

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo da presença e identificação de ureases em cloroplastos das folhas de soja (*Glycine max*)

Jozi Fernanda Rodrigues Estanislau

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação

Prof^a Dr^a Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Prof. Dr. Rogerio Margis

Co-orientação

Dr. Diogo Ribeiro Demartini

Porto Alegre, Outubro de 2015.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Russolina Benedeta Zingali
(Instituto de Bioquímica Médica “Leopoldo de Meis” – UFRJ, RJ)

Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto
(PPGBCM – UFRGS, RS)

Dra. Franceli Kulchelski
(PPGBCM – UFRGS, RS)

Suplente: Dr. Rodrigo Ligabue-Baun
(PPGBCM – UFRGS, RS)

Revisora: Dra. Anne Helene Souza Martinelli
(PPGBCM – UFRGS, RS)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX) do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação dos professores Dr^a Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini e Dr. Rogério Margis, e co-orientação do Dr. Diogo Ribeiro Demartini. Os auxílios financeiros foram do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar a beleza de ser um eterno aprendiz
Eu sei que a vida devia ser bem melhor e será
Mas isso não impede que eu repita:
É bonita, é bonita e é bonita...*

In "O que é, o que é" de Gonzaguinha

Viver a vida, sendo felizes sempre, aprendendo sempre. Só assim
construiremos uma vida melhor...

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de estar nessa vida com a possibilidade de aprender cada vez mais, e conhecer um pouquinho de Sua magnífica obra;

Agradeço especialmente aos meus pais, Juarez Antonio Pereira Estanislau e Noeli Estanislau. Vocês, que nunca mediram esforços, muitas vezes se privando de coisas para me proporcionar condições de seguir nos estudos, que me conduziram pelo “caminho do bem”, orientando e apoiando minhas escolhas. Pai e mãe, tudo que eu aprendi de mais valioso e mais importante na vida foi com vocês, os verdadeiros mestres. Obrigada por tudo!

Aos meus orientadores Célia Carlini e Rogério Margis, agradeço ao apoio e confiança durante a execução do projeto. Meu especial agradecimento à Célia, que mesmo antes de orientadora, sempre foi uma pessoa ímpar, com quem sempre pude contar pessoal e profissionalmente, e que durante o meu mestrado, confiou, acreditou e apoiou todos os meus momentos. Obrigada pela oportunidade, aprendizado e presença constante em minha vida acadêmica e profissional.

Ao meu co-orientador e amigo Diogo Demartini, que me confiou um bellissimo projeto, e me presenteou com sua amizade, que com certeza vem de outras vidas. Obrigada pela parceria, momentos de conversar sérias, ou nem tanto, paciência em TODOS os momentos, pelos puxões de orelha e inúmeros “te liga”... são ensinamentos para a vida. Muito obrigada, de coração!

Aos professores Charley Staats e Arthur Fett-Neto que, além de integrarem minha comissão de acompanhamento, me incentivaram e me deram todo apoio para que eu pudesse realizar meu trabalho acadêmico juntamente com minhas funções de servidora.

Ao professor Arnaldo Zaha, diretor do Centro de Biotecnologia, e à Karina Monteiro, coordenadora do UNIPROTE-MS, por me permitirem concluir este trabalho.

À amiga Anne Helene, que me deu o empurrão inicial para que eu me aventurasse nessa fantástica histórica e encarasse o mestrado. Muito obrigada “Biga” pelo incentivo.

À amiga Fernanda Lopes, que nunca mediu esforços para me ajudar, que me emprestou fio dental (viu Fê), que muito me ajudou com as cromatografias, e que me deu um belo presente: sua amizade.

Ao Rodrigo Braum, que sempre contribuiu com ajudas mais que especiais, muitas vezes conseguindo materiais impossíveis de se conseguir, menos para o Rodrigo, foi o revisor de minha redação científica e sempre me incentivou em tudo, além de seu sempre presente senso de humor e suas constantes brincadeiras (às vezes de mau gosto e sem graça, mas se não fosse assim não seria o Rodrigo). Valeu Rodrigo.

Ao colega Rafael Schneider, por estar sempre disponível e me ter me ajudado MUITO com as microscopias.

À Gabriela Biazzetto, à Bruna Flores e à Amanda Lange, pela parceria e ajuda nas extrações de cloroplastos – valeu gurias. Sem a ajuda de vocês nas extrações, teria tudo sido inviável.

À Prof.^a Dra. Russolina Benedeta Zingali, pela colaboração ao abrir as portas de seu laboratório para que pudéssemos realizar as análises por espectrometria de massas.

À Arlete Becker-Ritt e ao Felipe Nascimento por me ajudarem a cuidar das plantas, regá-las e remover inúmeras lagartas.

Aos colegas do CBIOT Marco Rivelino (sempre correndo quando eu precisava de algum processo), Sílvia Centeno e Luciano Saucedo, que nunca se cansaram em ouvir meus lamentos e esclarecer todas as dúvidas, mesmo que não fosse pela primeira (ou segunda, ou terceira) vez. O PPGBCM não seria o mesmo sem vocês.

Aos amigos-colegas do LAPROTOX Adrielle, Andressa, Angela M., Angela P., Anne, Arlete, Augusto, Deiber, Diogo, Fernanda L., Fernanda S., Karine, Leonardo, Marina, Melissa, Natália C., Natália M., Rafael, Rodrigo, Vander (Tinoko, o LAPROTOX não sobrevive sem você), Vanessa (minha consultora para assuntos caninos), Valquíria, e dona Eva, cada momento na presença de vocês faz com que o dia-a-dia se torne mais leve.

Às amigas de longe, mas sempre presentes em minha vida Renata Terra Lutz, Cecília Fonseca e Ana Helena Sales: gurias, a amizade e a presença constante de vocês em minha vida sempre me fortalece e recarrega minhas energias. Tê-las como amigas é um presente divino. Amo vocês, minhas irmãs de alma!

Thanks to Barbara Zambelli and Joe Polacco for sending me yours papers. Da mesma forma agradeço ao Antônio Pinto e a Nicolle Barbieri por enviarem artigos aos quais eu não tinha acesso.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Russolina Zingali, Dra. Francieli Kulchel [skiy](#) e Dr. Arthur Fett-Neto pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Ureases.....	14
1.2 Ureases em plantas.....	16
1.2.1 Ureases de feijão de porco - <i>Canavalia ensiformis</i>	16
1.2.2 Ureases de soja – <i>Glycine max</i>	17
1.3 Cloroplastos.....	19
1.3.1 Evidências da presença de ureases em cloroplastos.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Justificativa.....	27
2.3 Objetivos específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Cultivo de plantas.....	28
3.2 Extrato de sementes (ES).....	29
3.3 Extrato de folhas (EF).....	30
3.4 Extração e enriquecimento de cloroplastos.....	30
3.4.1 Preparo do meio de extração e gradiente de Percoll®.....	31
3.4.2 Extração e purificação de cloroplastos.....	31
3.4.3 Extração de cloroplastos íntegros (ECI).....	34
3.4.4 Extração de cloroplastos rompidos (ECR).....	34
3.5 Microscopia.....	35
3.6 Quantificação de proteína.....	36
3.7 Atividade ureásica.....	36
3.8 ELISA.....	37
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	38
3.10 Western blot.....	38
3.11 Cromatografia de troca iônica.....	39
3.12 Digestão trípica.....	40
3.12.1 Digestão em solução.....	40
3.12.2 Digestão em gel de poliacrilamida.....	40
3.13 Análises por espectrometria de massas.....	41
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Crescimento e obtenção de material vegetal.....	44
4.2 Extratos de sementes (ES) e folhas (EF) de soja.....	45
4.3 Purificação de cloroplastos.....	46
4.4 Integridade de cloroplastos por microscopia.....	47
4.5 Detecção de urease no extrato de cloroplastos purificados (ECI)....	48
4.5.1 Detecção por atividade ureásica.....	48
4.5.2 Detecção por ELISA.....	49
4.5.3 SDS-PAGE e Western blot.....	49
4.5.4 Cromatografia de troca iônica.....	50
4.5.5 Espectrometria de massas.....	51
5 DISCUSSÃO.....	52

