinação, estejam envolvidos neste processo. DUA *et al.* (1985) observaram que sementes de mamona tratadas com GA_3 em diferentes períodos de embebição, tiveram a atividade fosfatásica aumentada, durante germinação. GABARD & JONES (1986) mostraram que havia um aumento de cerca de 3 vezes da FAc da camada aleurônica de cevada, quando as mesmas eram embebidas e incubadas por 18 horas em tampão contendo $50 \mu M$ de GA_3 . Em outro trabalho, PFEIFFER (1996) estudou a indução de atividade fosfatásica extracelular em coleótilos de milho pelo IAA, o

qual também observou um aumento (46%) de atividade. SHIH & KAO (1998) estudaram a indução da atividade de FAc em folhas de arroz pelo MJ, e foi observado que MJ e JA aumentavam a atividade dessa enzima até 5 vezes. Eles sugeriram que a atividade fosfatásica metil jasmonato induzida é devido a síntese *de novo* da fosfatase ácida.

2 OBJETIVOS

Para contribuir com maiores informações sobre fosfatases ácidas de plantas, e em virtude da ausência de estudos sobre as características mais básicas de fosfatases ácidas de sementes da mamona, realizamos este trabalho, cujos objetivos foram:

Determinação da constante de inibição (K_i) para o molibdato, σ -vanadato, fluoreto e fosfato, bem como o ponto isoelétrico da enzima.

Mapeamento do Sítio Ativo.

Estudo de desnaturação pela uréia, cloreto de guanidina e temperatura.

Determinação da composição de carboidratos.

Estudos de germinação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As sementes de mamona (*Ricinus communis*) foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Ângelo Savin, Instituto Agronômico de Campinas-IAC.

A FAc foi purificada de sementes de mamona, como descrito anteriormente (GRANJEIRO et al, 1999)

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho apresentaram grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da atividade enzimática

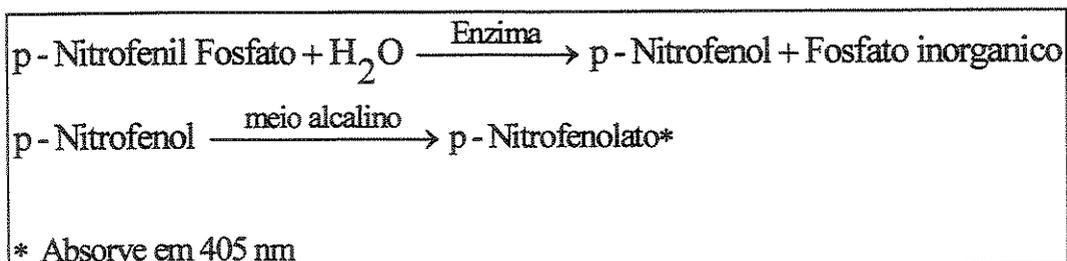
Para a determinação da atividade, a amostra foi diluída, imediatamente antes do ensaio, em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, de modo a proporcionar uma absorbância em torno de 0,4, no comprimento de onda de acordo com o método utilizado.

A atividade enzimática foi determinada por dois métodos, dependendo do produto formado, *p*-nitrofenol ou fosfato:

a) Dosagem do *p*-nitrofenol

A atividade enzimática foi determinada a 37 °C, em presença de *p*NPP 5 mM, tampão acetato 0,1 M (pH 5,0) e enzima, em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada 10 minutos após a adição da enzima, com 1 ml de hidróxido de sódio 1M. A absorbância foi medida a 405 nm como esquematizado abaixo. Uma unidade enzimática (UE) 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. A atividade específica (A.E.) é definida como UE por mg de proteína.

As reações estão descritas a seguir:

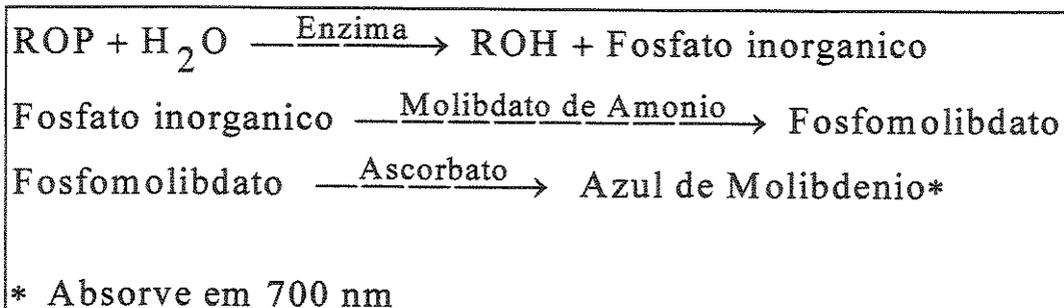


Na purificação da enzima, a atividade das frações eluídas nas cromatografias foi determinada utilizando-se um tempo de reação de 2 minutos e *p*NPP como substrato.

b) Dosagem do fosfato

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

O procedimento foi como descrito em (a), exceto que a paralisação da reação ocorreu 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 desenvolvida 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 & LOPEZ (1945). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido é $4.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e as reações estão mostradas a seguir:



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 30 min após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu à temperatura ambiente.

Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 M

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-Ciocalteu (diluído 1:1 em H_2O)

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 Estudos Cinéticos

a) Determinação das Constantes de Inibição

Inicialmente foi calculado a K_m e V_{max} na ausência e presença de diferentes concentrações de inibidor. Os valores das constantes de inibição foram determinados pelo método de Dixon (DIXON & WEBB, 1974) para o fosfato, molibdato e *o*-vanadato; para o fluoreto as constantes de inibição foram determinadas através do método de Cornish-Bowden (1990).

b) Mapeamento de sítio ativo

A enzima foi pré-incubada na presença de modificadores químicos na concentração de 10 mM, tais como, fenilglioxal (PGO), N-etilmaleimida (NEM), ácido

iodoacético (IAA), N-bromosuccinamida (NBS) e N-acetilimidazol (NAI), preparados recentemente em 200 μ L de tampão A (300 mM de manitol e 20 mM de Hepes-Tris pH 7,5), por 30 minutos, à 25 e 37°C, de acordo com o método de BOIVIN et al (1997). Modificadores como dietil-pirocarbonato (DEPC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foram utilizados em 200 μ L de tampão B (300 mM de manitol e 20 mM de MES-NaOH pH 6,0), por 30 minutos, a 25 e 37°C. Os modificadores DEPC e DCCD continham etanol na concentração final de 1,5%. Estudos preliminares mostraram que o etanol, na concentração utilizada, não apresentava efeito na atividade da FAc de sementes de mamona. A reação foi paralisada após diluição de 50 vezes no próprio meio de reação que não continha substrato. A reação foi iniciada com a adição de pNPP.

c) Estudos de estabilidade térmica

Neste experimento a enzima (0,15 μ g ml⁻¹) foi pré-incubada por diferentes períodos, a 55°C, na presença de 10 mM de p-nitrofenol e 10 mM de fosfato, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5. Em seguida, a atividade residual foi determinada como descrito em métodos 4.1. O Controle foi obtido determinando-se a atividade residual, nas mesmas condições, na ausência dos compostos no meio de

pré-incubação. A atividade residual no tempo zero de pré-incubação foi tomada como 100%.

3.2.4 Estudos físico-químicos e conformacional

a) Estudos de desnaturação por uréia.

A solução estoque de uréia foi preparada numa concentração de 9 M em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 a fim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 8 M. A enzima ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi equilibrada por 7 h a 4°C nas diferentes concentrações de uréia e mantida em gelo durante o experimento. As intensidades de fluorescência intrínseca da enzima, em cubetas de quartzo de 1 cm, foram monitoradas em espectrofluorímetro Hitachi 2000 com comprimento de onda de excitação de 293 nm e de emissão de 298 a 450 nm. A largura da fenda foi de 5 nm.

A intensidade de fluorescência obtida no espectro de emissão foi utilizada para o cálculo do Centro de Massa de acordo com o método descrito por BONAFÉ et al (1998). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação da enzima foram determinados através do $\lambda_{\text{máx}} \times [\text{uréia}]$ (PACE 1990).

b) Estudos de desnaturação por cloreto de guanidina.

A solução estoque de cloreto de guanidina foi preparada numa concentração de 8 M em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 a fim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 6 M. A enzima ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi equilibrada por 55 h a 4°C nas

diferentes concentrações de cloreto de guanidina e mantida em gelo durante o experimento. As intensidades de fluorescência intrínseca da enzima foram monitoradas de acordo com o método 4.2.3.2.

A intensidade de fluorescência obtida no espectro de emissão foi utilizada para o cálculo do Centro de Massa, de acordo com o método descrito por BONAFFÉ et al (1998). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação da enzima foram determinados através do gráfico $\lambda_{max} \times [GdnHCl]$ (PACE 1990).

c) Estudos de desnaturação por Temperatura.

A variação da absorbância em 280 nm da enzima (50 μ g em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0) em função da temperatura, foi determinada na ausência e na presença de 1 mM de DTT. Utilizou-se o espectrofotômetro de arranjo de diodos UV/Vis da HP 8452Dos, acoplado a um sistema programador/controlador de temperatura e a um microcomputador. A temperatura variou de 20 a 80°C, com um incremento de 1 °C e de 80 a 90°C, com um incremento de 0,5°C. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados de acordo com PACE (1990).

d) Determinação do ponto isoelétrico

O pI foi determinado por eletroforese por focalização isoelétrica, foi utilizado gel de poliacrilamida horizontal (9,0 x 9,0 x 0,5 cm, T = 5%, C = 5%) com anfólitos da Sigma em um intervalo de pH de 4,0 até 6,5 na concentração final de 2%, de

acordo com THEDEI et al (1997). O valor máximo das condições elétricas foi de 2000V, 20 mA e 10W. Glicina (1 M) e ácido glutâmico 0,1 M foram usados como cátodo e ânodo, respectivamente. As amostras absorvidas em pequenos pedaços de papel de filtro (Whatman 3 MM) foram aplicadas no gel e pré-focalizadas por 30 minutos e depois ocorreu a focalização por 30 min. Após a remoção dos pequenos pedaços de papel, o gel correu por mais 1,5 h. A temperatura do gel foi mantida baixa por banho circulador de água à 4°C.

O tratamento da FAc na presença de endoglicosidase H (EndoH) foi realizado de acordo com o método descrito por TRIMBLE & MALEY (1984). A EndoH foi diluída duas vezes no tampão de reação fosfato de sódio 0,1 M pH 5,5 e pré-incubada com a enzima por 24 h a 37°C.

e) Determinação de carboidratos totais

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

*f) Composição de carboidratos**f₁) Hidrólise*

De acordo com FU & O'NEILL (1995) a FAc de sementes de mamona foi tratada com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4 M em tubos de hidrólise (13 X 100 mm). Os tubos de hidrólise foram selados e incubados a 120°C por 2 h em aquecimento seco (bloco de aquecimento). Os padrões de monossacarídeos, 10 nmol de manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, foram submetidos a tratamento idêntico às amostras. Depois de resfriados à temperatura ambiente, os tubos de hidrólise foram abertos, e transferida para ependorffs, depois foram evaporados até secagem por concentração sob pressão reduzida.

f₂) Tratamento com Fenilmetilpirazolona (PMP)

As amostra de glicoproteínas hidrolizadas e secas e padrões de monossacarídeos são diretamente tratados com PMP por adição de 20 µL de solução de PMP (0,5 M em metanol) e 20 µL de solução de NaOH 0,3 M, seguido de agitação vigorosa e incubado a 7°C por 2 h. A mistura foi então neutralizada por adição de 20 µL de solução de HCl 0,3 M. Em seguida 0,5 mL de éterbutílico foi adicionado e misturado sob agitação vigorosa por 5 s. A fase de separação foi intensificada por breve centrifugação. A fase orgânica (camada superior) foi cuidadosamente

removida e descartada. Este processo de extração foi repetido duas vezes mais. A fase aquosa restante foi misturada com 150 μ L água para análise em HPLC.

f₃) Análise em HPLC

A análise de monossacarídeos tratados com PMP foi realizada em HPLC Shimadzu LC - 10 AD vp equipado com sistema de detecção UV/VIS SPD - M10A vp V. Foi usada uma coluna Brownlee C 18 220 X 2,1 mm, otimizada para separação de carboidratos tratados com PMP. O fluxo foi de 0,2 mL/min. O comprimento de onda para detecção de UV foi de 245 nm. Para a separação de açúcares neutros ou aminos foram utilizados, tampões A e B contendo 100 mM de acetato de amônio, pH 5,5, com 10 e 25% de acetonitrila, respectivamente. Um gradiente de 45 a 100% de tampão B, em 55 min, foi utilizado para separação.

f₄) Análise dos dados

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

3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos na ausência da porção de carboidrato

Antes que os ensaios enzimáticos da enzima deglicosilada foram realizados, a enzima foi pré-incubada durante 24 h a 37°C na presença da endo-H.

a) Determinação do pH

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 4.2.1.1 utilizando 0,03 μg de enzima por tubo, com um controle para cada pH na presença e ausência de 12 mUnidades de Endo H.

b) Estudo de Especificidade

A atividade enzimática da fração sobre alguns compostos fosforilados foi determinada dosando o fosfato liberado no meio de reação, como descrito no método 3.2.1.1, utilizando-se 0,03 μg de enzima por tubo na presença e ausência de 12 mUnidades de Endo H. A atividade sobre o pNPP foi considerada como 100%.

3.2.6 Estudos de germinação

Primeiramente as sementes de mamona foram embebidas em água durante um período de 6 h. Em seguida foram transferidas para bandejas com vermiculita, levadas a uma câmara de germinação de temperatura controlada (28°C), em escuro.

A cada 24 h de germinação num período total de 10 dias, 10 plântulas foram retiradas da câmara e lavadas em água destilada. Então foram pesadas e medidos os comprimentos da raiz (ou radícula nos 2 primeiros dias de germinação) e da parte

aérea das plântulas, com o auxílio de uma régua. As medidas foram tomadas em centímetro.

Obtenção do extrato

Foram utilizadas 10 plântulas de mamona, embebidas em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 (1:6) gelado. Em seguida, as plântulas foram trituradas em Waring Blendor (com o regulador de voltagem em 55), velocidade máxima, durante 30-60 segundos. O homogeneizado obtido foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 min em centrífuga refrigerada Beckman J2-21. O sobrenadante foi filtrado em gaze, desta forma retirando-se partículas grosseiras e materiais insolúveis, resultando no homogenato. Em seguida foram dosadas atividades enzimáticas para os seguintes substratos: p NPP, Tyr-Pi e PPI.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos Cinéticos

Alguns estudos cinéticos para a FAc de sementes de mamona, tais como condições ótimas de reação, especificidade por substrato e parâmetros cinéticos para pNPP, Tyr-P e PPI, como substratos, foram previamente descritos (GRANJEIRO et al, 1999). No presente trabalho, estudamos, do ponto de vista cinético, efeitos de inibidores, estabilidade térmica e mapeamento de sítio ativo.

4.1.1 Determinação das Constantes de Inibição

O estudo de inibidores é de extrema importância para se elucidar a natureza da estrutura química das enzimas, uma vez que nos trás informações de como as enzimas se ligam em seus substratos, qual o possível mecanismo de catálise e a possibilidade de se desenvolver compostos que possam inibir determinadas enzimas, fato este que ocorre na indústria farmacêutica, uma vez que muitos dos medicamentos sintetizados atuam na prevenção de doenças, inibindo determinados tipos de proteínas que estão relacionadas com estas doenças.

O tipo de inibição para o fosfato foi classificado de competitivo como demonstrado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 1). Este fato tem permitido o uso deste íon como protetor da enzima nos tampões de estocagem e também para eluição da enzima em coluna SP-Sephadex (GRANJEIRO, 1994). A regressão linear

dos pontos obtidos no gráfico da inclinação destas retas contra as concentrações do inibidor proporcionou, na intersecção com o eixo da concentração do inibidor, o valor da constante, K_i , de 0,14 mM (Figura 1, interno). A inibição competitiva da FAc de mamona pelo fosfato é considerada clássica para as FAc em geral. Isso se deve ao fato deste inibidor ser um dos produtos da reação nos processos de desfosforilação. A inibição foi da mesma ordem de grandeza que o relatado para outras FAc de plantas, como para células de soja em cultura, 0,7 mM (SHAW, 1966) e para nódulos de raízes (PENHEITER et al, 1997) e para seringueira, 0,18 mM (JACOB & SONTAG, 1974). Para FAc animal, como cérebro bovino, a K_i foi de 0,7 mM (CHAIMOVICH & NOME, 1970), ao passo que para a de leite bovino o valor da K_i foi da ordem de grandeza dez vezes maior, 1,52 mM (ANDREWS & PALLAVICINI, 1973).

Para o molibdato, o gráfico dos duplo-recíprocos mostrou tratar-se de uma inibição do tipo competitivo (Figura 2), semelhante à inibição por fosfato inorgânico. A constante de inibição obtida por meio do gráfico da inclinação das retas contra as concentrações do molibdato (Método de Dixon) corresponde a 10×10^{-6} mM (Figura 2, interno). A inibição competitiva da FAc por molibdato (Tabela 1) foi a mesma descrita para outras fosfatases e da mesma ordem de grandeza que a observada para FAc de mostarda, 28×10^{-6} mM (DUFF, 1991), porém cerca de 100 vezes

maior que a K_i para cevada, $0,09 \times 10^{-6}$ mM (PANARA, 1990) e três vezes maior que para a enzima de folhas de tabaco, $0,27 \times 10^{-6}$ mM (SHAW, 1966).

As inibições do tipo competitivas para os inibidores fosfato, molibdato e σ -vanadato demonstram que o mesmo local de ação do substrato é o mesmo local de ação do inibidor na enzima, ou seja, ambos competem pelo mesmo sítio de ligação, sugerindo assim que tanto o substrato quanto o inibidor utilizado apresentam estruturas tridimensionais parecidas. Além do mais, podemos afirmar que existem cargas negativas, provenientes de grupos R de aminoácidos, no sítio ativo da enzima, uma vez que os inibidores testados apresentam carga positiva. O menor valor de K_i para molibdato indica que este inibidor interage mais facilmente com a enzima do que outros inibidores testados.

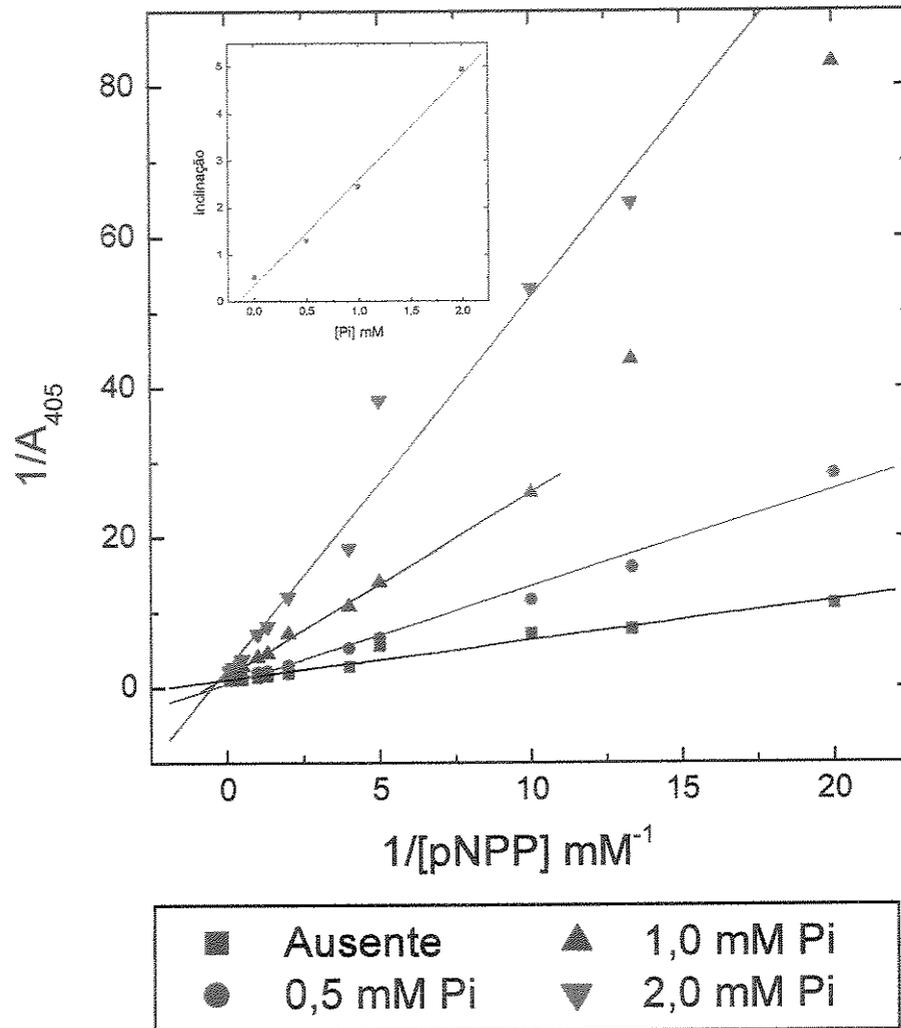


Figura 1. Inibição da Fosfatase ácida por fosfato. Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição para o fosfato (interno). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1.

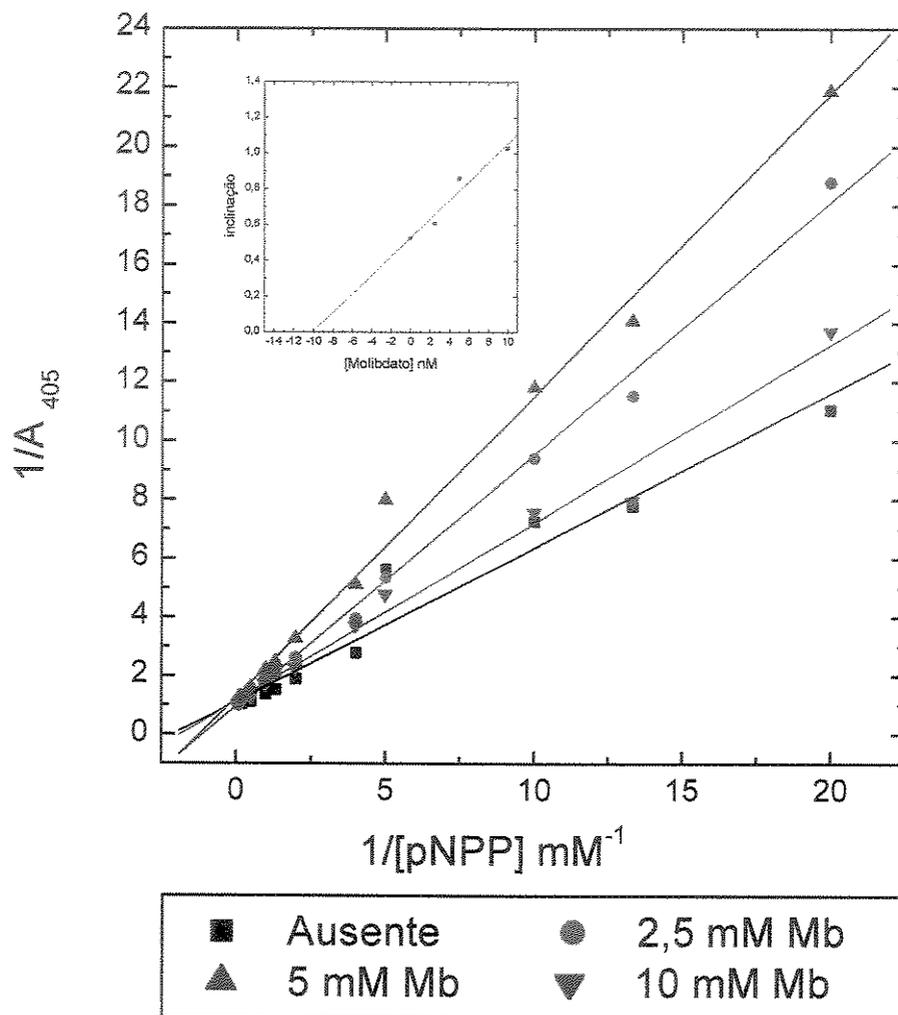


Figura 2. Inibição da fosfatase ácida por molibdato. Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição para o molibdato (interno). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1.

A inibição por α -vanadato foi classificada como competitiva como mostrado na figura 3. A constante de inibição, de $1,6 \times 10^{-3}$ mM, foi obtida por meio do gráfico da inclinação das retas contra as concentrações do inibidor. A inibição competitiva para α -vanadato era esperada uma vez que sua estrutura é parecida com a estrutura do fosfato (tabela 1). Assim, pode se adaptar como uma estrutura similar, no estado de transição, para reações de transferências de alguns grupos fosforilas (ZHANG et al, 1993). A K_i foi cerca de dez vezes menor quando comparada com a fração AP1 da FAc de sementes quiescentes de soja, $12,8 \times 10^{-3}$ mM (FERREIRA, 1997) e cerca de vinte vezes menor que o observado para a FAc com atividade fosfotirosil-proteína fosfatásica, de coração bovino, cujo valor da K_i foi de 29×10^{-3} mM (ZHANG & VAN ETTEN, 1990). É interessante mencionar que o α -vanadato é reconhecidamente um inibidor de fosfatases envolvidas no processo de proliferação celular, em especial as fosfotirosina-proteínas fosfatases (LAU et al, 1989).

O estudo de inibição por fluoreto apresentou um perfil diferente com relação aos outros inibidores estudados (Figura 4). Quando se tentou determinar o valor da K_i por meio do gráfico da inclinação das retas contra as concentrações do inibidor observamos um fenômeno diferente do observado para outros inibidores (Figura 4, interno); a intersecção das retas não ocorreu em um ponto em comum no eixo de $1/V_{\max}$ e nem no eixo de $-1/[S]$.

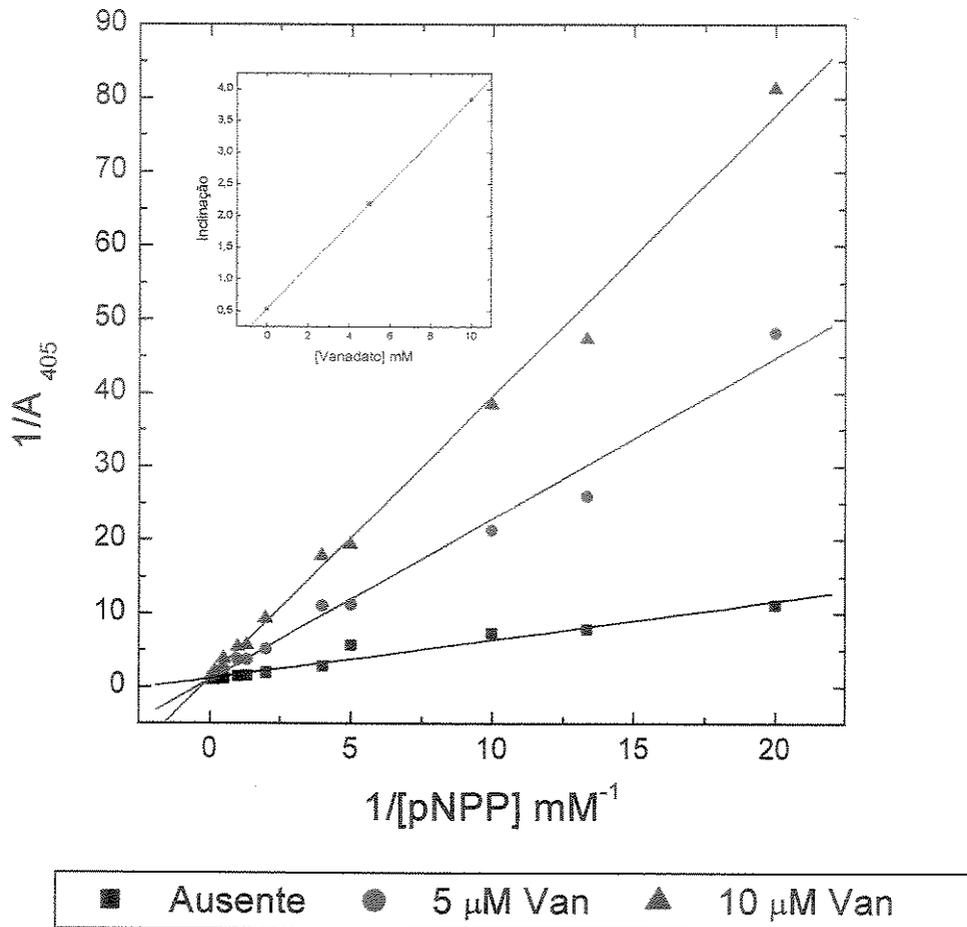


Figura 3. Inibição da Fosfatase ácida por o-vanadato. Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição para o-vanadato (interno). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1.

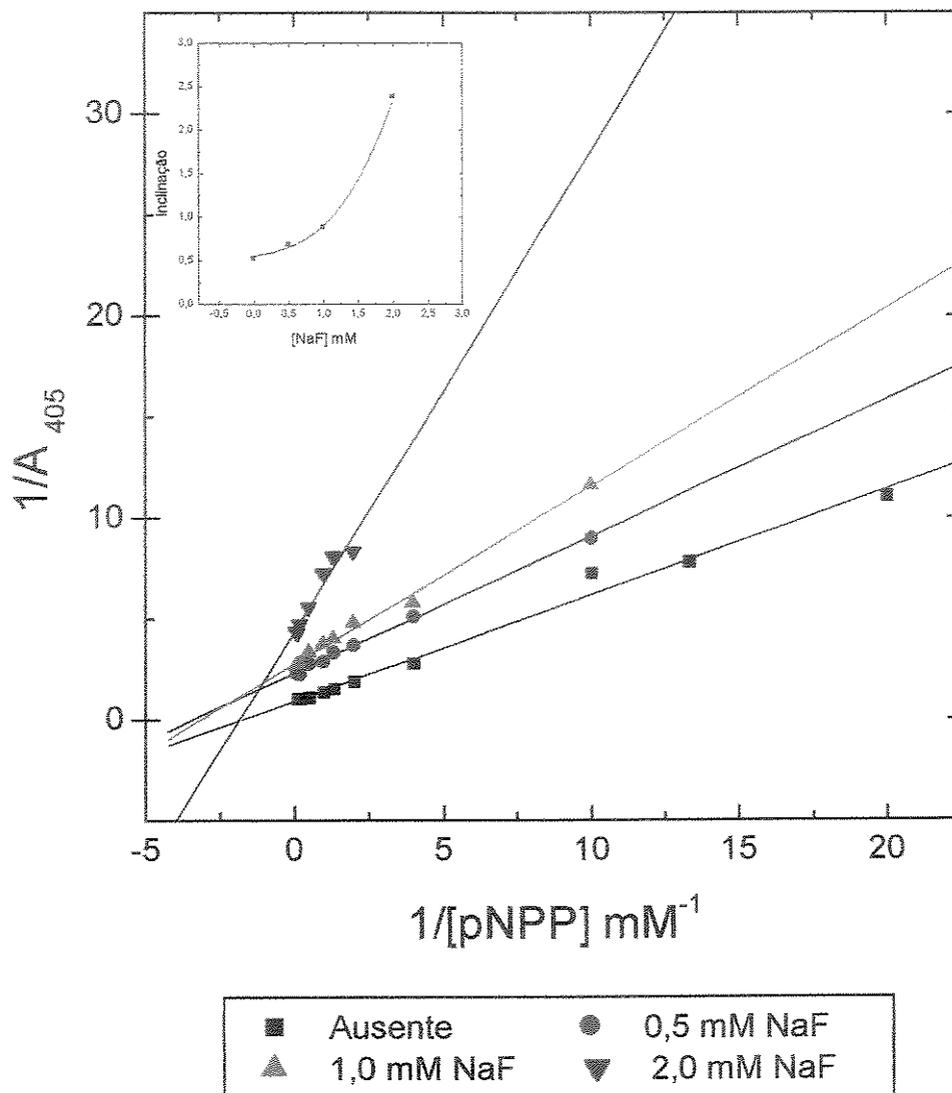


Figura 4. Inibição da fosfatase ácida por fluoreto. Gráfico de Dixon para determinação da constante de inibição para o fluoreto (interno). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1.

Um outro fato interessante foi que pelo gráfico do Dixon não observamos uma reta e sim uma curva parabólica. Portanto estes dois resultados em conjunto sugeriram uma inibição do tipo mista. Para confirmar este tipo de inibição e determinar os valores de K_i usamos o Método de Cornish-Bowlden para determinarmos as constantes de inibição do tipo mista, que é expresso por dois gráficos secundários, $1/V \times [\text{fluoreto}]$, para determinação da constante de inibição competitiva (K_{ic}), e gráfico $S/V \times [\text{fluoreto}]$, para determinação da constante de inibição incompetitiva (K_{iu}) (Figura 5). O valor de K_{ic} foi de 0,91 mM, e o valor de K_{iu} foi de 0,46 mM (Tabela 1). Desta maneira a inibição mista pelo fluoreto apresentou um perfil diferente dos relatados na literatura. Em 1995, REINER e colaboradores demonstraram que o fluoreto era um inibidor competitivo para FAc de próstata humana e que a inibição por este íon apresentava uma cinética complexa. Para a fração AP1 da fosfatase ácida de soja, estudada em nosso laboratório, a inibição foi competitiva com valor de K_i de $1,7 \times 10^{-3}$ mM (FERREIRA, 1999). Por outro lado, JACOB & SONTAG (1974) observaram para a FAc de *Hevea brasiliensis*, que o fluoreto era um inibidor não competitivo, com uma K_i de 0,4 mM.

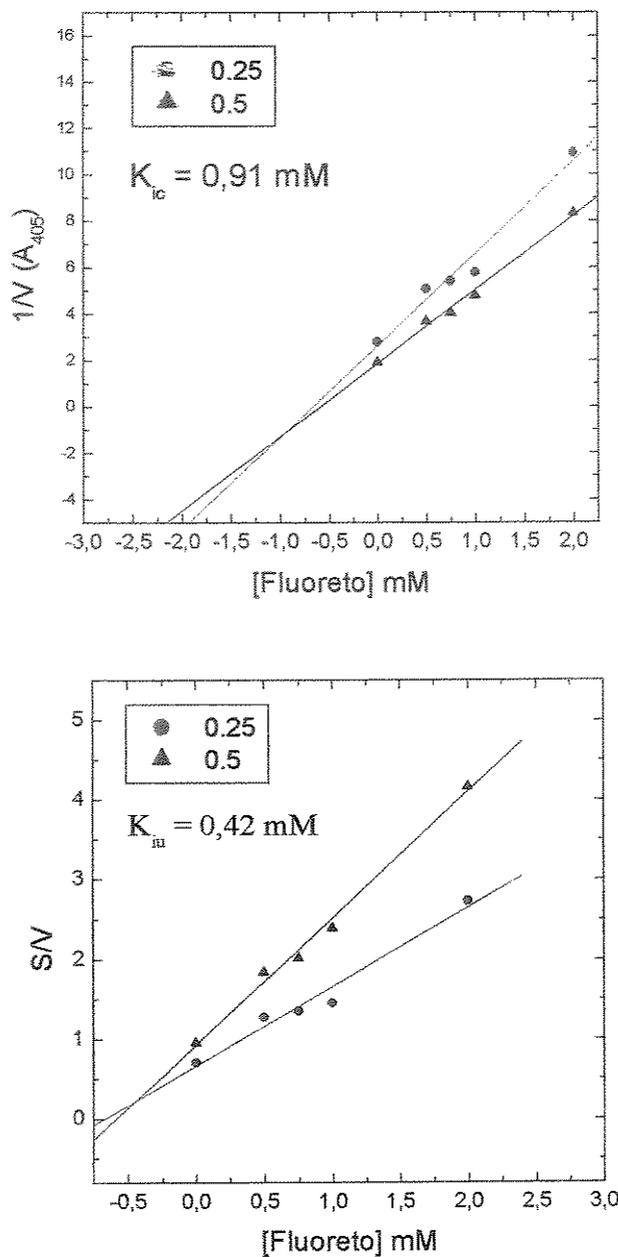


Figura 5. Gráfico de Cornish-Bowlden para determinação das constantes de inibição competitiva e acompetitiva para fluoreto. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1.

Tabela 1. Tipos de inibição e valores de K_i para o fosfato, molibdato, σ -vanadato e fluoreto para a FAc de mamona. Os valores de K_i foram determinados dos gráficos nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Inibidor	Tipo de inibição	K_i
Fosfato	Competitiva	0,14 mM
Molibdato	Competitiva	10×10^{-6} mM
σ -vanadato	Competitiva	$1,6 \times 10^{-3}$ mM
Fluoreto	Mista	K_{ic} 0,91 mM K_{iu} 0,42 mM

4.1.2 Estabilidade Térmica

O estudo de estabilidade térmica da FAc foi realizado pré-incubando a enzima em diferentes temperaturas. Após diferentes tempos, alíquotas eram retiradas e deixadas em banho de gelo para posterior determinação da atividade residual a 37 °C.

Os resultados mostram que a FAc de mamona apresenta cerca de 80% de atividade quando pré-incubada por 30 min a 45 °C e 50 °C. Contudo, após 30 min de pré-incubação a 55 e 60 °C houve uma perda de 50 e 90 %, respectivamente, de sua atividade (Figura 6).

Na figura 7 verificamos o efeito do pNP e Pi (produtos da hidrólise do pNPP) como possíveis protetores da inativação térmica. Dentre os compostos testados, o melhor efeito protetor foi observado quando a enzima foi pré-incubada com pNP e Pi juntos, 40% de inativação, quando comparado com a pré-incubação da enzima, na ausência destes compostos (80% de inativação). Isto sugere que os produtos da reação contribuem para manter a conformação adequada para a catálise enzimática através da ligação dos mesmos no sítio ativo da enzima. Este efeito não foi observado quando os produtos da reação foram usados separadamente. Assim, existem dois locais distintos para a ligação de pNP e Pi no sítio ativo da enzima, e estes locais estão em regiões próximas uma das outras.

Quando testados separadamente não se observou efeito protetor. FERREIRA et al (1998b), demonstraram que o pNP e Pi também protegiam a FAc de sementes quiescentes de soja contra a inativação térmica, de maneira mais efetiva para a de mamona.