6	CONCLUSÃO.....	58
7	PERPECTIVAS DE MÉDIO E LONGO PRAZO.....	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CID	Dissociação induzida por colisão
CNTX	Canatoxina
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IgG	Imunoglobulina G
JBU	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
kDa	Quilodalton(s) (1000 daltons)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mS/cm	miliSiemens por centímetro
m/v	Massa/volume
mz	razão massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaPB	Tampão fosfato de sódio
NBT	Nitro-blue tetrazolium
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAGE	Gel de poliacrilamida para eletroforese
PBS	Tampão fosfato salino
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SBU	Urease embrião-específica de soja
TBS	Tampão Tris-HCl salino
TFA	Ácido trifluoracético
TTBS	Tampão Tris-HCl salino contendo 0,05% de Tween 20
Tween 20	Polioxietilenosorbitano
v/v	Volume/volume

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reação de hidrólise de ureia, catalisada pela urease.....	14
Figura 2: Comparação de urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (JBU), ureases de soja e ureases bacterianas.....	15
Figura 3: Estrutura básica de um cloroplasto e seus principais constituintes...	20
Figura 4: Reações da fase fotoquímica e fase química no cloroplasto.....	22
Figura 5: Processo de extração de cloroplastos.....	33
Figura 6: Gradiente de Percoll®.....	47
Figura 7: Microscopias.....	48
Figura 8: Microplaca do ensaio de ELISA.....	49
Figura 9: Análise por SDS-PAGE e Western blot do ECI.....	50
Figura 10: Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q do extrato de cloroplastos íntegros.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas que co-imunoprecipitaram associadas à urease	26
Tabela 2: Denominação e descrição dos extratos obtidos.....	35
Tabela 3: Ensaios de atividade ureásica dos extratos ES e EF	46
Tabela 4: Resultados da quantificação de proteínas e da atividade enzimática em cada fração analisada.....	49

RESUMO

Ureases (ureia amido-hidrolases; EC 3.5.1.5) são metaloenzimas, dependentes de níquel, produzidas por plantas, fungos, bactérias e invertebrados, que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono. Em plantas e fungos, as ureases são hexâmetros formados por seis subunidades idênticas, e, em bactérias, são formadas por duas a três subunidades distintas. A presença de dois íons de níquel no sítio ativo das ureases é essencial para sua atividade catalítica. Em bactérias, ureases atuam como fatores de virulência em infecções do trato urinário e gastrointestinal. Em plantas, ureases são encontradas principalmente nas sementes, mas estão distribuídas em todos os tecidos. A soja produz duas isoenzimas: a urease embrião-específica, sintetizada no embrião, e a urease ubíqua, presente em todos os tecidos da planta, em menor quantidade que a embrião-específica. Em estudos prévios realizados pelo grupo foram identificadas proteínas de plastídios que co-imunoprecipitaram associadas à urease, o que despertou o interesse em estudar a presença de ureases na organela. Nesse trabalho, estabeleceu-se o protocolo para purificação e enriquecimento de cloroplastos de folhas de soja para investigar a provável presença de ureases na organela. Ensaio de atividade enzimática, ELISA e cromatografia de troca iônica foram realizados com o extrato obtido de cloroplastos após o processo de extração e purificação e indicaram a presença de ureases nestes plastídeos. Na tentativa de identificar-se as isoformas de ureases presentes no cloroplasto, realizou-se ensaios de espectrometria de massas, porém não se obteve sucesso devido a quantidade da enzima presente no extrato. O aprimoramento do processo de enriquecimento de cloroplastos possibilitará prosseguir nos estudos para identificar as isoformas presentes na organela, bem como detectar sua localização nestas organelas.

ABSTRACT

Ureases (urea amido-hydrolases; EC 3.5.1.5) are nickel dependent metalloenzymes, produced by plants, fungi, bacteria and invertebrates, that catalyze the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide. In plants and fungi, ureases are hexamers formed by two or three identical subunits, while in bacteria are formed by two to three different subunits. The catalytic activity of urease is due to the presence of two nickel ions in its active site. Bacterial ureases are known virulence factors in urinary and gastrointestinal tracts. In plants urease are mainly found in the seeds, but are widely distributed in all tissues. Soybean produces two isoenzymes: embryo-specific urease is synthesized in the embryo during development and ubiquitous urease is present in all plant tissues, in a smaller amount compared to embryo-specific. Previous studies have shown that many plastid proteins co-immunoprecipitate with urease, which sparked interest in studying the presence of ureases in the organelle. In this study, we established the protocol for purification and enrichment of soybean leaves chloroplasts in order to investigate the presence of urease in the organelle. Enzymatic activity, ELISA and ion exchange chromatography assays were conducted with the organelle and indicated the presence of ureases. In an effort to identify which ureases isoforms were present in the chloroplast, we performed mass spectrometry analysis. This effort was unsuccessful due to small amount of enzyme obtained from the extract. Improving the enrichment process will enable further studies regarding the identification of the urease isoforms as their location in the plastid.

1 INTRODUÇÃO

1.1 – Ureases

Ureases (ureia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são metaloenzimas, níquel-dependentes, amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por plantas, fungos, bactérias, algas e invertebrados. As ureases catalisam a hidrólise da ureia ((NH₂)₂CO) a amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂) (Figura 1) (KRAJEWSKA, 2009).

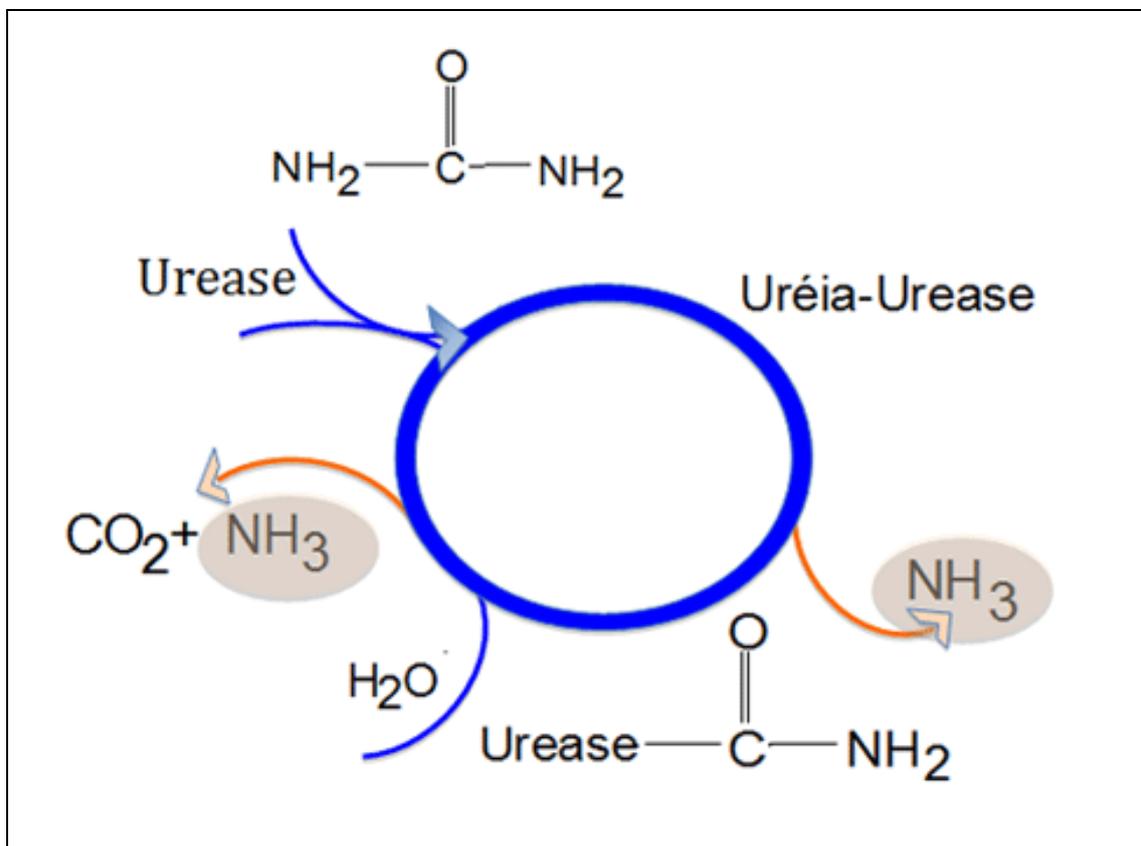


Figura 1: Reação de hidrólise de ureia, catalisada pela urease

Ureases de plantas e fungos são hexaméricas, formadas por seis subunidades idênticas. Já ureases de bactérias são formadas por duas ou três subunidades distintas (SIRKO & BRODZIK, 2000).

Cada uma das subunidades de ureases possui alto grau de identidade de suas seqüências de aminoácidos, quando comparadas à seqüência da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) (Figura 2).

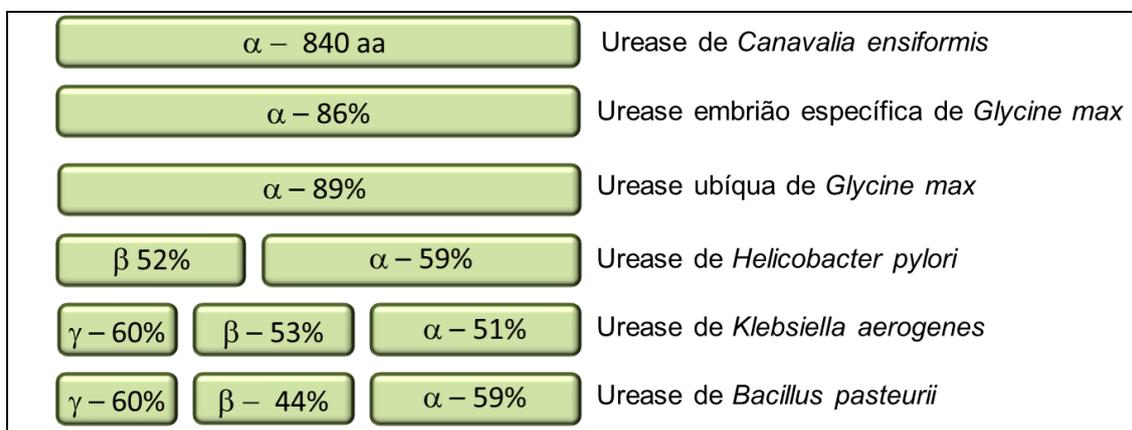


Figura 2: Comparação de urease de *Canavalia ensiformis* (JBU), ureases de soja e ureases bacterianas: comparação esquemática de uma única subunidade estrutural de urease de *Canavalia ensiformis* com urease embrião específica e urease ubíqua de soja (*Glycine max*), ambas com uma única subunidade (α), e também com ureases bacterianas de duas subunidades (*Helicobacter pylori*) e três subunidades (*Klebsiella aerogenes* e *Bacillus pasteurii*). Com referência à urease de *Canavalia ensiformis*, o percentual de identidade da seqüência das regiões de ureases bacterianas correspondentes está indicado dentro dos boxes. (Adaptado de BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

A atividade catalítica das ureases se deve à presença de dois íons de Ni^{2+} em seu sítio ativo, proporcionando o ataque nucleofílico da água, favorecendo a formação de carbamato, que é espontaneamente hidrolisado produzindo uma molécula de NH_3 e uma de CO_2 , e amônia (DIXON, 1975; MOBLEY e HAUSINGER, 1989).

Em bactérias, ureases são fatores de virulência em infecções humanas do trato gastrointestinal, como no caso de *Helicobacter pylori*, e do trato urinário, como ocorre com *Proteus mirabilis* (MOBLEY *et al.*, 1995). Ureases de fungos estão relacionadas a infecções, como ocorre com a urease de *Cryptococcus gattii*, que é fator de virulência para a criptococose (COX *et al.*,

2001; FEDER, 2012). Em plantas, as ureases são encontradas em grande abundância nas sementes, mas também distribuídas nos demais tecidos, em menor quantidade (POLACCO & HOLLAND, 1993).

1.2 Ureases em plantas

1.2.1 Ureases de feijão de porco - *Canavalia ensiformis*

A *Canavalia ensiformis* é uma leguminosa popularmente conhecida como feijão-de-porco e possui grande resistência a insetos. Sua semente possui três isoformas de urease.

A urease clássica (JBU), a primeira urease a ser cristalizada (SUMNER, 1926), é constituída por uma cadeia polipeptídica de 840 aminoácidos e tem massa molecular de 90,7 kDa, apresentando-se como um hexâmetro em sua forma nativa (ZERNER, 1991). Em seu sítio ativo possui dois átomos de níquel, sendo cada um desses coordenados por dois resíduos de histidina (DIXON *et al.*, 1975; ZAMBELLI *et al.*, 2011). Apesar de todos os esforços feitos, somente após oito décadas de estudo, sua estrutura tridimensional foi determinada (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

A canatoxina (CNTX) foi caracterizada como uma proteína tóxica para insetos e mamíferos (CARLINI & GUIMARÃES, 1981), e posteriormente identificada como isoforma de urease de *C. ensiformis* (FOLLMER *et al.*, 2001). A CNTX representa cerca de 0,5% do peso seco em sementes de *C. ensiformis*. Quando descrita, e antes de se saber que a CNTX era uma isoforma de urease, verificou-se que esta possuía atividades biológicas independentes da enzimática, como a agregação plaquetária (CARLINI *et al.*, 1985), atividade inseticida (CARLINI *et al.*, 1997) e atividade fungicida

(OLIVEIRA *et al.*, 1999). Posteriormente verificou-se que estas atividades são compartilhadas entre várias ureases já descritas (FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000; STANISÇUASKI *et al.*, 2005; BECKER-RITT *et al.*, 2007; MENEGASSI *et al.*, 2008; PIOVESAN *et al.*, 2008; DEFFERRARI, 2010)

PIRES-ALVES *et al.*, em 2003, realizaram a clonagem do cDNA parcial da terceira isoforma de urease, JBURE-II, tendo uma cadeia polipeptídica predita mais curta em relação às demais isoformas. Anos mais tarde MULINARI *et al.* (2011) realizaram a clonagem do cDNA de *C. ensiformis* que codifica uma sequência mais longa da JBURE-II, agora chamada de JBURE-IIb, capaz de codificar a terceira isoforma de urease com o mesmo tamanho esperado para as demais isoformas. A JBURE-IIb foi expressa de forma recombinante em *Escherichia coli* (MILINARI *et al.*, 2011), e sua presença foi confirmada em plantas por DEMARTINI *et al.*, 2011.

1.2.2 Ureases de soja – *Glycine max*

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa de importante valor econômico em nível mundial. No Brasil, é a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas três décadas, correspondendo a 49% da área plantada em grãos no país (<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja> - acesso em 19/08/2015). Em 2011, o Brasil movimentou cerca de 24 bilhões de dólares apenas nas exportações de soja em grão, farelo e óleo, gerando 1,5 milhão de empregos em 17 estados do País (<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=importancia-economica-e-social&area=NC0yLTI=> - acesso em 19/08/2015).

Além da sua alta importância econômica, a soja também é um importante modelo de estudo para pesquisas científicas. Sendo a oleaginosa

mais importante no mundo, o teor de óleo e proteína em seus grãos pode ultrapassar 20% e 40%, respectivamente (ROESSING & GUEDES, 1993).

A soja possui duas isoformas de ureases: a urease embrião específica, (eSBU), e a urease ubíqua (uSBU), com 87% de identidade entre si (GOLDRAIJ *et al.*, 2003). A urease embrião específica, que é codificada pelo gene Eu1 (POLACCO & WINKER, 1984), apresenta-se sob a forma de um hexâmetro, como característico das ureases de plantas. É sintetizada apenas durante o desenvolvimento do embrião, acumulando-se nas sementes maduras das plantas (POLACCO & HAVIR, 1979; POLACCO & HOLLAND, 1993). A urease ubíqua, codificada pelo gene Eu4 (TORISKY *et al.*, 1994), é encontrada em todos os tecidos da planta (POLACCO & WINKLER, 1984) em menores quantidades que variam de 1/1000 a 1/100 quando comparada à quantidade encontrada da urease embrião específica, sendo responsável pela reciclagem de ureia (STEBBINS *et al.*, 1995).

Cabe ressaltar que a atividade de urease embrião específica na semente madura é cerca de 1000 vezes maior que a atividade da urease ubíqua nos vários tecidos da planta (POLACCO & SPARKS, 1982; POLACCO & WINKLER, 1984).

1.3 Cloroplastos

A origem dos plastídios, de acordo com a hipótese endossimbiótica, deu-se há bilhões de anos pela integração de cianobactérias fotoclófitas com uma célula eucariótica primitiva através de fagocitose, dando origem à célula vegetal como conhecemos hoje (BOCK & KHAN, 2004). Ao longo da evolução, muitos dos genes do genoma plastidial foram transferidos para o núcleo da célula, ou degradados e substituídos devido à existência de genes com as mesmas

funções no núcleo. Mesmo com essas perdas, o cloroplasto é uma organela que possui um genoma rico, sintetizando diversas proteínas importantes, especialmente aquelas relacionadas à fotossíntese (BOCK & KHAN, 2004).