O comportamento da FAc de mamona frente ao efeito da temperatura quando as mesmas foram pré incubadas, mostra que esta fosfatase é mais estável do que a maioria de outras fosfatases de plantas relatadas na literatura. NINOMIYA et al (1977) purificaram de células de tabaco em cultura uma fosfatase ácida que nos estudos de inativação a 55°C permaneceu com cerca de 10% da atividade após 30 minutos. Duas frações contendo atividade fosfatásica foram purificadas também de células de tabaco cultivadas na ausência de fosfato por UEKI & SATO (1977) os quais mostraram que a fração denominada S-1 foi razoavelmente estável e a fração S-2 foi inativada cerca de 90% quando pré-incubadas a 55°C. A fosfatase ácida de raízes de cevada perdeu 50% da atividade após 5 minutos de pré-incubação a 50°C (PANARA et al, 1990). GELLATLY et al (1994) relataram que uma FAc de tubérculos de batata apresentou 100% da atividade após 4 minutos de pré-incubação a 65°C. Por outro lado FERREIRA et al (1998b) mostraram que as quatro frações das fosfatases ácidas de sementes quiescentes de soja apresentaram cerca

de 100% de atividade enzimática à temperatura de 80°C, quando pNPP foi utilizado como substrato.

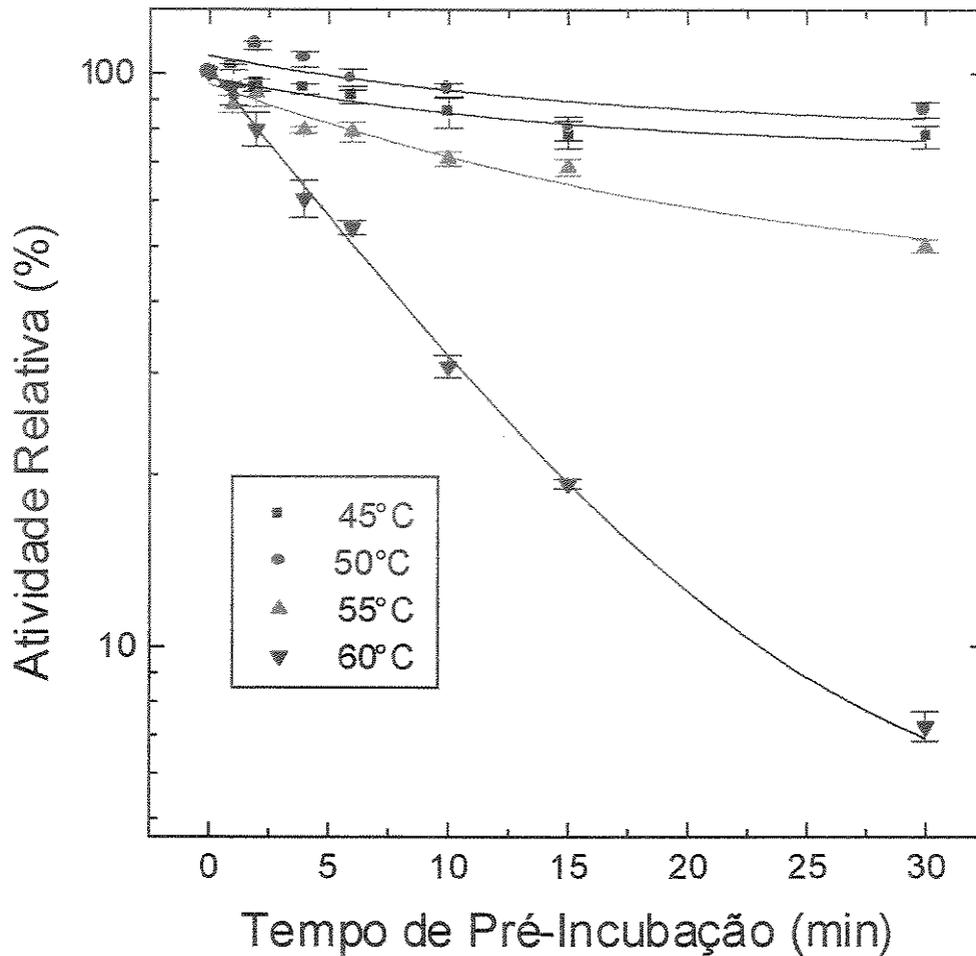


Figura 6. Estabilidade térmica da fosfatase ácida de mamona em diferentes temperaturas. O ensaio foi realizado como descrito em métodos; a enzima foi pré-incubada nas temperaturas e tempos indicados. A atividade enzimática remanescente foi determinada de acordo com método 3.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

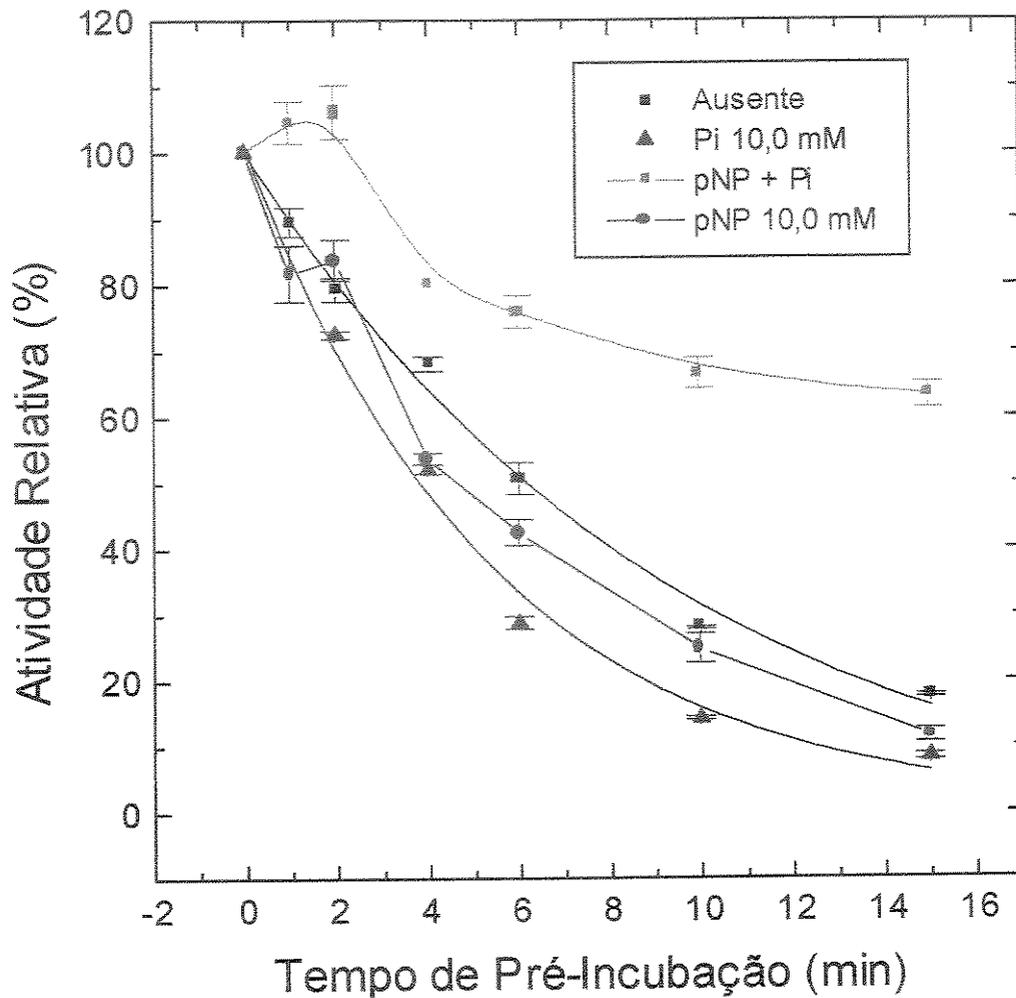


Figura 7. Efeito de protetores na estabilidade térmica da fosfatase ácida de mamona. A enzima foi pré-incubada à 60°C, nos tempos indicados, na ausência e presença de fosfato inorgânico e/ou *p*-nitrofenol. A atividade remanescente foi determinada de acordo com o método 3.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.1.3 Mapeamento de sítio ativo

As informações sobre a identidade dos resíduos de aminoácidos que podem ser essenciais para a atividade da FAc de sementes de mamona foram obtidas através do uso de compostos que reagem especificamente com algum grupo particular de aminoácido funcional, na concentração de 10 mM final (BULONE et al, 1999).

Primeiramente, o efeito dos reagentes modificadores mostrou ser temperatura dependente uma vez que a inibição foi maior na temperatura de pré-incubação de 37°C (Tabela 2). Nenhuma inibição significativa ocorreu com fenilglioxal (PGO), dietil-pirocarbonato (DEPC) e N-acetilimidazol (NAI) modificadores químicos específicos para arginina, histidina e tirosina, respectivamente, mostrando que possivelmente estes aminoácidos não são importantes para a atividade enzimática.

Tabela 2. Efeito de reagentes modificadores de aminoácido na atividade da fosfatase ácida de sementes de mamona.

Reagente modificador	Atividade Relativa (%)	
	25 °C	37 °C
Dietil-pirocarbonato (DEPC)	100	100
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC)	85	70
N,N'-diciclohexicarbodiimida (DCCD)	80	50
ácido iodoacético (IAA)	100	50
N-bromosuccinamida (NBS)	100	40
N-acetilimidazol (NAI)	100	100
Fenilglioxal (PGO)	100	90

Embora N-bromosuccinamida (NBS) tenha apresentado inibição de 60 %, indicando que o triptofano é essencial para a atividade da enzima, o estudo de proteção feito na presença de p-nitrofenol e fosfato 10 mM, que atuam no sítio ativo, não mostrou a reversão da atividade da enzima na presença destes compostos protetores (resultados não apresentados), indicando que este aminoácido é importante para a atividade da enzima, mas que pode estar presente em uma região que não seja o sítio ativo da enzima.

Similarmente o mesmo ocorreu para os compostos que atuam em grupos carboxilas de aminoácidos como, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N,N'-diciohexycarbodiimida (DCCD), que promoveram inibição de 30 e 40%, respectivamente, mostrando que ácidos glutâmico e aspártico são importantes para a atividade da enzima, mas que não foi possível afirmar a presença destes no sítio ativo da enzima uma vez que a reversão da atividade não ocorreu na presença de compostos protetores da atividade enzimática.

Por outro lado, a inibição de 50% pelo ácido iodoacético (IAA) mostrou que os grupos SH de cisteína são importantes para a atividade da enzima e que se encontram no sítio ativo da enzima uma vez que na presença de compostos protetores como, o p-nitrofenol e fosfato 10 mM, a atividade da enzima foi revertida para 70%.

Portanto escolhemos o reagente modificador IAA para detalharmos os estudos referentes a sua atuação em resíduos de cisteína.

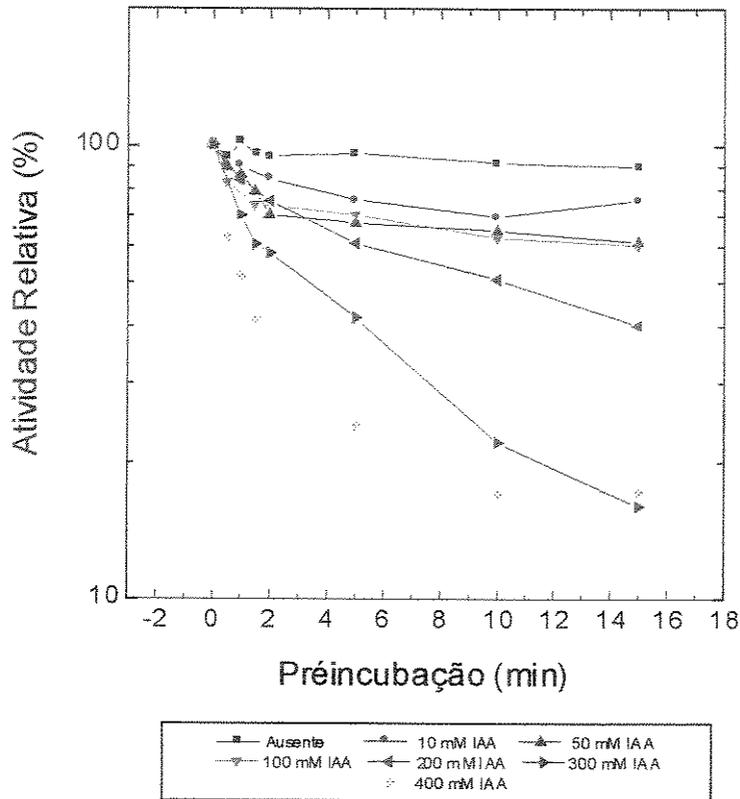


Figura 8. Inativação da Fosfatase ácida de sementes de mamona por IAA. A enzima foi pré-incubada em diferentes tempos e a reação enzimática iniciou-se com a adição de *p*NPP. A atividade residual foi expressa como porcentagem do controle na ausência de IAA.

Cinética de inativação da FAc de sementes de mamona por IAA

De acordo com a figura 8 observamos que a inativação da enzima foi do tipo concentração e tempo dependente. Em 1998, PRAKASH & BHUSAN demonstraram que a urease de melancia (*Citrullus vulgaris*) era concentração e tempo dependente quando inativada por IAA. Fato observado, também, para a (1-3)- β -glicano sintase de centeio (BULONE et al, 1999). A razão/taxa de inativação em função da concentração de IAA foi linear, sugerindo fortemente que um complexo não reversível foi formado entre a enzima e o reagente (Figura 9). Através da inclinação da reta do gráfico da figura 9 obtivemos o valor de $2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ como sendo da constante bimolecular aparente da enzima na presença do reagente modificador, ou seja, é o valor da reatividade do agente modificador. A ordem da reação de inativação foi determinada de acordo com LEVY et al (1963) através do gráfico logarítmo de K_{app} versus logarítmo da concentração de IAA (Figura 10). Este gráfico ainda nos forneceu uma inclinação para a reta de 2,09, indicando que a ordem da reação de inativação foi 2 e que cada molécula de enzima inativada contém duas moléculas de IAA ligada por sítio ativo, ou melhor, cada sítio ativo contém dois grupos de cisteína que reagem com duas moléculas de IAA.

Estudos prévios mostraram a importância de grupos SH para a atividade enzimática da fosfatase ácida de sementes de mamona (GRANJEIRO et al, 1999) e

que o bloqueio destes grupos com inibidores de SH favoreciam intensamente a perda da atividade enzimática, mostrando que estes grupos são importantes para a catálise enzimática. Apesar de ser pouco comum em fosfatases ácidas de plantas a sensibilidade por inibidores de grupos SH, as fosfatases ácidas de baixa massa molecular relativa de fonte animal são extremamente sensíveis à inibição por tais reagentes (BITTENCOURT & CHAIMOVIC, 1976; GRANJEIRO et al, 1997b), indicando que os grupos SH podem estar envolvidos na catálise de fosfatases ácidas sensíveis a estes reagentes. Em 2000, SRIVASTASA & KAYASTA demonstraram que a atividade catalítica da urease de sementes de *Cajanus cajan* L. era inativadas por pCMB, sendo assim, os grupos SH essenciais para a atividade catalítica, e que esta inibição era revertida quando um excesso de cisteína era adicionado.

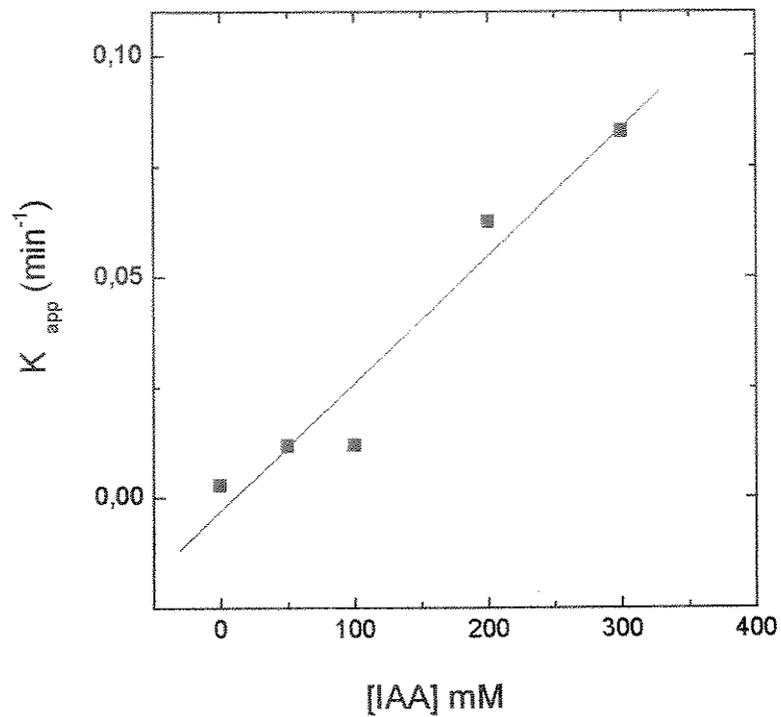


Figura 9. Gráfico de dependência da constante aparente (K_{app}) de inativação em função da concentração de IAA. Os valores de K_{app} foram determinados através da inclinação das retas de cada concentração de IAA pré-incubada em diferentes tempos.

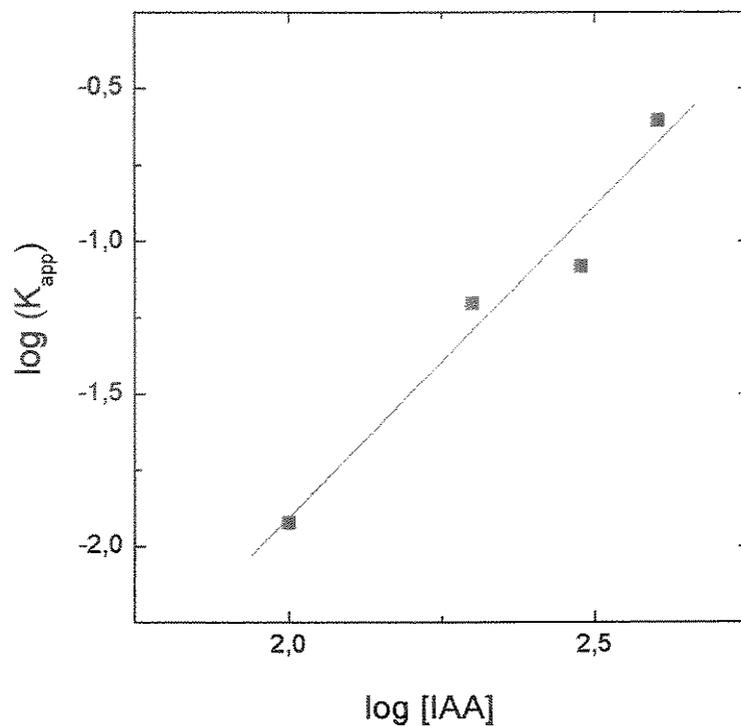


Figura 10. Determinação da ordem aparente da reação de inativação. A inclinação da curva foi de 2,05. A inclinação da reta obtida indica que 2 aminoácidos cisteína estão presentes no sítio ativo da enzima.

4.2 Estudos Físico-químico e conformacional

4.2.1 Desnaturação por Uréia

Inicialmente procuramos determinar o tempo necessário para a completa desnaturação da enzima pela uréia. O espectro de emissão foi determinado após diversos intervalos de tempo até 24 horas. Assim pudemos verificar que a desnaturação se completou após 7 horas e que foi reversível por diluição, imediatamente após o equilíbrio da solução. (não mostrado).

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão podemos observar uma alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração de uréia e um concomitante deslocamento dos picos de emissão para o vermelho (Figura 11), provavelmente devido à exposição dos grupamentos de tirosina, hidrofóbicos, pela ação da uréia.