Os cloroplastos são a mais relevante forma de plastídios, ocorrendo em quase todos os tecidos de plantas verdes. Por conter todo o aparato fotossintético, os cloroplastos são a classe de plastídios mais estudada. Funções relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo também são desempenhadas pela organela (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Como todos os plastídios, os cloroplastos são delimitados por uma membrana dupla (envelope) que controla a importação e exportação de componentes do cloroplasto (JOYARD *et al.*, 1998). Além da membrana dupla, existe uma terceira membrana interna, denominada membrana tilacóide. Esta forma uma rede de discos achatados denominados tilacóides, que apresentam-se organizados em pilhas – grana.

O estroma é o local onde ocorre a biossíntese de ácidos graxos em plantas. Os ácidos graxos são sintetizados na forma de glicerolipídeos e são exportados para o retículo endoplasmático. Esse tráfego de lipídios é essencial para a biogênese do cloroplasto (BENNING, 2008).

A membrana externa do cloroplasto é permeável a algumas moléculas pequenas graças à presença de proteínas da classe das porinas. No caso da membrana interna, esta é impermeável a íons e metabólitos, os quais necessitam de transportadores de membranas específicos para ingressarem no interior do cloroplasto. É a membrana interna que restringe a passagem de moléculas entre o citosol e o interior da organela (COOPER, 2000).

Em um trabalho recente, transportadores de níquel foram localizados no envelope do cloroplasto, mas sua função ainda não foi determinada (THEG & WOLLMAN, 2014). O níquel é um micronutriente essencial de pelo menos 9 enzimas, entre elas a urease (MULROONEY & HAUSINGER, 2003). Deficiência de níquel pode ocasionar acumulação de concentrações tóxicas de ureia em várias espécies de plantas, o que pode inibir a germinação de sementes de cereais (BROWN *et al.*, 1987).

A fotossíntese divide-se em duas fases: a fase clara e a fase escura. O processo em si culmina com a geração de produtos como o NADPH e ATP, além de açúcar de baixo peso molecular, necessário para suprir as necessidades metabólicas de muitas células onde não ocorre a fotossíntese (ALBERTS, 2002).

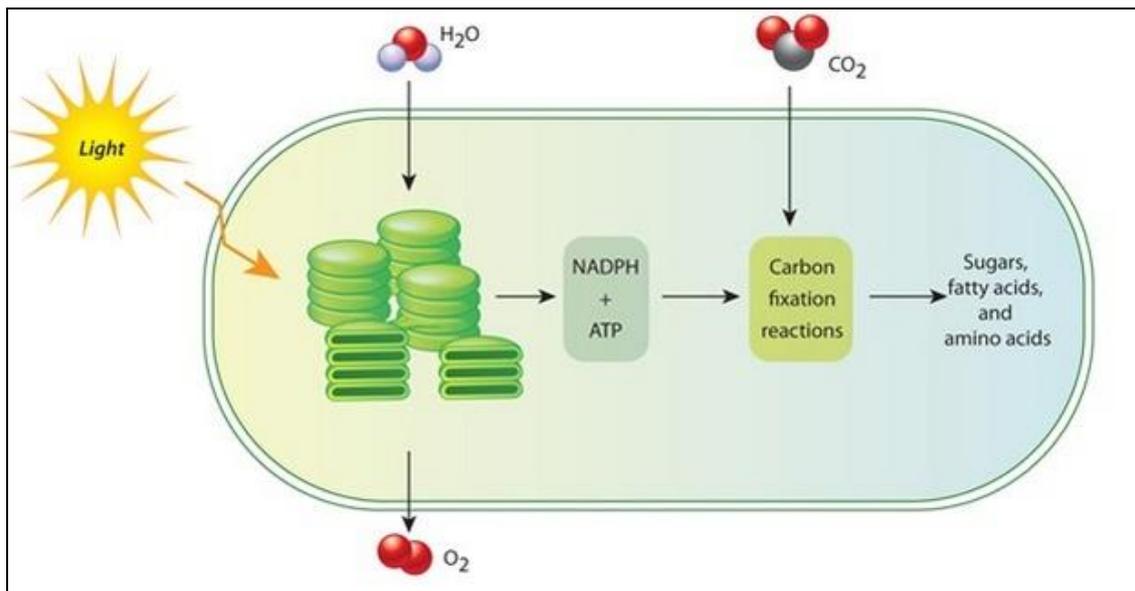


Figura 3: Reações da fase clara (fotoquímica) e fase escura (fase química) no cloroplasto: o cloroplasto está envolvido em ambas as fases da fotossíntese. As reações claras ocorrem no tilacóide. Na fase clara, a água é oxidada e oxigênio é liberado. Os elétrons liberados são transferidos para ATP e NADPH. As reações da fase escura ocorrem fora do tilacóide. Nesta fase, a energia liberada de ATP e NADPH é convertida para fixação de dióxido de carbono. Os produtos desta reação são açúcares e várias outras moléculas orgânicas necessárias para o metabolismo celular (Retirada de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/photosynthetic-cells-14025371>).

O nitrogênio é um dos principais nutrientes para os vegetais, estando diretamente envolvido no metabolismo da planta. Uma das fontes de nitrogênio nas plantas é a ureia, porém, em excesso, o acúmulo de ureia nas folhas pode causar necrose. Esse excesso pode ser ocasionado pela deficiência de níquel nas plantas. A urease é a única enzima que necessita de níquel como cofator enzimático em plantas superiores, e a aplicação de níquel aumenta a atividade de urease (FAQUIN, 2005; LIU *et al*, 2014).

A assimilação de nitrogênio é um processo biológico essencial para o crescimento e produtividade de plantas. A assimilação de nitrato é outro importante processo biológico em organismos fotossintéticos, com grande

efeito sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (KIMATA-ARIGA & HASE, 2014).

Além de nitrato, as plantas utilizam amônia como fonte de nitrogênio. Amônia também é produzida através de reações metabólicas internas, como hidrólise de moléculas de transporte e armazenamento de nitrogênio, e conversão de aminoácidos (IRELAND & LEA, 1999). A principal rota para essa conversão envolve as ações sequenciais da glutamina sintetase e da glutamato sintase. A glutamina sintetase catalisa a incorporação do íon NH_4^+ ao glutamato para formar a glutamina, gastando energia com a conversão de ATP em ADP. A elevada quantidade de glutamina nos plastídios estimula a atividade da glutamato sintase durante o processo de fotorrespiração (TAIZ & ZEIGER, 2012).

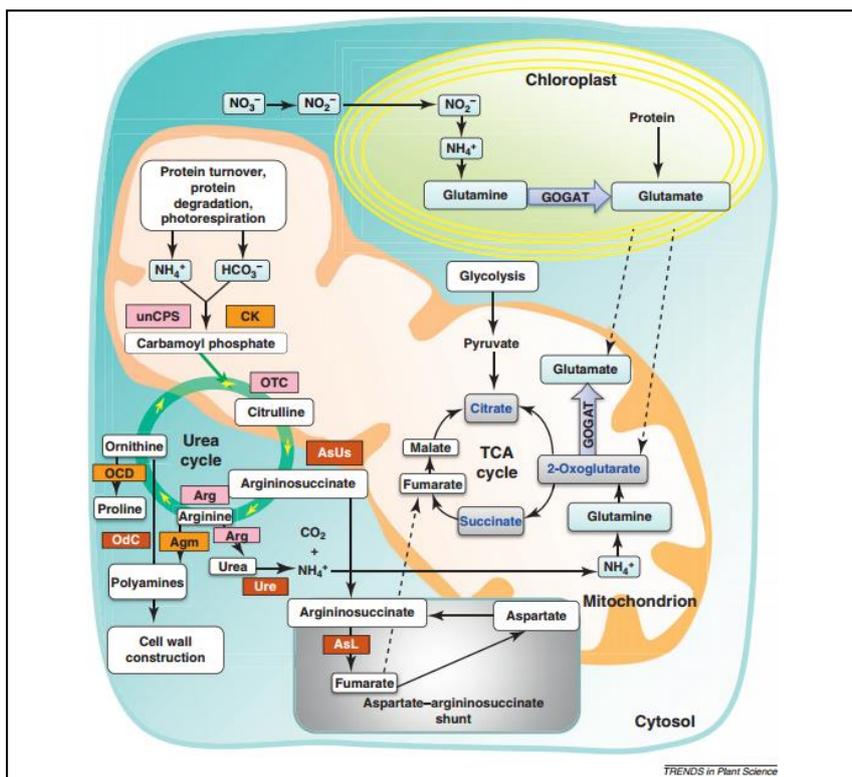


Figura 4: Assimilação de nitrogênio no cloroplasto: nitrato (NO_3^-) disponível no solo é absorvido e convertido a nitrito (NO_2^-) no citoplasma pela nitrato redutase; o NO_2^- é transferido para o interior do cloroplasto por transportadores específicos, sendo reduzido a amônio (NH_4^+), que é assimilado no ciclo da glutamina-glutamato (FERNIE *et al.*, 2012)

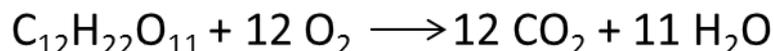
Em um estudo onde foram avaliados glutamina, asparagina e alantoína como fontes de nitrogênio, verificou-se um efetivo acúmulo de proteínas nos cotilédones de soja quando comparadas ao tratamento sem nitrogênio (JUNGHANS & MOSQUIM, 1995), corroborando dados encontrados por WINKLER *et al.*, (1985), onde foram detectadas atividades máximas de enzimas correlacionadas com o metabolismo de ureídeos – alantoinase e urease, antes da fase de preenchimento das sementes.

Como o cloroplasto é uma organela em que ocorre um intenso metabolismo de nitrogênio, uma enzima como a urease pode ser importante se

ali localizada. A geração de amônio através da hidrólise da ureia (se presente na organela) pode ser uma fonte alternativa deste íon.

O amido, que é um polissacarídeo, é um dos principais carboidratos de reserva nas plantas, extremamente abundante, sendo superado em quantidade apenas pela celulose. O amido do cloroplasto é sintetizado durante o dia e degradado durante a noite (TAIZ & ZEIGER, 2010). Em ausência de luz, a produção de amido no cloroplasto é reduzida, e o amido produzido anteriormente e armazenado no cloroplasto é degradado, servindo como fonte principal para síntese de sacarose citosólica (SHANNON & GARWOOD, 1984; VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004).

Também é no cloroplasto, além do citosol, onde estão localizadas as enzimas que catalisam as reações de glicólise. A reação de glicólise em vegetais pode ser expressa como a oxidação da sacarose e redução de O₂:



As principais funções da glicólise em cloroplastos na fase escura e em plastídios não fotossintetizantes são: 1) participar da degradação de amido; e 2) gerar energia na forma de ATP para vias anabólicas, como síntese de ácidos graxos (EMES & TOBIN, 1993). Em plantas, a glicólise tem como característica uma regulação singular, assim como uma rota glicolítica parcial paralela em plastídios e rotas enzimáticas alternativas para várias etapas citosólicas (TAIZ & ZEIGER, 2010).

1.3.1 Evidências da presença de ureases em cloroplastos.

Com novas tecnologias que surgem a cada dia em combinação com crescentes informações de sequências dos genomas de plantas, tem-se buscado identificar e quantificar o conjunto total de proteínas de cloroplastos e de seus constituintes em separado, através de análises por espectrometria de massas (WIJK, 2000; HELM *et al.*, 2014).

A combinação de técnicas de extração de organelas, enriquecimento de proteínas com diferentes características físico-químicas e o avanço da tecnologia referente à espectrometria de massas têm proporcionado um grande avanço nas identificações. Entretanto, muitas vezes, proteínas chave de um processo já conhecido e caracterizado podem não ser identificadas (JOYARD *et al.*, 2010). Nesse estudo, possivelmente pela baixa quantidade destas proteínas, importantes enzimas relacionadas à fotossíntese e à síntese de lipídeos não foram identificadas, ainda que no trabalho tenham sido identificadas 171 proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, exportação e metabolismo de glicerolipídeos específicos de cloroplastos.

Em 2010, num estudo proteômico realizado com *Canavalia ensiformis*, foram analisadas sementes quiescentes e germinadas. Um dos objetivos dos autores foi o de identificar proteínas que interagem com a urease clássica (JBU). Para isso, foi realizado um ensaio de co-imunoprecipitação utilizando-se um anticorpo monoclonal contra a urease de *Canavalia ensiformis*, seguido de análise proteômica. Naquele estudo, foram identificadas várias proteínas plastidiais que co-imunoprecipitaram associadas à urease (Tabela 1). (DEMARTINI *et al.*, 2011).

Tabela 1: Proteínas plastidiais que co-imunoprecipitaram associadas à urease

(Adaptada de DEMARTINI *et al.*, 2011). A tabela mostra o número de espectros adquiridos para cada proteína (conjunto de íons detectados na etapa de aquisição), e o número de peptídeos únicos (fragmento resultante da clivagem da proteína).

Proteína	Espectros adquiridos	Peptídeos únicos
ATP synthase CF1 α subunit	15	7
ATP synthase CF1 β subunit (<i>A. t</i>)	12	5
ATP synthase CF1 β subunit (<i>Z. m</i>)	11	7
Elongation factor TU, chloroplast precursor	5	4
Fructose-bisphosphate aldolase	4	3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase α subunit	12	8
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase β subunit	8	6
Oxygen-evolving enhancer 33	11	8
Oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplast putative	7	6
Phosphoglycerate kinase 1	9	6
Photosystem II 44 kDa protein	8	5
Photosystem II 47 kDa protein	12	4
Ribulose biphosphate carboxylases small chain	19	6
Ribulose biphosphate carboxylases small chain 1A	11	6
RuBisCO activase	16	8
RuBisCO large subunit (<i>A. t</i>)	35	8
RuBisCO large subunit (<i>O. s</i>)	33	8
Transketolase-like protein	11	8

Como no estudo de DEMARTINI *et al.* (2011) o principal objetivo foi avaliar a mobilização de ureases nas primeiras etapas de desenvolvimento de sementes de *C. ensiformis*, não foi realizado nenhum tratamento específico para a extração e purificação de plastídios durante o preparo da amostra. Conforme relatos da literatura, a urease de *C. ensiformis* estaria localizada em diferentes compartimentos sub-celulares: no citoplasma da célula, em grânulos de armazenamento, e dentro dos espaços intercelulares esquizógenos (MURRAY & KNOX, 1977).

Para comprovar os resultados encontrados por DEMARTINI *et al.* (2011), sugestivo de uma localização plastidial de ureases, tornou-se necessária a realização de um estudo específico, em que fosse feita a extração de cloroplastos, com o objetivo de avaliar a presença de urease na organela.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Identificar as ureases de soja presentes nos cloroplastos das folhas da planta.

2.2 Justificativa

Os resultados obtidos por DEMARTINI *et al.* (2011) despertaram o interesse do nosso grupo em investigar a presença de ureases em compartimentos sub-celulares, mais especificamente nos cloroplastos. A partir disto, decidimos adequar um protocolo de extração de organelas, com o objetivo de obter a organela isolada e prosseguir com estudos que possibilitassem comprovar a presença de ureases em cloroplastos.

2.3 Objetivos específicos:

- Implementar a metodologia de isolamento e purificação de cloroplastos;
- Determinar se a urease está ou não presente na organela purificada, por ensaios de atividade enzimática e ELISA;
- Caso a atividade seja detectada, identificar por espectrometria de massas qual é a isoforma de urease presente na organela purificada.

3 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas sementes de Soja – cultivar Conquista®. Também foram utilizadas sementes comerciais para as otimizações descritas na sequência.

Todos os procedimentos de extração, diálise e centrifugação foram realizados a 4 °C, exceto quando especificado diferentemente.