Plotando-se os valores de comprimento de onda de emissão máximo em função da concentração de uréia (Figura 12), obtemos uma curva de desnaturação simples, sugerindo que o mecanismo de desnaturação da FAc de mamona por uréia envolve dois estágios. Esta observação é reforçada pelo deslocamento do centro de massa (Figura 12, interna). Os dois resultados demonstram que em concentrações acima de 4 M de uréia o processo de desnaturação se inicia. Uma observação interessante é que a inclinação da reta na fase de transição é muito mais acentuada quando se

monitorou o comprimento máximo de absorção (λ_{\max}) do que o centro de massa (Figura 14, interna).

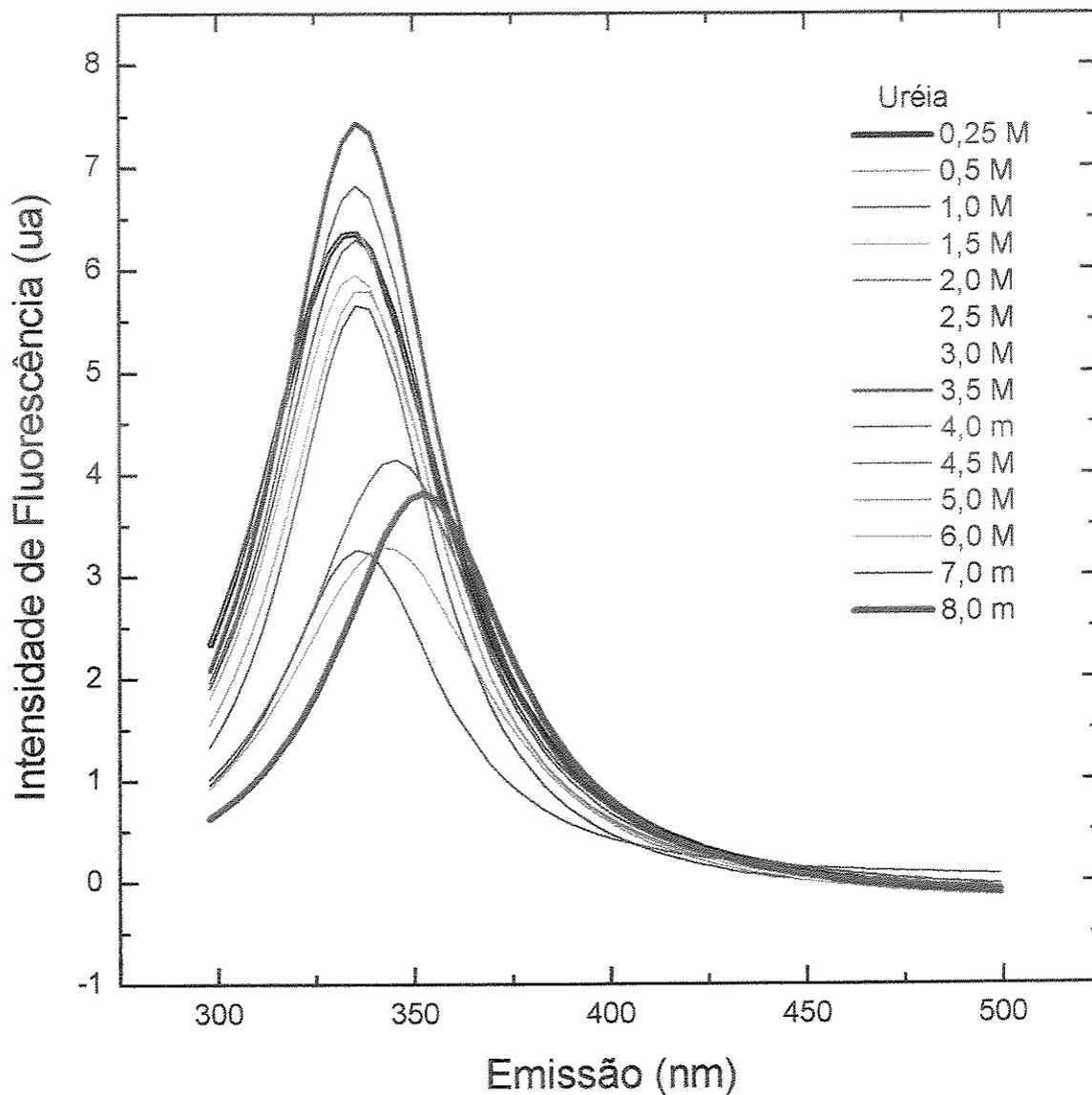


Figura 11. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de uréia. As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 293 nm. A concentração de enzima utilizada foi de 10 μg .

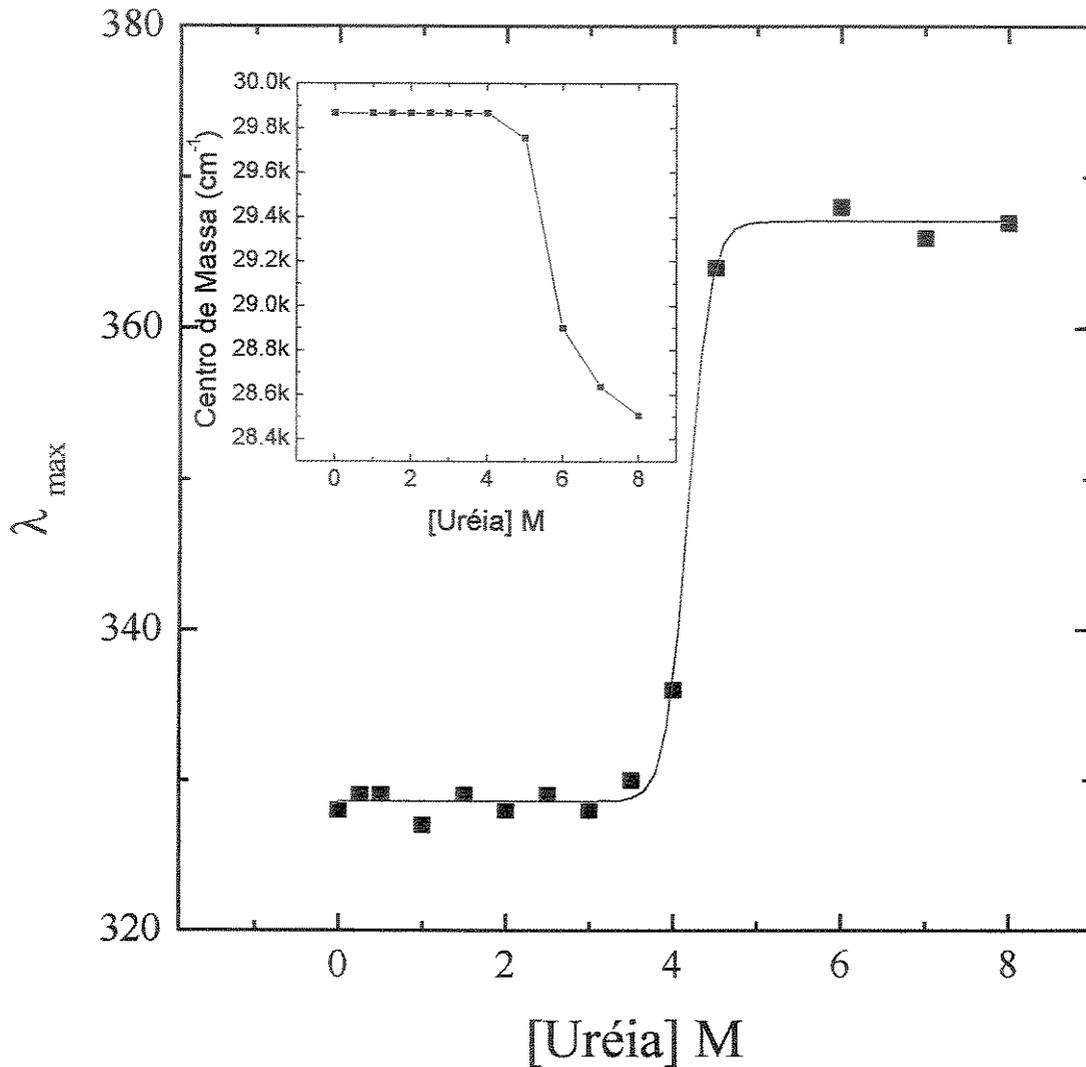


Figura 12. Curva de desnaturação da FAc de mamona por uréia. Efeito da uréia no centro de massa da enzima (interno). Os valores de comprimento de onda máximo foram obtidos da fig. 11. Os valores de centro de massa foram obtidos de acordo com o valor médio de cada área da curva de intensidade de fluorescência.

Na figura 13 temos o gráfico da atividade da FAc em função da concentração de uréia, a perda de atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração de uréia, sendo máxima na concentração de 6 M. Na concentração de 4 M a atividade residual é de 60%; nesta concentração tanto o $\lambda_{m\acute{a}x}$ como o centro de massa estão apenas começando a variar (Figura 12 e interno). Isto demonstra que o início do processo de desnaturação da proteína garante uma conformação adequada para a sua atividade enzimática.

Uma vez que o processo de desnaturação é reversível e parece envolver apenas dois estágios, nativo e desnaturado, podemos utilizar o método de PACE (1990) para calcular os parâmetros termodinâmicos da desnaturação por uréia.

Assim, a fração de proteína desnaturada, F_d , pode ser calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$F_d = (y_n - y_{obs}) / (y_n - y_d)$$

onde y_{obs} é a intensidade de fluorescência observada, e y_n e y_d representam os valores de y característicos à conformação nativa e desnaturada, obtidos de acordo com PACE (1990) (Figura 14). A diferença de energia livre entre os estados nativos e desnaturados, ΔG , pode ser calculado através da seguinte fórmula:

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

onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal mol}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin.

Em geral, a variação de energia livre é linear em relação à concentração do desnaturante (Figura 14, interno). O método de análise dos mínimos quadrados é usado para demonstrar os valores da região de transição pela equação:

$$\Delta G = \Delta G (\text{H}_2\text{O}) - m [\text{D}]$$

onde $\Delta G (\text{H}_2\text{O})$ é o valor de ΔG na ausência do desnaturante, m é o intercepto da transição desnaturante, ou seja, a medida da dependência do ΔG em relação à concentração do desnaturante, e [D] é a concentração do desnaturante. Assim os valores de m para a FAc de mamona foi de $0,991 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ e o de $\Delta G (\text{H}_2\text{O})$ foi de $4,91 \text{ kcal mol}^{-1}$ (tabela 3).

O mecanismo de desnaturação do tipo dois-estágios encontrado pela FAc de mamona na presença de uréia, também já foi observado em outras fosfatases ácidas (BORNADATA et al, 1996 e POKALSKY et al, 1995) e na Ribonuclease A (PACE, 1990). O deslocamento do centro de massa da enzima já foi observado na proteína do vírus do mosaico do tabaco (BONAFÉ et al, 1998). A perda da atividade enzimática na presença de compostos desnaturantes evidencia que a integridade conformacional é extremamente importante para a atividade catalítica (CHEN et al, 1997).

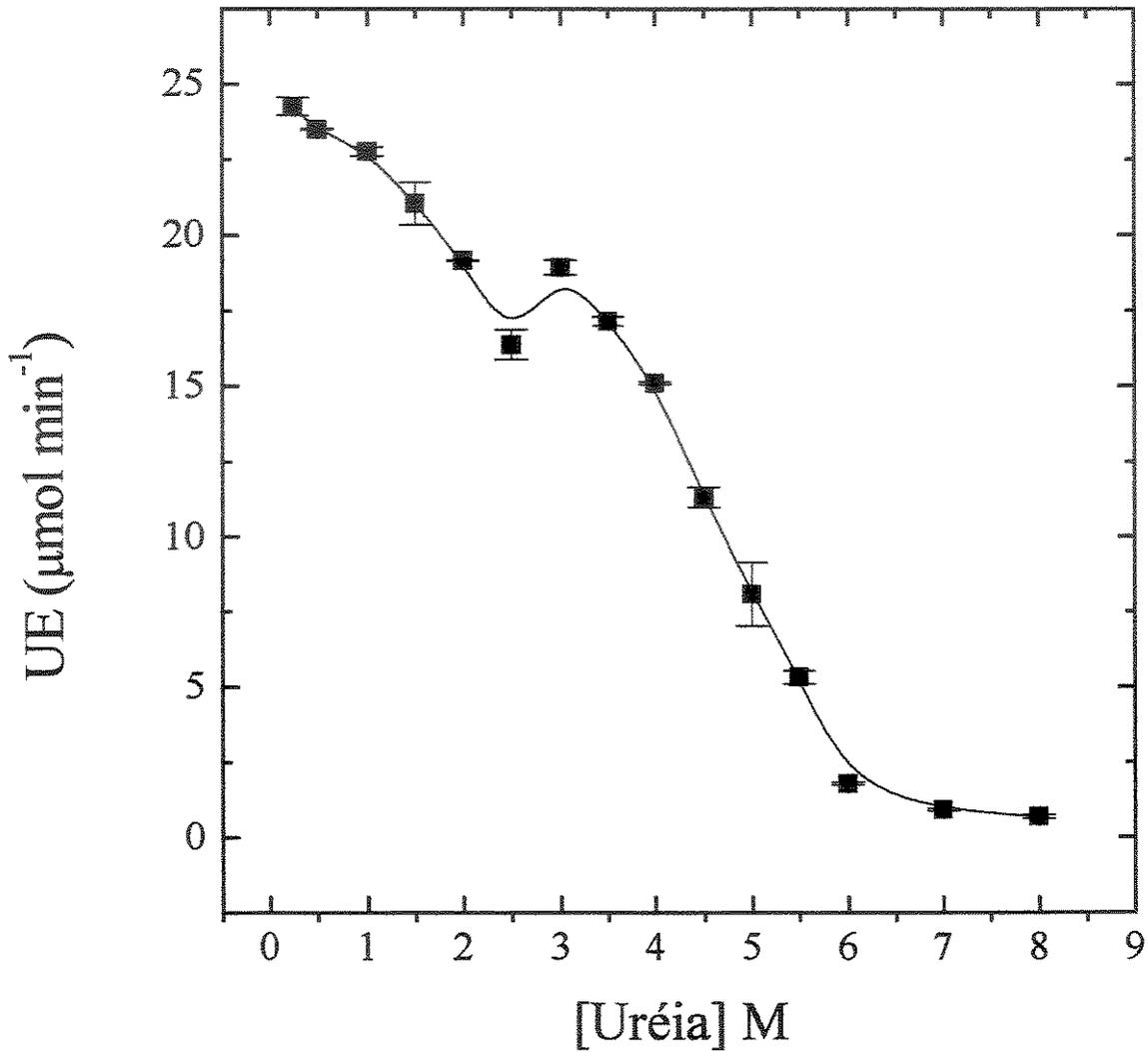


Figura 13. Efeito da variação da uréia na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

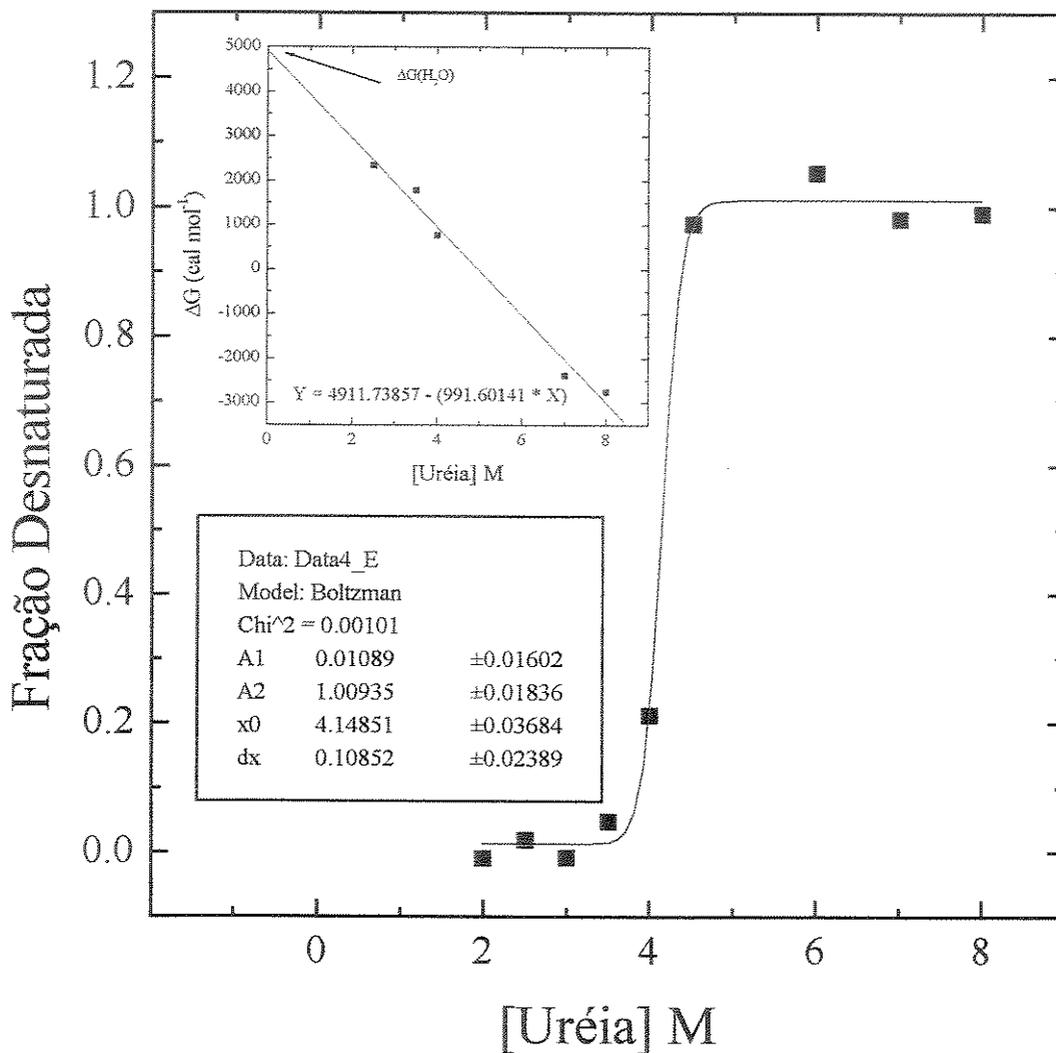


Figura 14. Gráfico do efeito da uréia na fração desnaturada da enzima.

Determinação da variação de energia livre na ausência do agente desnaturante, ΔG (H₂O) (interno).

Tabela 3. Parâmetros característicos da desnaturação da FAc de mamona por uréia. Os valores de m , $D_{1/2}$ e ΔG (H_2O) foram obtidos do gráfico 14.

Desnaturante	Parâmetros de desnaturação		
	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	$D_{1/2}$ (M)	ΔG (H_2O) (Kcal mol ⁻¹)
uréia	0,991	4,95	4,91

O valor de ΔG (H_2O) da enzima desnaturada por uréia está de acordo com os relatados na literatura para maioria das proteínas globulares, ou seja, na faixa de 5-15 kcal mol⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de ΔG (H_2O) para diferentes proteínas na presença de uréia.

Proteína	ΔG (H_2O) (Kcal mol ⁻¹)	Referências
Recombinante Humano FK	5,9	EGAN et al, 1993
Ribonuclease T1	7,94	PACE & LAURENTS, 1989

4.2.2 Desnaturação por Cloreto de guanidina

Da mesma forma que com a uréia, inicialmente procuramos determinar o tempo necessário para a completa desnaturação da enzima pelo cloreto de guanidina. O espectro de emissão foi determinado após diversos intervalos de tempo até 80 horas. Assim pudemos verificar que a desnaturação se completou após 55 horas e que foi reversível por diluição, imediatamente após o equilíbrio da solução (não mostrado).