3.1 Cultivo de Plantas

As sementes foram plantadas em potes plásticos, contendo Substrato Carolina II® + Vermiculita, na proporção 1:1. As plantas foram cultivadas inicialmente em casa de vegetação localizada junto ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e posteriormente em local aberto, com incidência de luz solar direta, sendo este local aberto sem controle térmico ou luminoso, sendo regadas com água 2 vezes por semana. Foram acondicionadas de três a quatro sementes por pote, de 30 cm de diâmetro e 40 cm de altura

O cultivo em casa de vegetação ocorreu de novembro a abril. Neste tempo, foi possível respeitar um mínimo de luz de 12 horas com luz natural. A casa de vegetação também dispõe de um sistema de iluminação artificial de 12 h de luz, o ano todo. A temperatura média de cultivo foi de aproximadamente 30 °C, oscilando entre 20 °C e 40 °C. Por problemas de infestação de lagartas na casa de vegetação, no mês de março de 2015, estando as plantas no estágio vegetativo V3, em que as plantas apresentavam o terceiro nó e segundo trifólio totalmente desenvolvido estas foram removidas para local aberto, permanecendo sob condições ambientes por cerca de 40 dias, até

atingirem o estágio vegetativo V6, último estágio vegetativo antes da planta entrar em formação das flores (R1), em que as plantas apresentavam o sexto e quinto trifólio totalmente desenvolvido. Neste período, a temperatura no local onde as plantas permaneceram oscilou entre 8° C e 35 °C (fonte: <http://www.accuweather.com/pt/br/gravatai/40981>).

Os extratos utilizados nos ensaios foram obtidos de maneira diferente para cada tecido da planta, conforme descrito a seguir.

3.2 Extrato de sementes (ES) – Extração de proteínas totais de sementes

O objetivo deste extrato foi de otimizar as condições de ensaios de atividade e quantificação para os experimentos com folhas e com os extratos de cloroplastos purificados. O extrato ES foi obtido a partir de grãos de soja comercial, adquiridos em supermercado local, da marca Yoki[®]. Os grãos foram reduzidos à farinha em moinho de facas analítico. O pó obtido foi delipidado pela adição de 150 mL de clorofórmio (25 %), levando-se a suspensão ao liquidificador por 4 minutos a 4 °C. A mistura foi coada através de 5 camadas de gaze de algodão, lavada com acetona, e novamente processada no liquidificador com acetona. O sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” obtido foi mantido em capela de exaustão a temperatura ambiente até completa volatilização da acetona, o que demorou aproximadamente uma noite.

A farinha delipidada foi utilizada para a extração de proteínas, com tampão fosfato de sódio 20 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM e azida sódica 0,02%, pH 7,5. Uma massa de 20 g de farinha foi extraída em 100 mL do tampão. A suspensão foi submetida à suave agitação por 2 h, a temperatura de 4 °C. Terminado o período, a mistura foi centrifugada a 23.400 x g, a 4 °C, por 15 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi coletado e

quantificado conforme descrito no item 3.8, e utilizado para ensaio de atividade enzimática (adaptado de DEMARTINI *et al.*, 2011). A este material foi dado o nome de Extrato de Sementes de Soja (ES), sendo assim designado deste ponto em diante.

3.3 Extrato de folhas (EF) - Extração de proteínas totais de folhas

O objetivo da produção deste extrato em particular foi servir para comparação com o extrato EF enriquecido de cloroplastos, que será descrito adiante.

A produção do EF foi realizada utilizando folhas de plantas de soja no estágio vegetativo V6, cultivadas conforme descrito no item 3.1. As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido e submetidas à extração com tampão de extração (-fosfato de sódio 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e azida sódica 0,02%, pH 7,5). Foram utilizados 50 g do pó de folhas de soja, e 200 mL de tampão de extração. A suspensão foi submetida também à suave agitação por 2 h, a 4 °C. Terminado este período, o homogenato foi centrifugado a 16.200 x g, a 4 °C, por 1 h . O sobrenadante foi recolhido e dialisado em membrana com corte de 12-14 kDa contra fosfato de sódio 20 mM e 0,02% de azida sódica, pH 7,5. Foram realizadas 2 trocas de tampão novo a cada 2 h, 1 troca após 16 h e mais 2 trocas a cada 2 h, de 1 L cada troca. Ao final, o extrato dialisado foi centrifugado a 23.400 x g por 15 min (adaptado de DEMARTINI *et al.*, 2011). A quantificação de proteínas e a dosagem da atividade ureásica foram feitas conforme os itens 3.6 e 3.7 a seguir, respectivamente.

A este material foi dado o nome de Extrato de Folhas de Soja (EF), sendo assim designado deste ponto em diante.

3.4 Extração e enriquecimento de cloroplastos

A extração de cloroplastos foi realizada a partir da adaptação de um protocolo já existente para folhas de espinafre, descrito por SEIGNEURIN-BERNY *et al*, 2008. A purificação dos cloroplastos foi feita também a partir de folhas do estágio vegetativo V6.

3.4.1 Preparo do meio de extração e gradiente de Percoll®

No dia anterior ao experimento, foram preparados seis frascos de centrífuga para rotores tipo SS-34. Cada frasco continha 30 mL de solução para o gradiente de Percoll®, composta de: sorbitol 0,4 M; tampão tricina 20 mM; MgCl₂ 2,5 mM; EDTA 1,25 mM, pH 8,0 e acrescido de 50 % de Percoll®.

O procedimento experimental aplicado a esta solução é extremamente importante para a obtenção dos cloroplastos. Os tubos, preparados conforme descrito anteriormente, foram centrifugados a 30.000 x g por 60 min, em rotor SS-34, formando assim o gradiente de Percoll®, e que foi usado na primeira etapa de centrifugação para extração dos cloroplastos (item 3.4.2).

3.4.2 Extração e purificação de cloroplastos

As plantas cultivadas até o estágio vegetativo V6 foram acondicionadas em câmara fria, a 4°C no dia anterior ao experimento e mantidas lá por 16 horas, na ausência de luz, até o início da extração (Figura 5a). Inicialmente as folhas foram removidas das plantas e acondicionadas em um Becker mantido em banho de gelo até o momento da primeira trituração (Figura 5b).

As folhas foram acondicionadas em um copo de liquidificador e "gentilmente" trituradas utilizando solução de moagem a 4 °C, contendo: sorbitol 0,4 M; tricina 20 mM; EDTA 10 mM; NaHCO₃ 10 mM; BSA 0,1% m/v,

pH 8,4. Foram feitos 5 pulsos de 3 segundos cada (Figura 5c). Na sequência, o extrato inicial foi filtrado em funil contendo 5 camadas de gaze de algodão (Figura 5d), para um becker mantido em gelo. Este extrato foi então transferido para tubos de centrífuga e a centrifugação foi feita a 2.070 x *g* em rotor GSA, a 4 °C por 20 minutos, (Figura 5f). Ao término da centrifugação, o rotor foi desacelerado com o uso de freio da centrífuga.

Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os “*pellets*” remanescentes, contendo a fração de cloroplastos, foram ressuspensos com auxílio de uma pipeta Pasteur em um pequeno volume de meio de lavagem (em torno de 5 mL), que continha: sorbitol 0,4 M; tricina 20 mM; MgCl₂ 2,5 mM; EDTA 1,25 mM, pH 8,0. O material foi transferido cuidadosamente para os frascos contendo o gradiente pré-formado de Percoll[®], descrito no item 3.4.1 (Figura 5h). Muito cuidado foi tomado neste momento para que o material fosse depositado sobre a camada superior do gradiente, sem desestabilizar o sistema. O conjunto foi centrifugado em Centrífuga Sorvall[®], com rotor HS-4, de ângulo móvel, a 10.000 x *g*, a 4 °C por 30 minutos (Figura 5i), utilizando um adaptador de tubos SS-34. A desaceleração ocorreu sem utilização do sistema de freio.

Foram selecionadas duas frações após esta centrifugação: uma contendo os cloroplastos íntegros, e outra, que continha uma fração de cloroplastos rompidos.