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão podemos observar o mesmo efeito que ocorreu com a desnaturação por uréia, ou seja, uma alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração do cloreto de guanidina e um concomitante deslocamento dos picos de emissão para o vermelho (Figura 15), que provavelmente é devido à exposição dos grupamentos de tirosina, hidrofóbicos, por ação do cloreto de guanidina.

Plotando-se os valores de comprimento de onda de emissão máximo em função da concentração do cloreto de guanidina (Figura 16), também obtemos uma curva de desnaturação simples, sugerindo que o mecanismo de desnaturação da FAc por cloreto de guanidina envolve dois estágios. Esta observação é reforçada pelo deslocamento do centro de massa (Figura 16, interna). Os resultados demonstram

que em concentrações acima de 2 M de cloreto de guanidina o processo de desnaturação se inicia.

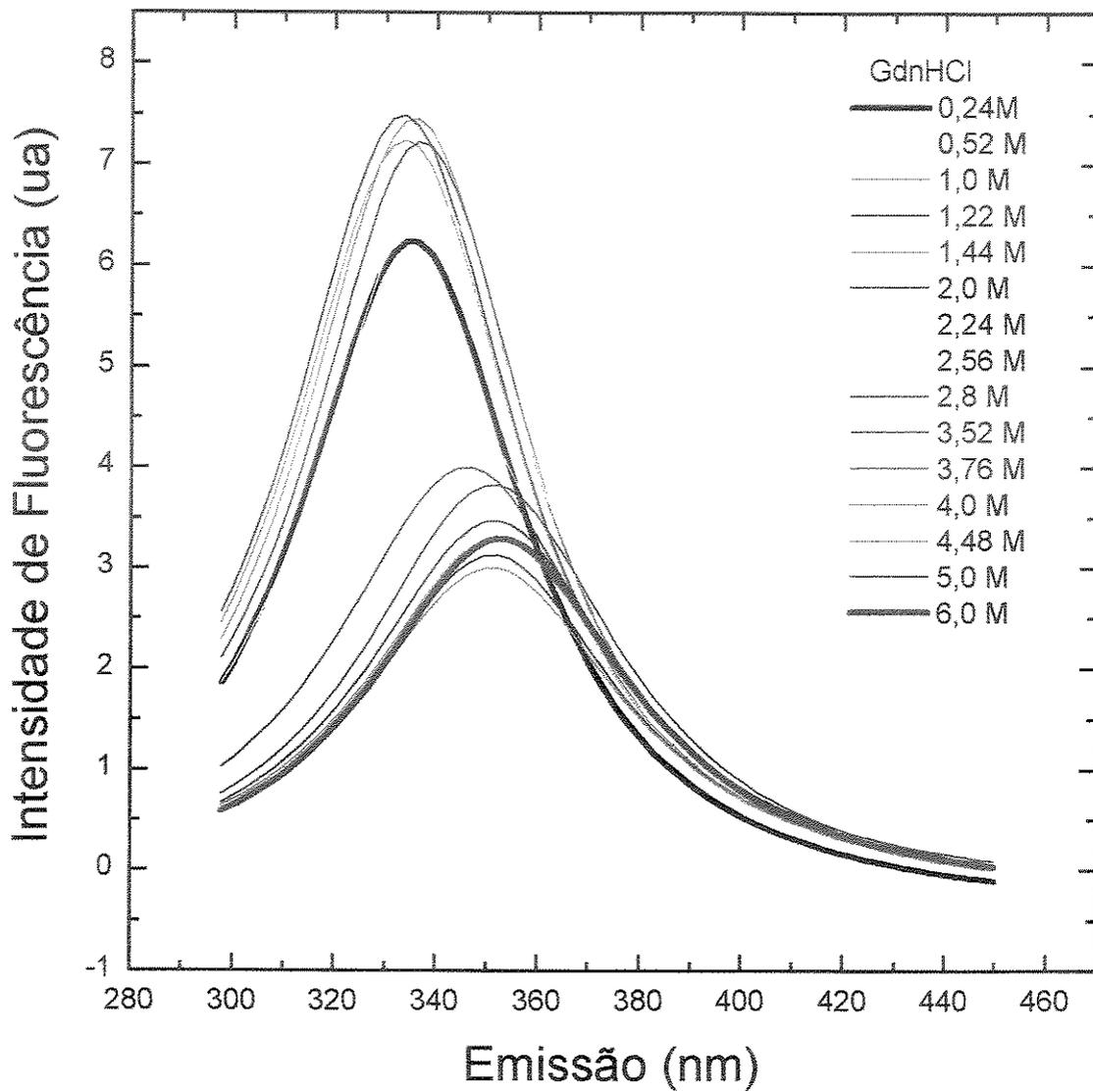


Figura 15. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de cloreto de guanidina. As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 293 nm. A concentração de enzima utilizada foi de 10 μ g.

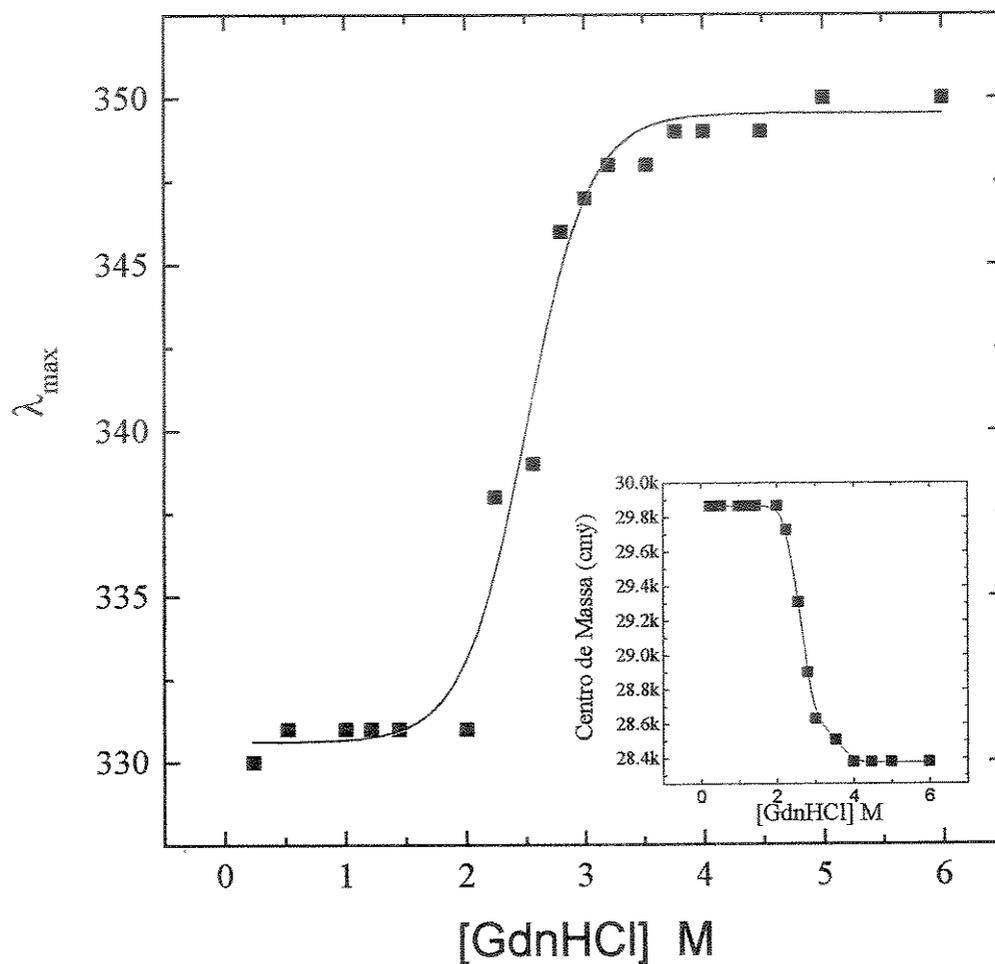


Figura 16. Curva de desnaturação da FAc de mamona por cloreto de guanidina. Efeito do cloreto de guanidina no centro de massa da enzima (interno). Os valores de comprimento de onda máximo foram obtidos da fig. 15. Os valores de centro de massa foram obtidos de acordo com o valor médio de cada área da curva de intensidade de fluorescência.

Na figura 17 temos o gráfico da atividade da FAc em função da concentração de cloreto de guanidina, a perda de atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração de cloreto de guanidina. Diferentemente do que ocorreu com a uréia, em concentrações acima de 2 M a atividade enzimática residual é praticamente nula. Por outro lado na concentração de 2 M, tanto o comprimento de onda máximo como o centro de massa estão apenas começando a variar (Figura 16, interna).

Como no estudo do efeito da uréia, uma vez que o processo de desnaturação é reversível e provavelmente envolve apenas dois estágios, nativo e desnaturado, podemos utilizar o método de PACE (1990) para calcular os parâmetros termodinâmicos da desnaturação por cloreto de guanidina (Figura 18). Assim, determinamos o valor de $2,12 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ e $4,98 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o m e $\Delta G (\text{H}_2\text{O})$, respectivamente, para a desnaturação por cloreto de guanidina.

Tabela 5. Parâmetros característicos da desnaturação da FAc de mamona por cloreto de guanidina. Os valores de m , $D_{1/2}$ e $\Delta G (\text{H}_2\text{O})$ foram obtidos da figura 18.

Desnaturante	Parâmetros de desnaturação		
	$m (\text{kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$D_{1/2} (\text{M})$	$\Delta G (\text{H}_2\text{O}) (\text{Kcal mol}^{-1})$
GdnHCl	2,118	2,35	4,98

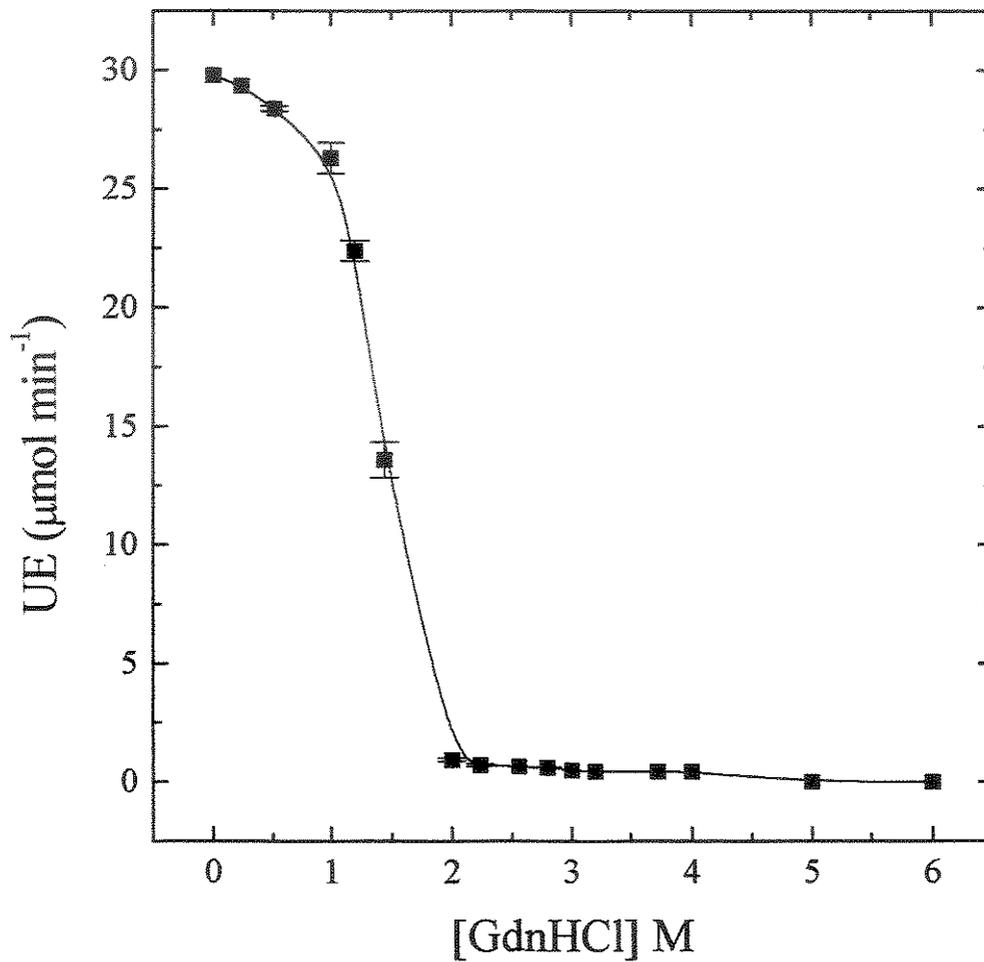


Figura 17. Efeito do cloreto de guanidina na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método 3.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

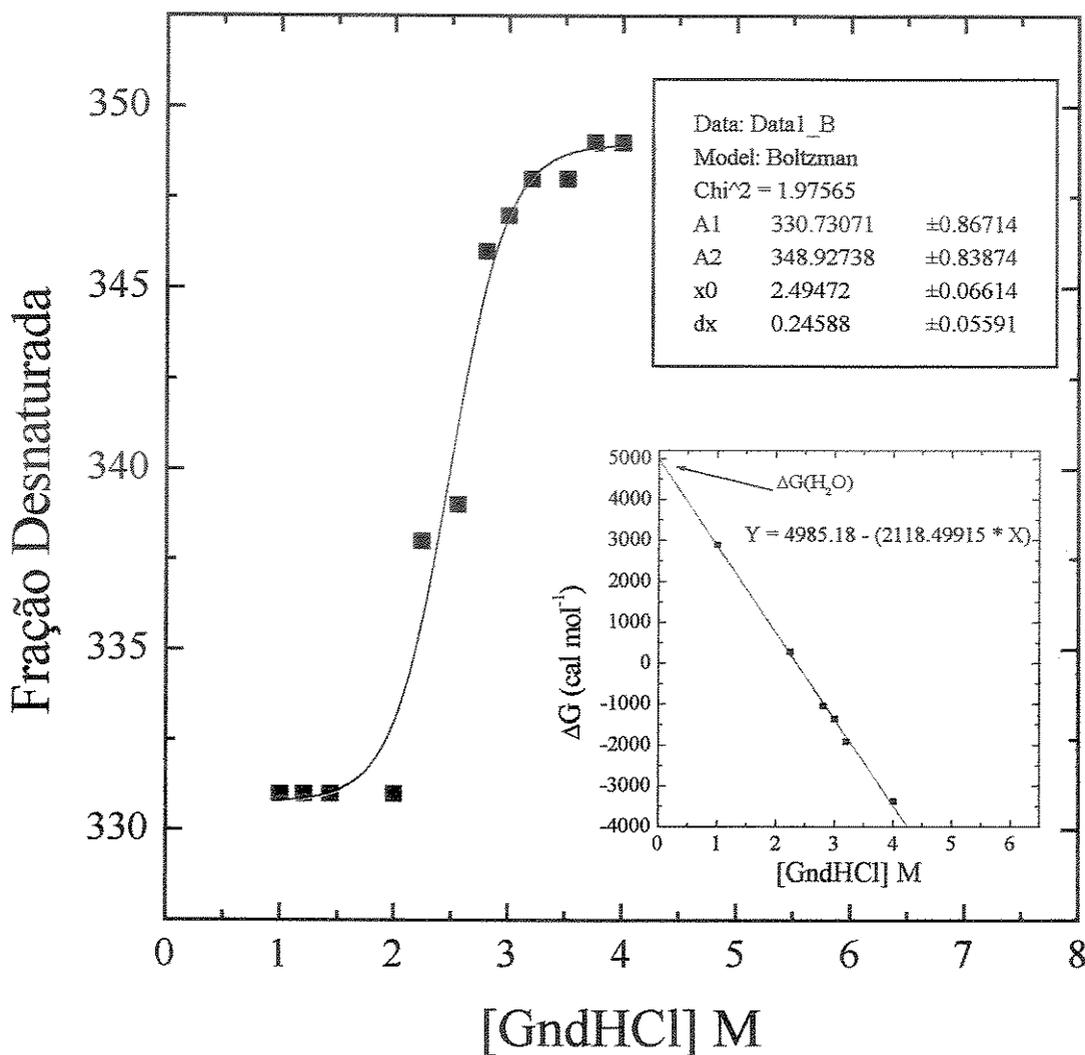


Figura 18. Gráfico do efeito do cloreto de guanidina na fração desnaturada da enzima. Determinação da variação de energia livre na ausência do agente desnaturante, ΔG (H_2O) (interno).

O valor de ΔG (H_2O) da enzima desnaturada por cloreto de guanidina, assim como na presença de uréia, também está de acordo com os relatados na literatura pela maioria das proteínas globulares, ou seja, na faixa de 5-15 kcal mol⁻¹ (Tabela 6). Análises das curvas de desnaturação por estes dois solventes na enzima indicam que, embora o cloreto de guanidina seja cerca de duas vezes mais potente que a uréia, o valor de ΔG (H_2O) obtido dos dois desnaturantes estão em excelente concordância (Tabela 3 e 5), demonstrando que o valor de variação de energia livre do processo de desnaturação está relacionado com a proteína em si e não com os agentes desnaturantes utilizados. Valores próximos de ΔG (H_2O) (5,8 kcal mol⁻¹) também foram observados para lisozima utilizando como desnaturantes uréia e cloreto de guanidina (GREENE & PACE, 1974, PACE, 1986).

Tabela 6. Valores de ΔG (H_2O) de diferentes proteínas na presença de cloreto de guanidina.

Proteína	ΔG (H_2O) (Kcal mol ⁻¹)	Referências
Mioglobina eqüina	9,7	PACE & VANDERBURG, 1978
FAc púrpura de feijão	5,2	CASHIKAR & RAO, 1996

4.2.3 Desnaturação Térmica

Utilizando a absorvância em 280 nm como um parâmetro conformacional, verificamos o efeito do pNP e Pi na desnaturação térmica da enzima (Figura 19). Podemos observar que a conformação nativa mantém-se estável até cerca de 60°C na ausência de compostos; na presença de pNP e Pi a A_{280} começa a aumentar próximo aos 70°C. Na ausência dos compostos o desnovelamento da enzima resulta em um significativo aumento da A_{280} que parece desenvolver-se em duas etapas distintas: i) aumento ligeiramente menos pronunciado entre 60 e 80°C e, ii) mais pronunciado entre 80 e 90°C. Acima desta temperatura inicia-se um processo de agregação com conseqüente precipitação da proteína, como verificado pela diminuição da A_{280} . Uma vez iniciado o resfriamento, há uma mudança conformacional que resulta em menor exposição dos resíduos de aminoácidos aromáticos, mas que se estabiliza em torno de 0,45. Na presença dos protetores, o perfil foi similar embora não tenha sido detectada a agregação. Nota-se ainda que após o resfriamento também não ocorreu uma diminuição da A_{280} até os níveis iniciais, mantendo-se estável em torno de 0,52.

O estudo de desnaturação térmica aponta ainda para a possível existência de um estado intermediário durante o desnovelamento causado pelo aumento da temperatura (Figura 19), diferentemente do observado na presença de uréia ou cloreto de guanidina. Isto pode ser verificado pelas distintas taxas de aumento da

A_{280} entre 60-80°C e entre 80-90°C. Estudos mais detalhados, provavelmente envolvendo o uso de um micro DSC (calorimetria diferencial de varredura), serão necessários para a elucidação desta evidência.

Estas observações são reforçadas pelo fato da enzima ser um dímero (GRANJEIRO et al, 1999). Assim, entre 60-80°C poderíamos estar observando a separação do dímero e, acima desta temperatura (entre 80-90°C), o desenovelamento dos monômeros. Acima de 90°C os monômeros desenovelados poderiam interagir formando agregados e precipitar.

Observando a figura 19, notamos que o platô após o resfriamento coincide com o ponto onde ocorre a mudança na taxa de aumento da A_{280} durante o aquecimento. Ou seja, o resfriamento permite o enovelamento do monômero, mas não a formação do dímero. Poderíamos supor a seguinte relação:

Dímero nativo > $A_{280} = 0,2$

Monômero enovelado (T=80°C) > $A_{280} = 0,5$

Monômero desenovelado (T=90°C) > $A_{280} = 1,05$

Platô após resfriamento > $A_{280} = 0,45$

Certamente estudos mais detalhados serão necessários para desvendar esse resultado instigante. Contudo, entendemos que esta enzima pode resultar em uma ferramenta extremamente interessante para o estudo conformacional de proteínas.

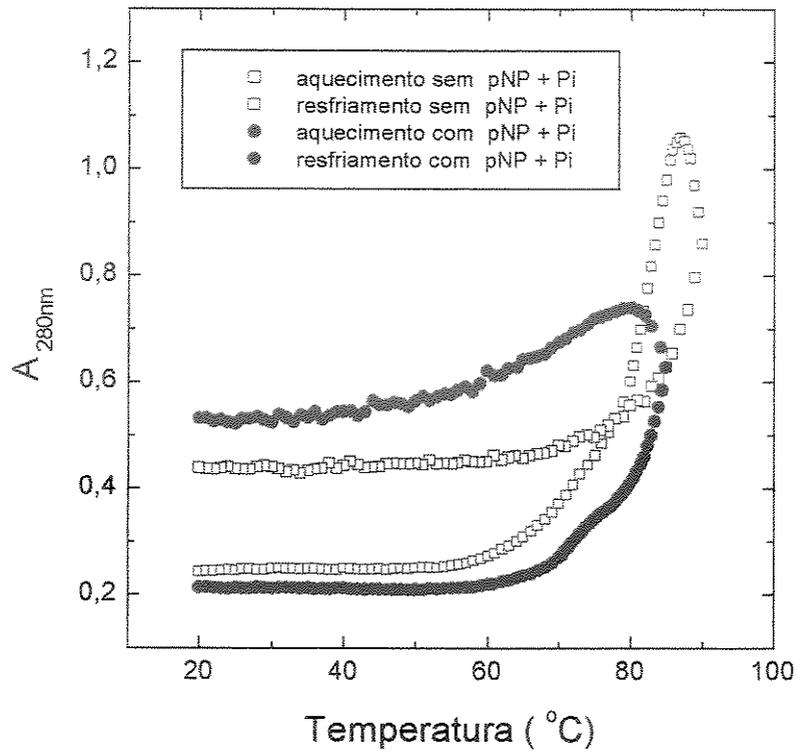


Figura 19. Gráfico da desnaturação térmica da FAc de mamona na ausência e presença de pNP e Pi.

4.2.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico da fosfatase ácida de sementes de mamona pôde ser previamente estabelecido numa faixa de pH de acordo com o comportamento desta enzima durante as etapas de purificação em que foram utilizadas resinas de troca iônica, uma vez que esta enzima não se ligava à resina de SP-Sephadex (catiônica) pH 5,0 e se ligava à resina de DEAE-Sephadex (aniônica) em pH 7,5, sugerindo um pI menor ou igual a 5 (GRANJEIRO et al, 1999).

Na eletrofocalização obtivemos um valor de pI de 4,6 (Figura 20), sendo este valor de ponto isoelétrico compatível com o comportamento observado nos perfis de eluição da FAc nas cromatografias de troca iônica.

Na determinação dos pontos isoelétricos nos géis foi considerada a banda de maior intensidade. As outras bandas que aparecem nos géis são devido à heterogeneidade proveniente da porção de carboidratos (SZALEWICZ et al, 1997; FERREIRA et al, 1998a).

O valor de pI encontrado para FAc de sementes de mamona está na mesma faixa dos encontrados para FAc de outras fontes, 4,5 para células de mostarda em cultura (DUFF et al, 1989), 4,7 para hipocotilédone de soja (DEWALD et al, 1993), 4,9 para sementes quiescentes de soja (FERREIRA et al, 1999).

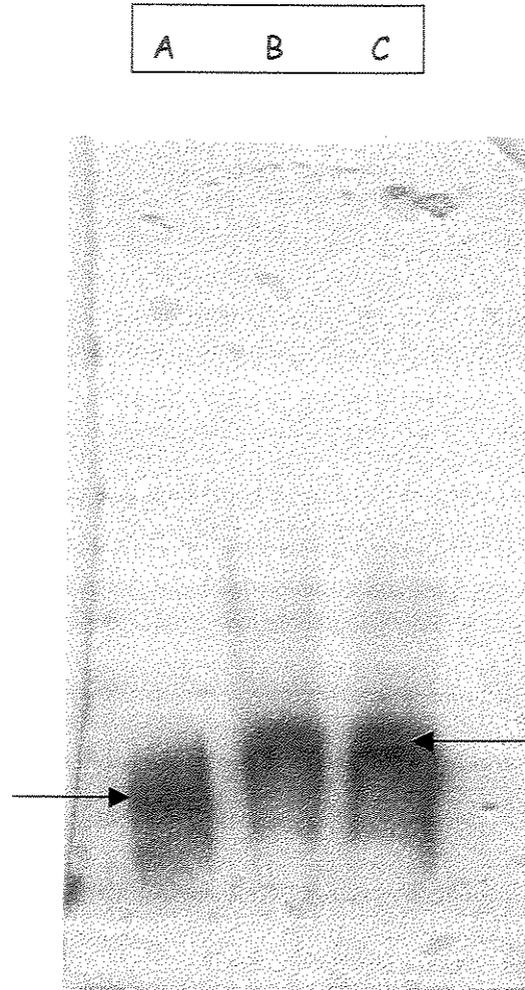


Figura 20. Focalização isoeétrica da fosfatase ácida de sementes de mamona. As condições da corrida foram descritas em métodos 4.4.d. Foram aplicados 25 μg de proteína e utilizados anfólitos de pH de 4,0 a 6,5. As setas indicam os valores de pI. Em A temos a enzima na ausência de EndoH, enquanto que em B e C temos 5 e 30 mUnidades de EndoH, respectivamente.

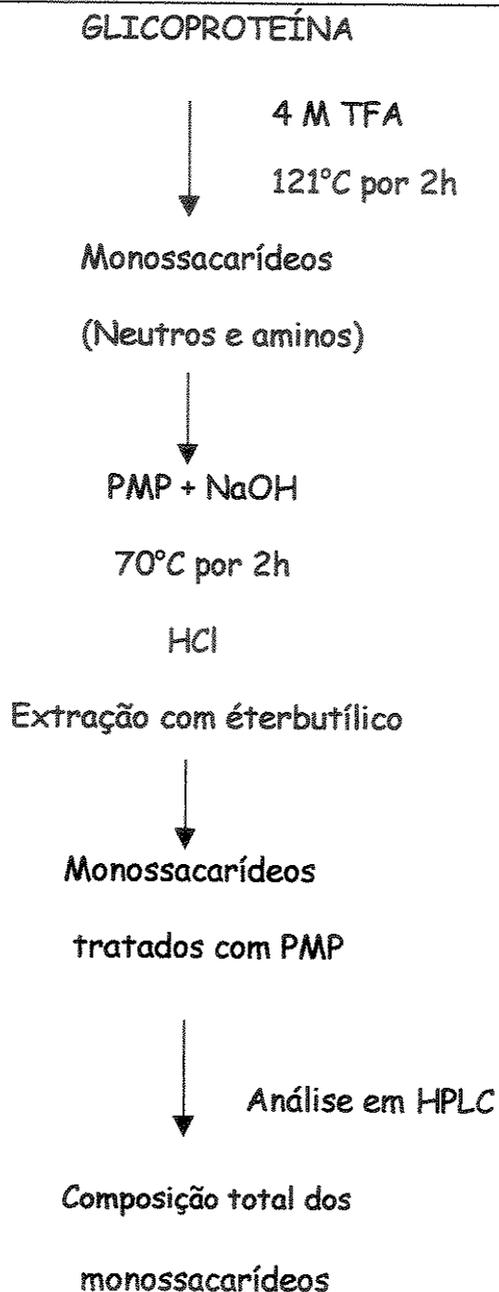
4.2.5 Determinação do Carboidrato Total

Comumente as fosfatases ácidas de plantas são glicoproteínas (DUFF et al, 1994). Como mostrado anteriormente (GRANJEIRO et al, 1999) a fração AP1 é uma glicoproteína e contém 40% de carboidrato em sua estrutura. O teor de carboidrato total foi determinado de acordo com o método de DISHE (1954; Método 4.4.e). FERREIRA et al (1999), já haviam mostrado que as isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B de fosfatase ácida de sementes de soja quiescentes apresentaram 30, 28, 18 e 10% de carboidrato em suas estruturas, respectivamente.

A presença de carboidratos nas enzimas, principalmente em plantas, por um lado, facilita sua purificação, uma vez que são retidas em resinas de afinidade como a Concanavalina A-Sepharose (GRANJEIRO et al, 1999), porém, por outro lado, prejudica o perfil de eletroforese, uma vez que os carboidratos são responsáveis pela heterogeneidade que aparece nos géis (MORRIS et al, 1989).

4.3 Composição do Carboidrato

O esquema abaixo mostra as etapas para determinação da composição de monossacarídeos na FAc de sementes de mamona.



A mistura equimolar dos cinco monossacarídeos (Manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose) foi tratada com PMP e separada por HPLC de fase-reversa (Figura 21). Todos os cinco monossacarídeos PMP-tratados foram resolvidos com linha de base de pelos menos dois minutos de separação de tempo de retenção. Após

várias aplicações dos padrões, pudemos observar uma excelente reprodutibilidade do experimento. Os picos para todos os monossacarídeos foram bem definidos e simétricos. Os cinco monossacarídeos utilizados como padrão representam os açúcares comumente encontrados em glicoproteínas provenientes de mamíferos, plantas e fungos (FU & O'NEILL, 1995).

A análise por HPLC do componente de açúcar da fosfatase ácida de sementes de mamona é mostrada na Figura 22. O único pico observado foi bem resolvido e seu tempo de retenção de aproximadamente 67 min foi similar ao tempo de retenção observado para glicose quando foram passados os padrões de monossacarídeos (Figura 21). Juntamente com o resultado de carboidratos totais podemos concluir que a quantidade de glicose foi de 40%. Este resultado foi diferente do observado para a composição de carboidratos da fosfatase ácida de sementes de soja quiescentes, o qual apresentou manose e glicosamina em sua estrutura (resultados não mostrados). Na tabela 7 podemos observar que não há uma composição similar entre as diferentes glicoproteínas já previamente descritas, porém glicosamina e manose os açúcares comumente encontrados nas diferentes glicoproteínas. Por outro lado não há relatos na literatura quanto à composição de carboidratos de fosfatases ácidas de plantas.

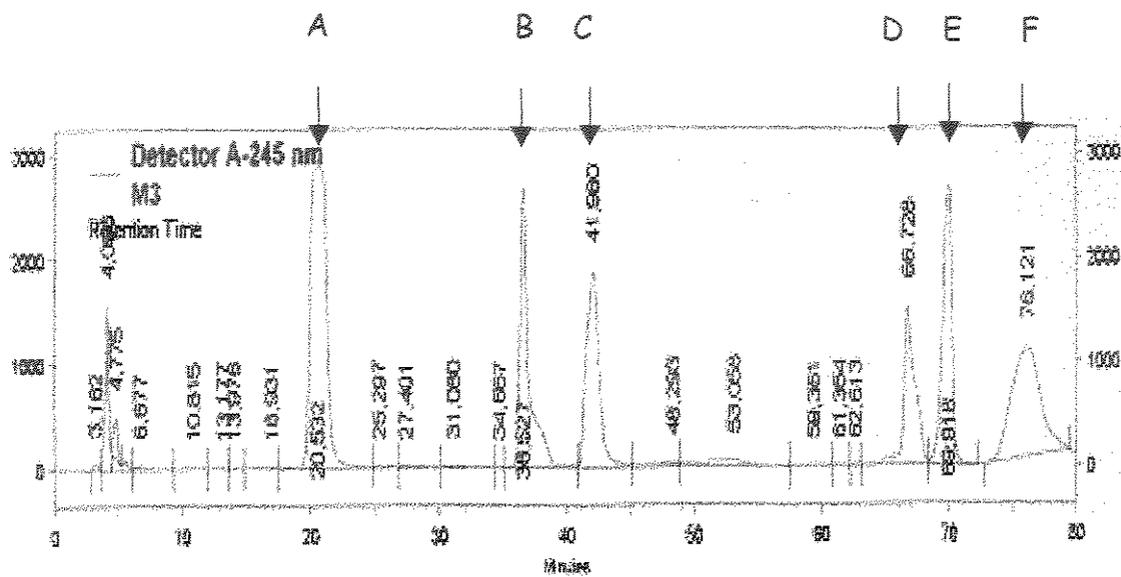


Figura 21. Separação por HPLC dos padrões de monossacarídeos PMP-tratados. A mistura de monossacarídeos, 10 nmol para cada manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, foi tratada com PMP e dissolvida em 200 μ L de água como descrito em métodos 4.4.f. O fluxo de corrida foi de 0,2 mL/min e o volume de amostra aplicado foi de 20 μ L. Os Picos A, B, C, D, E e F são PMP, manose, glicosamina, glicose, galactose e xilose, respectivamente.

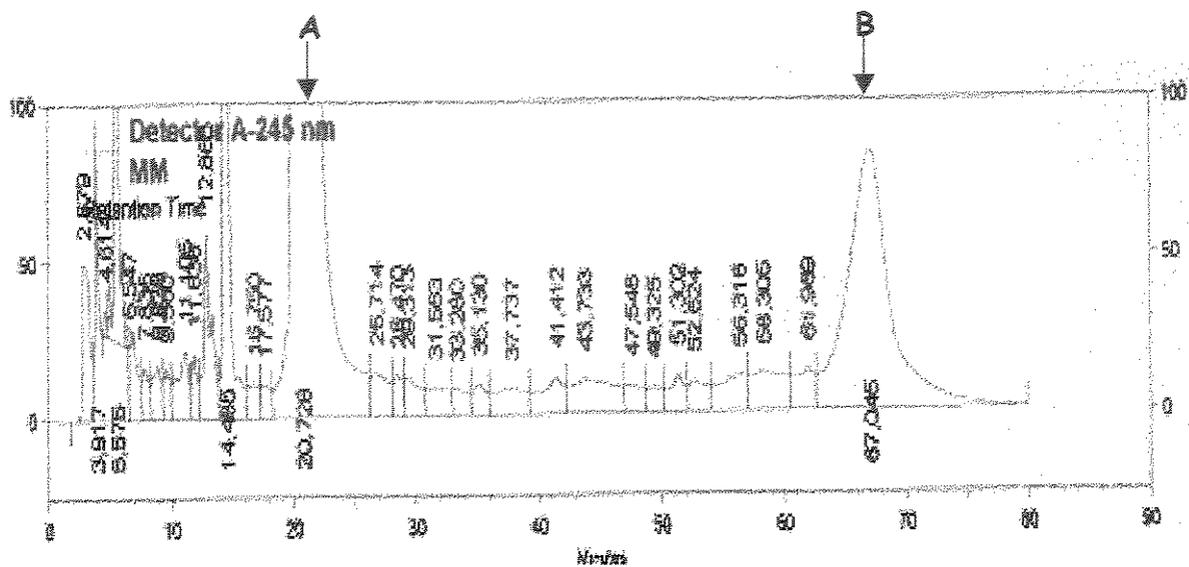


Figura 22. Separação por HPLC dos monossacarídeos neutros e aminos PMP-tratados da fosfatase ácida de sementes de mamona. A enzima (100 μg) foi hidrolisada com 4 M de TFA a 121°C por 2h. Depois foi secada, PMP tratada e analisada por HPLC como descrito em métodos 4.4.f. O fluxo de corrida foi de 0,2 mL/min e o volume de amostra aplicado foi de 20 μL . Os picos A e B são PMP e glicose, respectivamente.

Tabela 7. Análise da composição total de monossacarídeos de glicoproteínas relatadas na literatura.

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

OBS: FU & O'NEILL (1995).

4.3.1 Parâmetros cinéticos na ausência da porção de Carboidrato.

São inexistentes na literatura trabalhos relacionados a cinética enzimática com a enzima desprovida de sua porção de carboidrato. Assim, os resultados aqui apresentados não puderam ser comparados a outros, como no decorrer desta tese. Na presença de 12 mU de Endo-H realizamos a determinação do pH ótimo da enzima bem como a determinação da curva de Michaelis Menten afim de obtermos os valores de K_m , $V_{máx}$ e constante de especificidade. Embora estudos prévios determinaram o pH ótimo da enzima como sendo de 5,5, um pH ótimo adicional apareceu na faixa de 3,5 na enzima tratada com Endo-H (Figura 23).

Quanto ao comportamento da enzima frente ao substrato sintético *p*-nitrofenilfosfato, ocorreu um aumento na $V_{máx}$ e aumento da K_m (Figura 24) com diminuição de 2 vezes da constante de especificidade. Estes resultados sugerem a importância da porção de carboidrato não somente na atividade da enzima, mas também em sua estrutura conformacional.

A importância da porção de carboidrato para a estrutura e conseqüentemente a atividade enzimática está em sua contribuição para a diminuição da flutuação dinâmica da molécula de proteína. Além do mais, a glicosilação de proteínas aumenta a estabilidade conformacional das proteínas por diminuição do nível energético do

estado nativo (JOAO & DWEK, 1993; HIETTER & LEFÊVRE, 1996; KWON & YU, 1997)

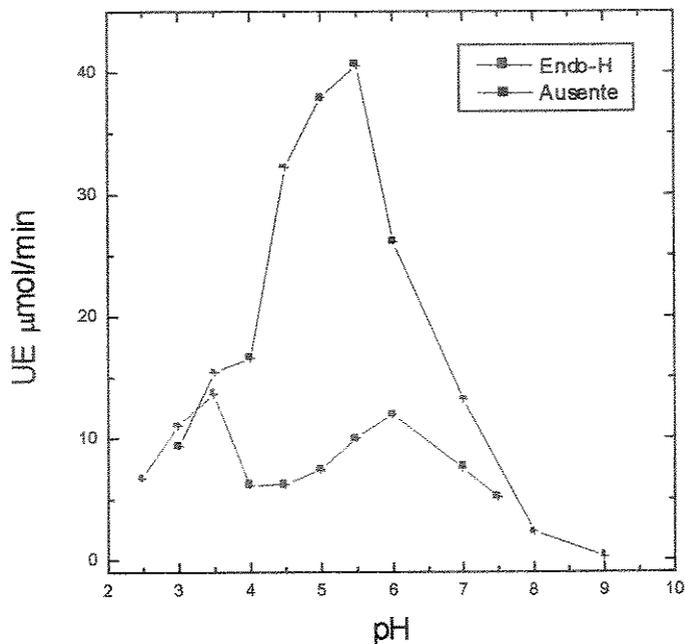


Figura 23. Efeito do pH na atividade da enzima. O ensaio foi realizado conforme descrito em método 4.6, utilizando o pNPP (5 mM) como substrato e tempo de reação de 40 min na presença e ausência de 12 mUnidades de Endo H. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM, foram: Glicina (pH 2,5 e 9,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5), Bis-Tris (pH 6,0) e Imidazol (pH 7,0 e 8,0).