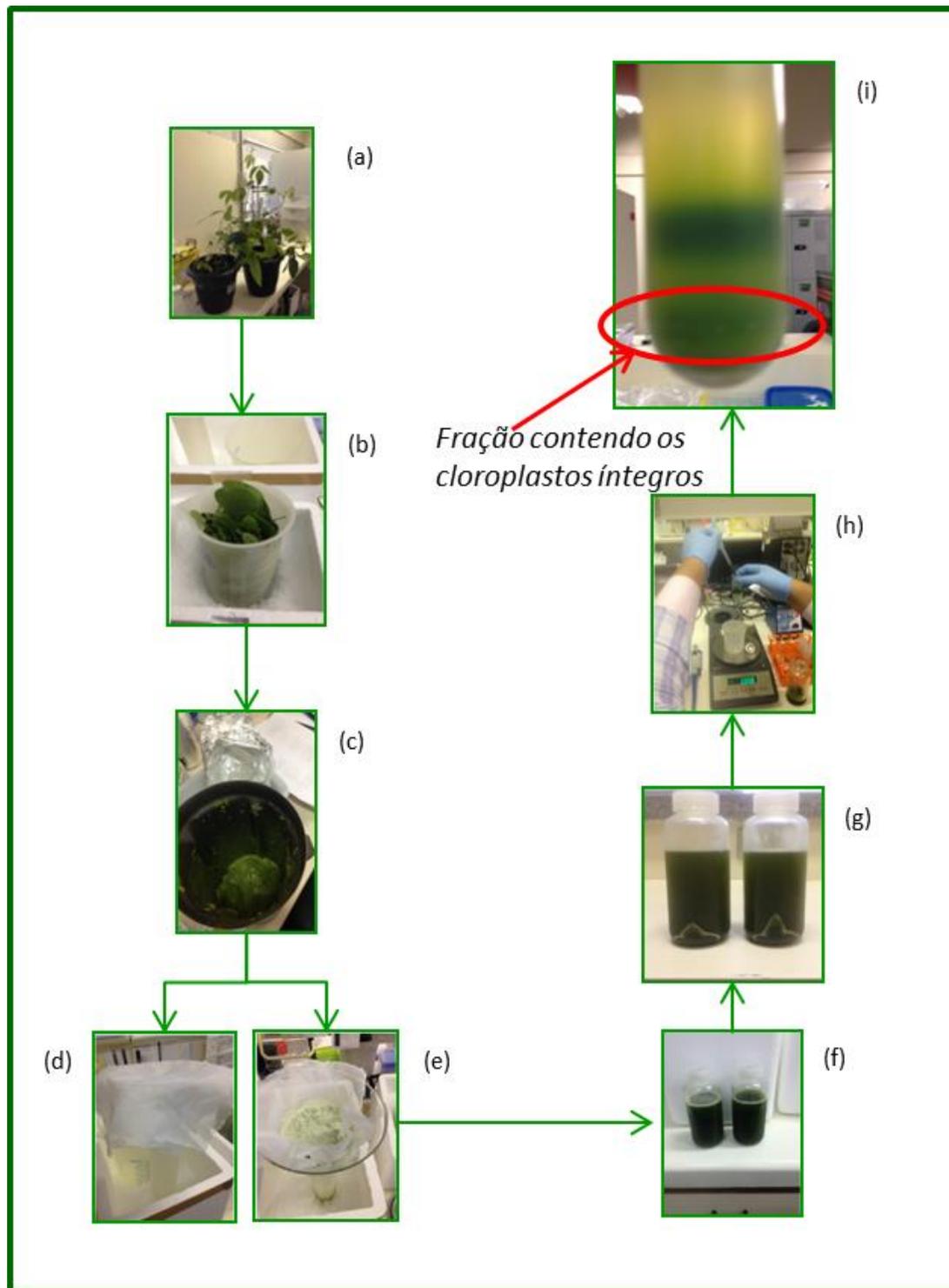


Figura 5: Processo de extração de cloroplastos: (a) plantas no estágio vegetativo V6; (b) remoção das folhas das plantas; (c) moagem das folhas com meio iso-osmótico; (d) e (e) filtração do homogenato; (f) e (g) centrifugação do homogenato para separação das organelas; (h) preparo para a centrifugação com gradiente de Percoll®; (i) separação das fases contendo as frações de cloroplastos íntegros – inferior – e rompidos – superior.

3.4.3 Extrato de cloroplastos íntegros (ECI)

A primeira fração continha os cloroplastos íntegros e seu preparo está descrito a seguir.

Imediatamente após a recuperação da fração na centrifugação com o gradiente de Percoll[®], a mesma foi lavada 4 vezes com o tampão de lavagem. O sobrenadante da última lavagem, denominado LI4, foi recuperado para fins de comparação. O pellet obtido na última lavagem foi submetido à lise manual, com o uso de um Potter-Elvehjem (número 6). O objetivo nesta etapa foi de romper a membrana da organela, deixando seu conteúdo em suspensão.

Após o rompimento, o material foi centrifugado 4 vezes, por 5 min cada, a $1.700 \times g$ a $4^{\circ}C$ (Centrífuga Eppendorf[®] modelo 5810R – rotor A-4-62). Finalmente o sobrenadante foi dialisado contra fosfato de sódio 20 mM pH 7,5. Foram realizadas 2 trocas de tampão a cada 2 h, 1 troca após 16 h e mais 2 trocas a cada 2 h, de 1 L cada troca, e foi usada membrana de corte de 12-14 kDa.

Esta fração foi denominada extrato de cloroplastos íntegros (ECI).

3.4.4 Extrato de Cloroplastos Rompidos (ECR)

O mesmo tratamento descrito no item 3.4.3 foi feito com a fração ECR. Este material foi recuperado com o objetivo de comparar a quantidade de urease que pudesse ter sido perdida na fração de cloroplasto rompida. O sobrenadante da última lavagem, denominado LR4, foi recuperado para fins de comparação.

Os extratos e frações analisados ao longo do trabalho estão compilados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Denominação e descrição dos extratos obtidos.

Extrato	Descrição
ES	Extrato de sementes (3.2).
EF	Extrato de folhas (sem fins de purificação de cloroplastos; 3.3).
ECI	Extrato final após lavagens, lise, e diálise, oriundo da fração de cloroplastos purificados e íntegros (3.4.3).
ECR	Extrato final após diálise e centrifugações, oriundo da fração de cloroplastos rompidos (3.4.4).
LI4	Sobrenadante da última lavagem final, devidamente dialisada. Este material contém o tampão da última lavagem feita com o pellet de cloroplastos íntegros, antes da lise (3.4.3).
LR4	Sobrenadante da última lavagem final, devidamente dialisada. Este material contém o tampão da última lavagem feita com o pellet de cloroplastos rompidos (3.4.4).

3.5 Microscopias

As análises por microscopia foram realizadas em microscópio de fluorescência Axioskop 40[®]. A microscopia foi realizada durante todo o processo, sendo que cada um dos extratos obtidos nas diferentes fases da extração, contendo os cloroplastos rompidos e os cloroplastos íntegros, foram aplicados diretamente em uma placa de microscopia e cobertos com uma lamínula. Imediatamente, as placas contendo as frações de cloroplastos íntegros e rompidos foram observados no microscópio, com magnificação de 125 X, com auxílio de óleo de imersão. Ao final de todo o procedimento, antes da homogeneização com Potter, atestou-se a integridade da organela,

comparando-se os materiais que originaram os extratos ECI e ECR. Foram obtidas imagens nos campos com e sem fluorescência.

3.6 Quantificação de proteína

A quantidade total de proteínas de cada fração foi determinada em espectrofotômetro, utilizando-se o kit comercial Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate[®], de acordo com as instruções do fabricante. Foi construída uma curva padrão, utilizando BSA nas concentrações 0,01 µg/µL, 0,05 µg/µL, 0,10 µg/µL, 0,20 µg/µL e 0,50 µg/µL.

A determinação foi feita com o protocolo para microplaca, onde foram utilizados 10 µL de material a ser quantificados, acrescidos de 200 µL de reagente diluído. As leituras foram feitas em triplicatas a 595 nm, após 10 min de desenvolvimento de cor.

3.7 Atividade ureásica

A atividade enzimática foi determinada em diferentes condições. Foram realizados ensaios enzimáticos com os extratos ES, EF, ECI, ECR, LI4 e LR4.

Os ensaios foram realizados de acordo com o método colorimétrico de fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). Todos os ensaios foram realizados a 37 °C. Os ensaios com os extratos I e II foram realizados em um volume de reação de 500 µL, tamponados com 20 mM de NaPB pH 7,5.

Para otimização dos ensaios de atividade de atividade enzimática, foi utilizado o ES. Duas quantidades de extrato, contendo 205,5 µg e 616,5 µg de proteínas foram ensaiadas em três quantidades de ureia distintas, 12,5 mM, 18,0 mM e 25,0 mM, e por quatro intervalos de tempo diferentes, 30 min, 2,0 h, 6,0 h e 24,0 h.

Os ensaios feitos com o EF foram realizados com tempos de reação de 15 min, 1 h, 2 h e 24 h, com 100 mM de ureia.

Para os extratos ECI, ECR, LI4 e LR4, o ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, com volume final de reação de 100 μ L, tamponados com 20 mM de NaPB pH 7,5. Os tempos de reação foram de 0,5 h, 2,0 h, 6,0 h e 24,0 h, com concentrações finais de ureia foram 12,5 mM, 18,0 mM e 25,0 mM.