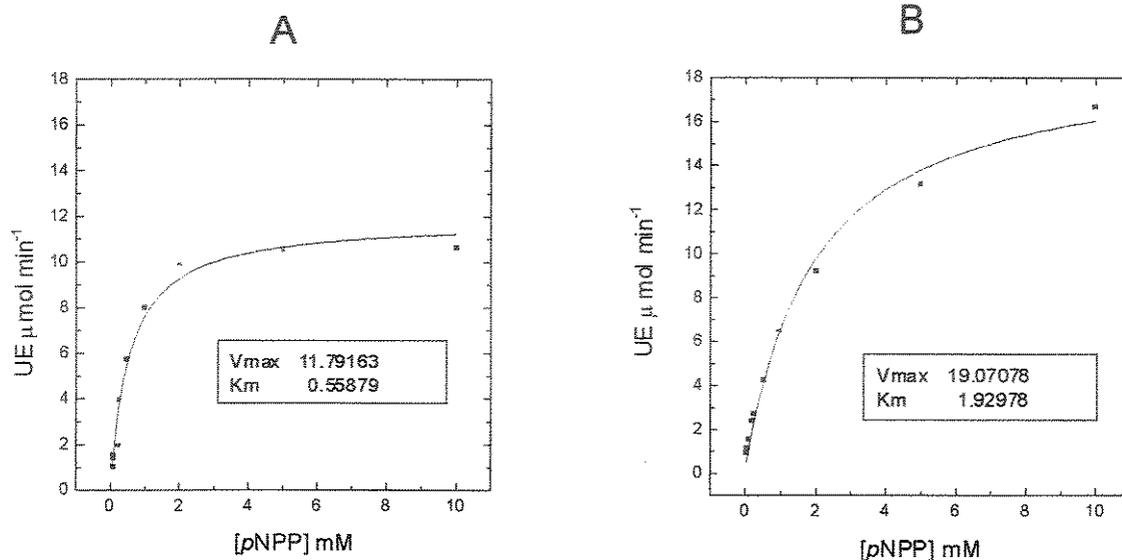


Figura 24. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$. O ensaio foi realizado como descrito em métodos 4.6, utilizando-se diferentes concentrações de pNPP. A reação foi iniciada pela adição de 0,03 μg de enzima. A K_m e a $V_{máx}$ foram calculadas pelo ajuste da curva (Hipérbole retangular) na ausência (A) e presença (B) de 12 mUnidades de Endo H.

Quando utilizamos a enzima Endo-H, responsável pela deglicosilação da porção de carboidrato da enzima, observamos dois fenômenos importantes (Figura 20). Primeiro ocorreu um aumento no valor de pI para 4,75, provavelmente devido a um aumento no número de cargas livres da enzima que anteriormente eram ocupadas pela porção de carboidrato. Segundo, que ocorreu uma diminuição na heterogeneidade da porção de carboidrato, o que não se observa na enzima não tratada com Endo-H. No entanto, é mostrado que nas condições de remoção completa da porção de carboidrato, a microheterogeneidade não é abolida, embora a multiplicidade de bandas sobre a focalização isoelétrica pode ser, no entanto, reduzida (MORRIS et al, 1989).

A remoção total de carboidratos das glicoproteínas em geral depende da natureza do oligossacarídeo presente na proteína. A porção de carboidrato da RNase B bovina e DNase A são rápida e totalmente removidas em baixas concentrações de EndoH ao passo que a ovalbumina necessita ser desnaturada anteriormente por rigorosos tratamentos, como por digestão com pronases; tratamento com SDS também pode potencializar o efeito removedor de carboidratos da EndoH. Uma outra classe de glicoproteínas, como Tiroglobulina e IgM necessitam de uma grande quantidade de EndoH ou inclusão de reações de

hidrólise para a remoção de carboidratos das glicoproteínas (TRIMBLE & MALEY, 1984).

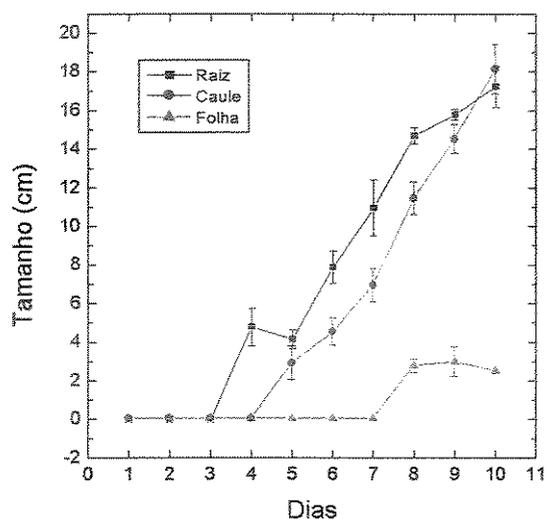
4.4 Estudos de germinação

Finalmente, realizamos alguns estudos sobre a germinação de sementes de mamona. O passo inicial do estudo de germinação de sementes de mamona foi padronizar as condições do experimento. Assim como demonstrado por LAGOA (1983), as sementes de mamona foram previamente embebidas em água Milli Q por um período de 6 horas, a fim de se quebrar o período de dormência das sementes.

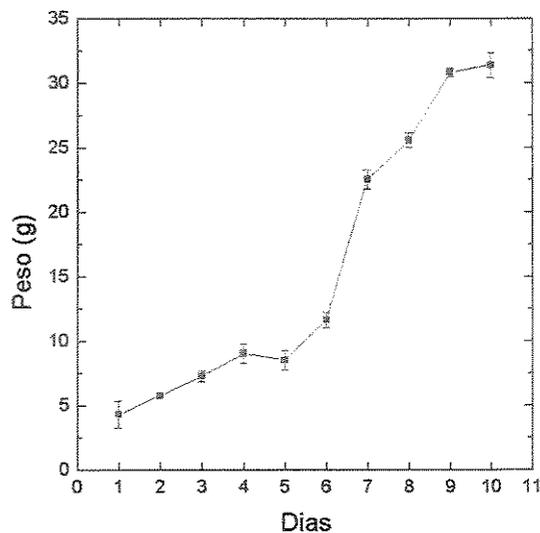
A figura 25 A mostra o crescimento das plântulas em relação ao tempo de germinação de 10 dias em câmara de germinação com temperatura controlada de 28°C, no escuro. Assim pode-se observar que o crescimento foi bastante acentuado e sem desaceleração a partir do terceiro e quarto dia, para raiz e caule, respectivamente. O aumento da raiz proporcional ao aumento do caule era esperado, pois as raízes são importantes para a mobilização de fósforo proveniente do solo (SCHACHTMAN et al, 1998). Por outro lado, o crescimento da folha ocorreu somente a partir do sétimo dia e tornou-se constante a partir do oitavo dia.

O peso da plântula apresentou um crescimento acentuado de acordo com o aumento dos dias de germinação, como demonstrado pela figura 25 B. Um fato curioso é que a partir do sexto dia o peso seco das plântulas duplicou, em uma

proporção que não ocorreu com os tamanhos de raiz e caule das plântulas. Isto pode ser devido a expressão de novas proteínas ou a biossíntese de reservas energéticas para a planta, como o amido.



A



B

Figura 25. Crescimento e peso das plântulas. As sementes de mamona foram germinadas de acordo com métodos 4.6. Para uma quantidade de 10 plântulas foram mensuradas, durante a germinação, os comprimentos do caule, raiz e folha (A) e o peso total fresco (B).

Após a determinação das condições ideais de germinação das sementes de mamona, procuramos determinar o perfil de atividade fosfatásica utilizando diferentes substratos, tais como, p NPP, PPI, Tyr-P, PEP e ácido fítico.

De acordo com a figura 26, podemos observar que o pico de atividade fosfatásica na presença do substrato p NPP foi no sétimo dia, enquanto que para PPI e Tyr-P o pico apareceu no nono dia e para PEP apareceu no quinto dia de germinação. Também podemos notar que a atividade fosfatásica para o p NPP foi bastante superior quando comparado com os outros substratos utilizados.

Diferentemente, a atividade da fosfatase ácida na presença do ácido fítico, uma importante fonte de fosfato por se tratar de um composto hexafosfato, praticamente não ocorre nesta variedade de mamona, fato este também observado para a germinação de sementes de soja realizada em nosso laboratório. Por outro lado, GIBSON & ULLAH (1988) demonstraram que uma outra variedade de soja apresentou pico de atividade fosfatásica para o ácido fítico em torno do décimo dia. Vale ressaltar que também não foi observada atividade fitásica nas 4 isoformas de FAc de sementes quiescentes de soja (FERREIRA et al, 1998a) e para a fração AP1 purificada das sementes de mamona (GRANJEIRO et al, 1999).

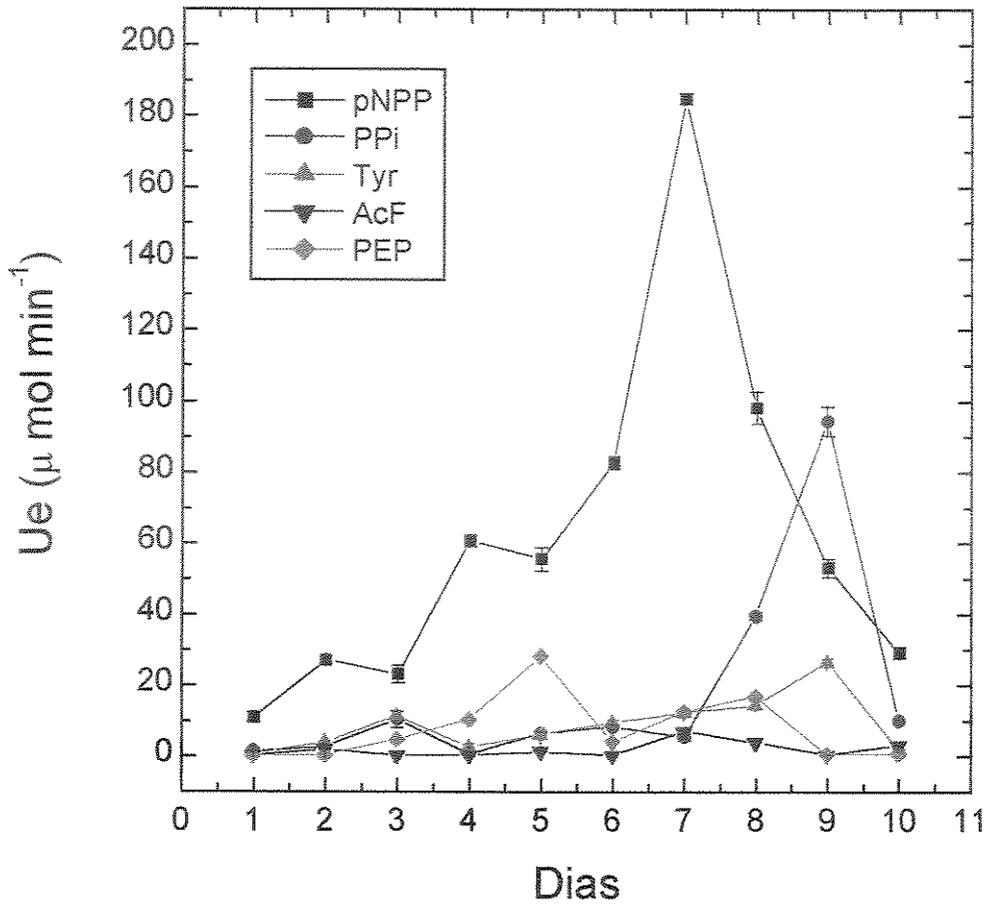


Figura 26. Características da fosfatase ácida de sementes de mamona durante a germinação, utilizando diferentes substratos. As sementes foram germinadas a 28°C, e do extrato bruto obtido, foram determinadas as atividades usando como substratos pNPP, PPI, Tyr-Pi, ÁcF e PEP.

No extrato das plântulas determinou-se o teor de proteínas totais e de fosfato inorgânico (figura 27). De acordo com o gráfico de dosagem de proteína pode-se observar que a sua concentração aumenta de acordo com o aumento dos dias de germinação, com o seu pico de atividade em torno do oitavo dia de germinação. Este pico de concentração de proteína é coincidente com o aparecimento de maiores atividades fosfatásicas para os diferentes substratos utilizados. Portanto pode-se sugerir que nesta fase ocorre maior expressão de proteínas nas plantas. BEWLEY (1997) relatou que durante a germinação é comum a síntese de proteínas, uma vez que todos os componentes necessários para a retomada da síntese protéica estarem presentes no embrião maduro das sementes. Além do mais, RNAm pré-formados estão presentes no embrião seco, sendo os responsáveis pela mensagem residual associada com os processos de desenvolvimento prévio (COMAI & HARADA, 1990; LANE, 1991) e que podem ser usados transitoriamente durante o início da germinação. Todavia, algumas mudanças em RNAm de embriões e proteínas sintetizadas, essenciais para o suporte do metabolismo celular normal, ocorrem durante a germinação de algumas espécies de monocotiledôneas como o milho (SÁNCHEZ & MARTINEZ, 1986), dicotiledôneas como a ervilha (LALONDE & BEWLWY, 1986) e coníferas como os pinheiros (MULLEN et al, 1996). Já o conteúdo de fosfato inorgânico diminui drasticamente

com o tempo de germinação. Esta diminuição está relacionada a sua utilização como um importante macronutriente para as plantas, sendo também um dos constituintes dos ácidos nucléicos, fosfolipídios e ATP (SCHACHTMAN et al, 1998). Além do mais, o fosfato está envolvido no controle de reações de enzimas chaves e na regulação das vias metabólicas (THEODORU & PLAXTON, 1993). É interessante observar que é justamente a partir da queda da quantidade de fosfato que a atividade enzimática da fosfatase ácida tende a aumentar. O aumento da atividade fosfatásica para o PPI à partir do sétimo dia de germinação poderia ser uma forma de suprir, eficientemente e com menor custo energético, as necessidades de fosfato para o crescimento e desenvolvimento da mamona, e assim não sendo necessário a biossíntese de uma fitase.

À partir do terceiro dia do pico de fosfato, ocorre uma queda acentuada de sua concentração, isso porque justamente nesta fase ocorre maior utilização, por parte da planta, de fosfato para o seu desenvolvimento. Paralelamente, podemos observar um aumento acentuado de proteínas, e esse aumento pode estar relacionado com aumento da expressão de fosfatases ácidas, uma vez que estas enzimas são os componentes intra e extracelulares responsáveis, em plantas, da deficiência de fósforo (GOLDSTEIN et al, 1988). Além do mais, a regulação destas enzimas é crítica para que a planta sobreviva em solos que tenham quantidade

limitante de fósforo (DUFF et al, 1991). Em 1990, KUMMEROVÁ & BURESOVA demonstraram um aumento da atividade fosfatásica em dois genótipos de raízes de milho quando os mesmos foram submetidos a uma deficiência de fosfato exógeno. A deficiência de fósforo com o aumento da atividade fosfatásica em milho foi também evidenciada por FRIES e colaboradores (1998), demonstrando o papel chave desta enzima na mobilização de fósforo para as plantas.

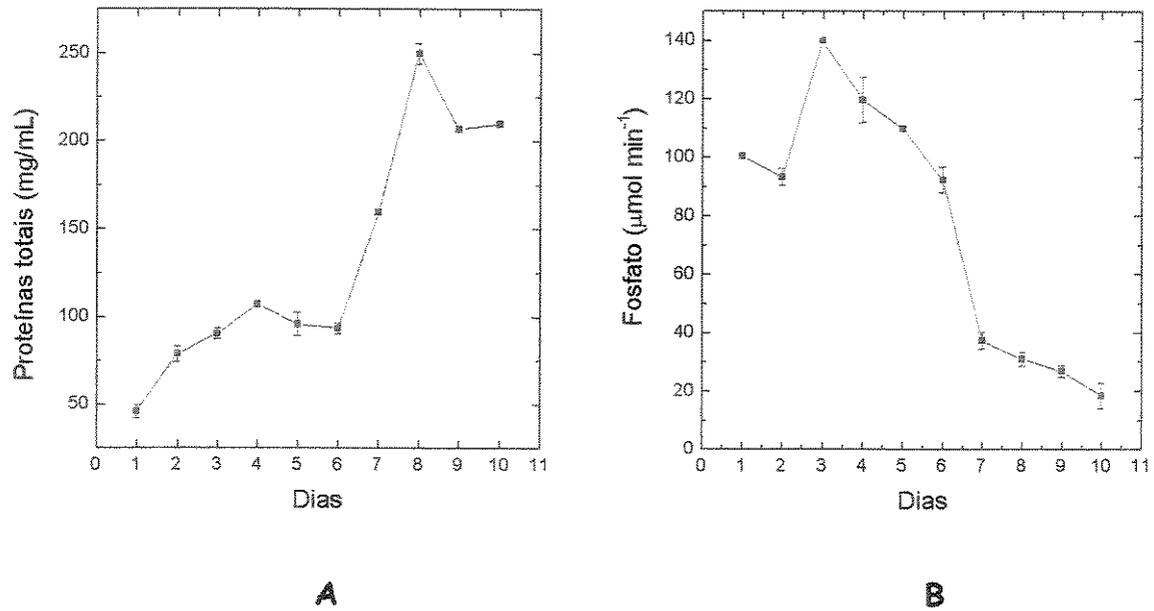


Figura 27. Dosagem de proteína total e fosfato inorgânico (Pi) durante germinação. As sementes foram germinadas como descrito em métodos 4.6. Para um conteúdo de 10 plântulas foi obtido o extrato, do qual nos vários dias de germinação foram obtidos os conteúdos de proteína totais (A) e de fosfato inorgânico (B).

5 CONCLUSÃO

As inibições por fosfato, molibdato e o-vanadato foram do tipo competitiva com valores de K_i como sendo, 0,14 mM, 10×10^{-6} mM e $1,3 \times 10^{-3}$ mM, respectivamente. Por outro lado a inibição por fluoreto foi do tipo mista, com valores de K_{ic} e K_{iu} como sendo, 0,195 mM e 0,7 mM, respectivamente.

A inibição tempo-dependente do ácido iodoacético determinou a presença de duas cisteínas no sítio ativo da enzima essenciais para a atividade catalítica. Outros aminoácidos, como ácidos aspártico e glutâmico, são importantes para a atividade da enzima, porém sem confirmação de suas presenças no sítio ativo da enzima.

O estudo de desnaturação térmica demonstrou que a FAc perdeu 80% de sua atividade quando pré-incubada a 60°C. Por outro lado, sua atividade era restabelecida até 60% a 60°C quando a mesma era pré-incubada na presença de seus produtos da reação, pNP e Pi. A ligação do fosfato no sítio ativo já era esperada uma vez que o mesmo é um inibidor competitivo da fosfatase ácida de sementes de mamona.

A especificidade do substrato pNPP pela enzima foi duas vezes menor, quando removida a porção de carboidrato. A mudança do valor de pI da FAc para mais básico, sugere que a porção de carboidrato contribui para a distribuição global das

cargas na proteína em geral. Isso pode ser evidenciado pelo aparecimento de um pH adicional quando o carboidrato foi retirado da estrutura da enzima.

A desnaturação por cloreto de guanidina foi duas vezes maior que a desnaturação por uréia. Na desnaturação por uréia, a partir da concentração de 4 M a enzima apresentou 60% de atividade enzimática. Já na desnaturação por cloreto de guanidina, na concentração de 2 M, a enzima apresentou atividade enzimática nula. Os valores de $\Delta G(H_2O)$ para ambos os agentes desnaturantes foram idênticos, no valor de

O processo de desnaturação por temperatura foi irreversível após o resfriamento, na ausência e na presença dos compostos protetores. A formação de agregado aconteceu somente quando a enzima foi pré-incubada na ausência de compostos protetores.

A atividade fosfatásica aumentou durante o período de germinação e apresentou picos de atividade enzimática nos 7^o, 5^o e 9^o dias utilizando pNPP, PEP, PPi e Tyr-P como substratos, respectivamente.

6 PERSPECTIVAS

O fato desta tese de doutorado ter sido realizada por uma gama diversificada de experimentos e técnicas, amplos são os caminhos que podem ser seguidos a partir dos experimentos aqui realizados.

O ponto principal seria um estudo detalhado da estabilidade da proteína sem a sua porção de carboidrato. Como a especificidade da enzima pelo substrato foi duas vezes menor e ocorreu mudança no valor de pI na ausência da porção de carboidrato, poderia se determinar as possíveis mudanças conformacionais da enzima na presença de compostos protetores e por ação de agentes desnaturantes, utilizando duas ferramentas importantes: o dicróismo circular, para se avaliar as mudanças na estrutura secundária da proteínas e a fluorescência, para se avaliar as mudanças na estrutura terciária da proteína. Além do mais, por a enzima se tratar de um dímero, poderia ser realizado um experimento em que a enzima seria desnaturada por agentes caotrópicos até o ponto de formação dos monômeros. A partir daí poderia se dosar a atividade enzimática dos monômeros separados e verificar se há atividade fosfatásica no nível estrutural terciário de cada cadeia polipeptídica da enzima. Com estes experimentos poderemos verificar a importância da porção de carboidrato e dos níveis estruturais na estrutura tridimensional e na atividade biológica da enzima.

Para os estudos de germinação poderiam ser realizados estudos na presença de hormônios, como ácido giberélico, auxina e ácido okadaico e verificar a atividade fosfatásica para os potenciais substratos fisiológicos. Também poderia ser realizado um acompanhamento da atividade da enzima com a germinação da planta em vermiculita com diferentes concentrações de fosfato, a fim de se verificar se há aumento ou diminuição da atividade da enzima em situações de aumento da concentração de fosfato do meio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-GARCÍA, M. M., CERBÓN, J. & TALAMÁS-ROHANA P. (2000). Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS, *Int. J. Parasitol.*, 30: 585-591.
- ARIÑO J., PÉREZ-CALLEJÓN, E., CUNILLERA, N., CAMPOS, M., POSAS, F. & FERRER, A. (1993). Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 21: 475-485.
- BASHA, S. M. (1984). Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed, *Can. J. Bot.*, 62:385-391.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. (1986). *Seeds: physiology of development and germination*.
- BEWLEY, J. D. (1997). Seed germination and dormancy, *Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- 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.
- BOIVIN, D., LIN, W. & BÉLIVEAU, R. (1997). Essential arginine residues in isoprenylcysteine protein carboxyl methyltransferase. *Biochem. Cell Biol.*, 75:63-69.
- BOROUGHES, H. (1954). Studies on the acid phosphatases of green leaves, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49:30-42.

- BONAFÉ, C. F. S., VITAL, C. M. R., TELLES, R. C. B., GONÇALVES, M. C., MATSUURA, M. S. A., PESSINE, F. B. T., FREITAS, D. R. C., & VEJA, J. (1998). Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature, *Biochemistry.*, 37: 11097-11105.
- BOSSE, D. & KOCK, M. (1998). Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings, *Plant, Cell and Environment*, 21: 325-332.
- BUDDE, R.J.A. & CHOLLET, R. (1988). Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation, *Physiol. Plant.*, 72:435-439.
- BULONE, V. LAM, B. & STONE, B. (1999). The effect of amino acid modifying reagents on the activity of a (1-3)- β -glucan synthase from Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) endosperm, *Phytochemistry*, 50: 9-15.
- BUZALAF, M. A. R.; TAGA, E. M.; GRANJEIRO, J. M.; FERREIRA, C. V.; LOURENÇÃO, V. A.; ORTEGA, M. M.; POLETTO, D. W. & AOYAMA, H. (1998). Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase, *Exp. Lung. Res.*, 24: 269-272.
- CASHIKAR, A. G. & RAO, N. M., (1996). Unfolding pathway in red kidney acid phosphatase is dependent on ligand binding, *J. Biol. Chem.*, 271, 9: 4741-4746.
- 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.
- CHEN, S. L., CHEN, Q. X., YANG, P. Z., QIU, W. J., WNAG, L. T. & ZHOU, H. M. (1997). Unfolding and inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during denaturation by guanidine hydrochloride, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 517-526.

- CHITI, F., VAN NULAND, N. A. J., TADDEI, N., MAGHERINI, F., STEFANI, M., RAMPONI, G. & DOBSON, C. M. (1998). **Conformational stability of muscle acylphosphatase: the role of temperature denaturant concentration and pH.** *Biochemistry*, 37: 1447-1455.
- CHUNG, R. P-T. & POLYA, G. M. (1992). **Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities,** *Plant Sci.*, 84: 153-162.
- COMAI, L. & HARADA, J. J. (1990). **Transcriptional activities in dry seed nuclei indicates the timing of the transition from embryogeny to germination,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2671-2674.
- COHEN, P. (1989). **The structure and regulation of protein phosphatases,** *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 453-508.
- COHEN, P. (1992). **Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates,** *Trends Biochem. Sci.*, 17: 408-413.
- CONRAD, F. & RÜDIGER, H. (1994). **The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase,** *Phytochemistry*, 30: 277-283.
- CORNISH-BOWDEN, A. (1995). **Fundamentals of Enzyme kinetics.** Portland Press, London, pp. 93-105.
- DAS, S., SAHA, A. K., REMALEY, A. T., GLEW, R. H., DOWLING, J. N., KAJIYOSHI, M. & GOTTLIEB, M. (1986). **Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphatase of *Leishmania donovani*,** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20: 143-53.
- DE-KUNDU, P. & BANERJEE, A.C. (1990). **Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *vigna radiata*,** *Phytochemistry*, 29: 2825-2828.
- DEWALD D. B., MASON H. S. & MULLET J. E. (1992). **The soybean vegetative storage proteins vsp α and vsp β are acid phosphatases active on polyphosphates,** *J. Biol. Chem.*, 267: 15958-15964.
- DISHE, R. G. (1954). **Carbohydrate analysis,** *J. Biol. Chem.* 42: 180-187.

- DIXON, M. AND WEBB, E.C. (1979). *Enzymes*, 3rd ed, LONGMANS, LONDON, PP. 332-399.
- DUA, S.; SAREEN, K. N.& AMMA, M. K. P., (1984). Germination induced changes in the hemagglutinin activity of castor bean, *Ind. J. Plant Physiol.*, 27: 374-378.
- DUA, S.; SAREEN, K. N.& AMMA, M. K. P., (1985). Effect of intact embryo and gibberellic acid on the breakdown of water-soluble proteins in germinated castor (*ricinus communis*).seed, *Ind. J. Plant Physiol.*, 28: 96-98.
- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1989). Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from brassica nigra suspension cells, *Physiol. Plant.*, 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). Purification, characterization and subcellular localization of and acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase, *Physiol. Plant.*, 90: 791-800.
- EGAN, D. A., LOGAN, T. M., LIANG, H., MATAYOSHI, E., FESIK, S. W., HOLSMAN, T. F., (1993). Equilibrium denaturation of recombinat Human FK binding protein in urea, *Biochemistry*, 32: 1920-1927.
- FERNANDEZ, D.S. & ASCENZIO, J. (1994). Acid phosphates activity in bean and cowpea plants grown under phosphorus stress, *J Plant Nutr.*, 17: 229-241.
- FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. (1998 a) Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatase, *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 487-494.

- FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M.; AOYAMA, H. (1998 b). **Soybean seed acid phosphatase: unusual optimum temperature and thermal stability studies**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242: 282-286.
- FERREIRA, C. V., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (1999). **Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms**, *Plant Science*, 147: 49-54.
- FERREIRA, C. V., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (2000). **Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*glycine max*) seeds**, *J. Enzyme Inhib*, 15: 403-410.
- FU, D. & O'NEILL, R. A. (1995). **Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography**, *Anal. Biochem.* 227: 377-384.
- 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.
- GELLATLY, K., MOORHEAD, G. B. G., DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D. D. & PLAXTON, W. C. (1994). **Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase**, *Plant. Physiol.*, 106: 223-232.
- GOLDSTEIN, A. H., BAERTLEIN, D. A., MacDANIEL, R. G. (1988). **Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* Pant.** *Physiol.*, 87: 711-715
- GRANJEIRO, J. M. (1994). **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biologia/UNICAMP.
- GRANJEIRO, P. A., FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (1997) **Purification and kinetic properties of castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups**, *Physiol. Plant.* 107: 151-158.

- GREENE, R. F. & PACE, C. N. (1974). Urea and Guanidine Hydrochloride denaturation of Ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin and β -lactoglobulin, *J. Biol Chem*, 249: 5388-5393.
- GUO, Y. L. & ROUX, S. J. (1995). Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity, *Plant Physiol.*, 107(1):167-175.
- HARTREE, E.F. (1972). Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- HAYMAN, A.R., WARBURTON, M.J., PRINGLE, 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.
- IZUMI, S.; ASHIDA, Y.; YAMAMITSU, T. & HIRATA, T. (1996). Hydrolysis of isoprenyl diphosphates with the acid phosphatase from *Cinnamomum camphora*, *Experientia*, 52: 81-84.
- JACOB, J.L. & SONTAG, N. (1974). Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex *d'Hevea brasiliensis*, *Biochimie*, 56:1315-1322.
- JIA, Z. (1997). Protein phosphatases: structures and implications, *Biochem. Cell Biol.*, 75: 17-26.
- JOAO, H. C., SCRAGG I. G. & DWEK R. A. (1992). Effects of glycosilation os protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B, *FEBS lett.*, 3: 343-346.
- JOAO, H. C. & DWEK, R. A. (1993). Effects of glycosilation on protein structure and dynamics in ribonuclease B and some of its individual glycoforms, *Eur. J. Biochem.*, 218: 239-244.
- KAWARASAKI, Y., NAKANO, H. & YAMANE, T. (1996). Purification and some properties of wheat germ acid phosphatases, *Plant. Sci.* 119: 67-77.
- KREBS, E.G. & BEAVO, J.A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 923-959.

- KUMMEROVÁ, M. & BURESOVÁ, I. (1990). The effect of exogenous phosphate deficiency on the activity of acid phosphatase of the root of two maize genotypes, *Biologia Plantarum*, 32: 1-7.
- KWON, K. & YU, M. (1997). Effect of glycosilation on the stability of α_1 -antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation, *Biochim et biophys Acta*, 1335: 265-272.
- 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.
- KUCIEL, R., BAKALOVA, A., MAZURKIEWICZ, A. B. & OSTROWSKI W. (1990). Is the subunit of prostatic phosphatase active? Reversible denaturation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry Int.*, 22: 329-334.
- LANE, B. G. (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J.*, 5: 2893-2901.
- LALONDE, L. & BEWLWY, J. D., (1986). Desiccation during germination and its effects on the messenger RNA population. *J. Exp. Bot.*, 37: 754-764.
- FRIES, L. L. M., PACOVSKY, R. S., SAFIR, G. R. & KAMINSKI J. (1998). Phosphorus effect on phosphatase activity in endomycorrhizal maize, *Physiologia Plantarum*, 103: 162-171.
- 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.
- LEVY, H. M., LEBER, P. D. & RYAN, E. M. (1963). Inactivation of myosin by 2,4-dinitrofenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds *J. Biol. Chem.* 238: 3654.

- LIN, P. P. C. & KEY, J. L. (1980). Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties and substrate specificities, *Plant Physiol.*, 66: 360-367.
- LOWRY O. H. & LOPEZ J. A. (1946). 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.
- 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.
- MULEN, R. T., KING, J. E. & GIFFORD, D. J. (1996). Changes in RNAm populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and postgerminative growth. *Physiol. Plant.*, 97: 545-553.
- 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.
- OSTROWISKI, W. S., KUCIEL, R. & YAGI, K. (1993). Fluorometric analysis of native, urea-denatured and refolded human prostatic acid phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1164: 319-326.
- PACE, C. N. & VANDERBURG, K. E., (1979). Determining globular protein stability: guanidine hydrochloride denaturation of myoglobin, *Biochemistry*, 18, 2: 288-292.

- PACE, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, 131: 267-281.
- PACE, C. N. & LAURENTS, D. V. (1989). A new method for determining the heat capacity change for protein folding, *Biochemistry*, 28: 2520-2525.
- PACE, C.N. (1990). Measuring and increasing protein stability, *Trends Biotechnol.*, 8: 93-98.
- 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 ETEN, R. L. (1986). Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase, *Phytochemistry*, 25: 351-357.
- PASQUALINI, S., PANARA, F., BRACARDI, P. & ANTONIELLI, M. (1992). High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles, *Phytochemistry*, 31: 3703-3706.
- PENHEITER, A. R., DUFF, S. M. G., & SARATH, G. (1997). Soybean root nodule acid phosphatase, *Plant Physiol.* 114: 597-604.
- PFEIFFER, W. (1996). Auxin induces exocytosis of acid phosphatase in coleoptiles from *Zea mays*, *Physiol. Plant.* 98: 773-779.
- POKALSKY, C., WICK, P., HARMS, E., LYTLE F. E., and VAN ETEN R. L. (1995). Fluorescence resolution of the intrinsic tryptophan residues of bovine protein tyrosil phosphatase, *J. Biol. Chem.* 270, 3809-3815.
- POLYA, G.M. & HARITOU, M. (1988). Purification and characterization of two wheat-embryo protein phosphatases, *Biochem. J.*, 251: 357-363.
- PRAKASH, O. & BHUSAN, G. (1998). A study of inhibition of urease from seeds of water melon (*Citrullus vulgaris*). *Enz. Inhib.*, 13: 69-77.
- RAMPONI, G. & STEFANI, M. (1997). Structural, Catalytic, and Functional Properties of Low Mr Phosphotyrosine Protein Phosphatases. Evidence of a Long Evolutionary History, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 279-292.

- 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.
- SÁNCHEZ-MARTINEZ, D., PUIGDOMENECH, P. & PAGES, M. (1986). Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Plant Physiol, 82: 543-549.
- SCHACHATMAN, D. P., REID, R. J. & AYLING S. M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell, Plant Physiol, 116: 447-453.
- SHAW, J.G. (1966). Acid phosphatase from tobacco leaves, Arch. Biochem. Biophys., 117: 1-9.
- SHIH, C. Y. & KAO, C. H. (1998). Methyl jasmonate induces acid phosphatase activity in rice leaves. J. Plant Phys. 152: 358-362.
- 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 C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis, Biochem. J., 114: 489-498.
- SMITH, R. D.; WALKER, J. C., (1996). Plant protein phosphatases, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47: 101-125.
- SOLA-PENNA, M., FERREIRA-PEREIRA, A., LEMOS, A. P. & MEYER-FERNANDES, J. R.(1997). Carbohydrate protection of enzyme structure and function

- against guanidinium chloride treatment on the nature of carbohydrate and enzyme, *Eur. J. Biochem.*, 248: 24-29.
- SRIVASTASA, P. K. & KAYASTHA, A. M. (2000). Significance of sulfhydryl groups in the activity of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds, *Plant Science*, 159: 149-158.
- STASWICK, P.E. , PAPA, C., HUANG, J. F. & 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.
- SZALEWICZ, A., GRABSKA, T., KUBICZ, A. (1997). The 102 KDa chicken liver acid phosphatase: dimeric structure, glycoprotein nature and immunological properties, *Biochem. Physiol.* 2: 293-298.
- TARAFDAR, J.C. & MARSCHNER, H. (1994). *Soil Biol.Biochem.*, 26: 387-395.
- THEDEI, G., NOZAWA, S.R., SIMÕES, A. L. and ROSSI, A. (1997). Gene *pho-2* codes for the multiple active forms of Pi-repressible alkaline phosphatase in the mould *Neurospora crassa*, *World J. of Microbiol and Biotechnol*, 13:
- THEODOROU, M. E. & PLAXTON, W. C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation, *Plant physiol.*, 101: 339-344.
- TREWAVAS, A. (1976). Post-translational modification of proteins by phosphorylation, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 27: 349-374.
- TRIMBLE, R. B. & MALEY, F. (1984). Optimizing hydrolysis of *n*-linked high-mannose oligosaccharides by endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H¹, *Anal. Biochem.* 141: 512-522.

- 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.
- 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. & GERORGATSOS J.G. (1993). Multiplicity of metal-independent protein phosphatases of germinated alfalfa seeds, *J. Plant Physiol.*, 141: 257-262.
- YON, J. M. (2001). Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 419-435.
- ZHANG, Z. Y., DAVIS, J. P., VAN ETTEN, R. L. (1992). Purification and characterization a low-molecular-weight acid phosphatase-a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart, *Biochemistry.*, 31: 1701-1711.
- ZHANG, M., ZHOU, M., VAN ETTEN, R. L. & STAUFFACHER, C. V. (1997). *Biochemistry*, 36: 15-23.

8 ANEXO 01

Trabalhos da teses submetidos e na forma de manuscrito

TRABALHOS SUBMETIDOS

P. A. GRANJEIRO, C. V. FERRIRA, J. M. GRANJEIRO, H. AOYAMA. (2000)
Effect of amino acid modifying reagents on castor bean seed (*Ricinus
communis*) acid phosphatase.

MANUSCRITOS EM ANDAMENTO

P. A. GRANJEIRO, J. M. GRANJEIRO, E. M. TAGA, H. AOYAMA. (1999)-The
effect of urea and guanidinium chloride on castor bean seeds acid phosphatase.

P.A. GRANJEIRO, A. CAVAGIS, C.V. FERRIRA, J. M. GRANJEIRO, H.
AOYAMA. (2000) The thermal stability studies of castor bean seeds acid
phosphatase.

9 ANEXO 2

Trabalhos da tese apresentados em Congressos científicos

- Apresentação do trabalho "Inhibition studies of castor bean seeds acid phosphatase", na XXVII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada no período de 23 a 26 de maio de 1998, em Caxambu-MG.
- Apresentação do trabalho "Effect of urea and guanidinium chloride on the stability of the castor bean seeds acid phosphatase", na XXVIII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada no período de 22 a 25 de maio de 1999, em Caxambu-MG.
- Apresentação do trabalho "The role of carbohydrate on the activity and structure of castor bean (*Ricinus communis*) seeds acid phosphatase" na XXIX Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada no período de 27 a 30 de maio de 2000, em Caxambu-MG.
- Apresentação do trabalho "Effect of amino acid modifying reagents on the activity of castor bean (*Ricinus communis*) seed acid phosphatase" no XVIII International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, realizado de 16 a 20 de julho de 2000, em Birmingham, Inglaterra-UK.