3.8 ELISA

Para este ensaio, foi utilizado o extrato obtido após lise mecânica e diálise da fração de cloroplastos intactos (ECI).

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 μ L de amostra/poço do extrato diluído em tampão TBS (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 7,5) em uma concentração de 100 μ g/mL. A placa permaneceu por 2 horas a temperatura ambiente, e após a 4°C por 16 h. Após o período de sensibilização, as placas foram submetidas a três lavagens com TTBS (tampão TBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas por 2 h com solução contendo 0,5% de caseína em TTBS, à temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS, as amostras foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-urease (Rockland®; Anti-UREASE (Jack Bean) antibody), na diluição de 1:5.000 com solução de caseína 0,5% em TBS por 2 h a temperatura ambiente, seguida de mais 16 h a 4 °C. Novamente as amostras foram submetidas a três lavagens com TTBS, e expostas ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Zimax™; Goat Anti-Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase Conjugate), conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:10.000 com solução de caseína 0,5% em TBS, durante 1 h e à temperatura

ambiente. As amostras foram lavadas três vezes com TBS e tratadas com 50 μL /poço da solução de revelação contendo 1 mM de *p*-nitrofenilfostato, 10 mM de borato de sódio e 0,25 mM de cloreto de magnésio, pH 9,8. A leitura de reação de cor foi feita em leitor de microplacas Spectramax M³ e por 30 min, a 37 °C através da medida da absorbância a 405 nm (adaptado de VOLLER *et al.*, 1978). A curva padrão de urease cobriu as seguintes concentrações: 0,10 $\mu\text{g/mL}$, 0,20 $\mu\text{g/mL}$, 1,00 $\mu\text{g/mL}$, 2,00 $\mu\text{g/mL}$, 10,00 $\mu\text{g/mL}$ e 20,00 $\mu\text{g/mL}$, e foi feita com a urease de *Canavalia ensiformis*.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional a 10 % foram feitas na presença de SDS, de acordo com Laemmi, 1970. Foi utilizado o sistema PowerPac HC – Bio Rad. As amostras analisadas foram preparadas em tampão redutor e desnaturante (12 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02% (m/v) SDS, 1% (V/V) glicerol, 20 mM β -mercaptoetanol e 0,004% (m/v) azul de bromofenol) e foram submetidas à 100 °C por 5 minutos. O gel foi corado com Coomassie blue coloidal.

3.10 Western blot

Depois de separadas por SDS-PAGE, as amostras foram transferidas por gravidade em um tampão de transferência (12 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02% (m/v) SDS, 1% (V/V) glicerol, 20 mM β -mercaptoetanol + 20 % de metanol) para uma membrana de PVDF (0,45 μm). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de caseína em tampão TTBS (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 7,5) contendo 0,05% de Tween 20, por 2 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TTBS

e incubada com anticorpo primário policlonal anti-urease na diluição de 1:5.000. A membrana ficou em contato com o anticorpo primário por 2 h a temperatura ambiente, seguida por 16 h a 4°C. Na sequência, a membrana foi novamente lavada com tampão TTBS, 3 vezes e incubada com anticorpo secundário em diluição 1:10.000 durante 2 horas. Três últimas lavagens foram feitas com tampão TBS, e a revelação foi feita com BCIP/NBT tablete (Sigmafast™ BCIP®/NBT; tablet BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate; PCode 1001382185), utilizando-se um quarto do tablete diluído em 25 mL 10 mM TRIS.HCl, 5 mM MgCl₂ pH 9,2. A reação foi protegida da luz e o desenvolvimento de cor foi feito até a intensidade de cor desejada (TOWBIN *et al.*, 1979).

Os anticorpos utilizados foram os mesmos usados no ensaio de ELISA.

3.11 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia foi realizada a partir do ECI, obtido no item 3.4.3. Foi utilizado o sistema ÄKTA Purifier 10 (GE Health Life Science®).

A coluna utilizada foi uma MonoQ® HR 5/5, equilibrada com NaPB 20 mM pH 7,4. Foram aplicados à coluna 2 mL do extrato ECI, com concentração 0,24 mg/mL de proteína (0,48 mg total). Todo o material não retido e eluído foi coletado em frações de 0.5 mL. A eluição foi realizada com gradiente contínuo de NaCl, em um volume de 10 mL, partindo-se de 0 M até 1M de sal. Todos os tubos coletados foram analisados para a atividade ureásica.

3.12 Digestão trípica para análises por espectrometria de massas

O processo de digestão das amostras foi realizado de acordo com adaptações a partir de SHEVCHENKO *et al.* (1996).

3.12.1 Digestão em solução

Cada alíquota das frações obtidas da cromatografia de troca iônica foi tratada com DTT 50 mM a 60°C por 30 minutos. Após adicionou-se iodoacetamida 50 mM, conduzindo a reação por 30 minutos na ausência de iluminação. A cada tubo, foi adicionado 20 ng de tripsina e incubado a 37°C por 16 horas. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL TFA 0,1%. Cada fração foi dessalinizada através do sistema Oasis® HLB 30 µm (Waters) e liofilizada para posterior análise por espectrometria de massas.

3.12.2 Digestão de proteínas em gel de poliacrilamida

O gel obtido da eletroforese de poliacrilamida foi cortado em segmentos, nas regiões correspondentes à massa molecular da urease embrião específica da soja (SBU) (entre 80 e 100 kDa). Cada banda foi descorada com 50% de metanol e 5% de ácido acético em água e à temperatura ambiente. Cada segmento foi desidratado com acetonitrila e, após secagem realizada no SpeedVac®, tratada com DTT 10 mM por 30 min à temperatura ambiente. Após esse período, removeu-se o DTT e a alquilação foi feita com iodoacetamida 50 mM por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção da solução de iodoacetamida, cada segmento do gel foi lavado com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min. As bandas foram novamente desidratadas com acetonitrila 100% por 5 min, repetindo o processo de lavagem com bicarbonato de amônio 100 mM e desidratação com acetonitrila. Os segmentos foram secos em SpeedVac® por 10 minutos. Foi adicionado 40 ng de tripsina (solução 20 ng/µL) e incubado por 10 minutos a 4°C, quando foi removido o excesso de tripsina. Foi adicionado 50 mL de bicarbonato de amônio 50 mM e procedeu-se a reação por 16 h a 37 °C.

Terminada a digestão, os peptídeos foram recuperados e os segmentos de gel foram lavados com TFA 1% + acetonitrila 60 % (v/v).O digerido foi liofilizado e submetido à análise por espectrometria de massas.

3.13 Análises por espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ - RJ, em colaboração com Prof^a Dr^a Russolina Zingali, no sistema Waters nanoAcquity (Waters, Milford, MA). As moléculas obtidas nos itens 3.12.1 e 3.12.2 foram dessalinizadas usando a pré-coluna C18 Waters (Symmetry, 180 µm X 20 mm, 5 µm). Utilizou-se 7,5 µL do volume para injeção da amostra, a qual foi separada por cromatografia líquida utilizando a coluna BEH 130 C18 (100 µm X 100 mm, 1,7 mm – Waters, Milford, MA) em eluição 0,5 µL/min, com gradiente linear de acetonitrila (10% - 40%), contendo 0,1% de ácido fórmico. Os espectros de massas sequenciais foram obtidos utilizando o espectrômetro Synapt HDMS (Waters, Milford, MA) com interface para o sistema de cromatografia capilar nanoAcquity. A ionização por eletrospray (ESI) foi realizada utilizando 3000V, com temperatura da fonte de 80 °C e voltagem do cone de 40V.

A aquisição dos dados e controle do instrumento foi conduzida no programa MassLynx (Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 400-2000 razão massa/carga (m/z), utilizando intervalos de 1 segundo, aplicados durante todo o processo cromatográfico. Dados dependentes da aquisição de fragmentação MS/MS foram realizados nos precursores com cargas +2, +3 e +4, ao longo de um intervalo de 50-2000 (m/z) com um intervalo de 2 m/z . A partir de cada espectro (MS) no máximo 3

íons foram selecionados para posterior fragmentação por MS/MS. A dissociação induzida por colisão (CID) foi obtida através da utilização do gás argônio a uma pressão de 40 psi e uma energia de colisão com variação de 18 a 90V dependendo da carga e massa do precursor.

Também foram realizadas análises da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS), no sistema ESI Q-ToF, acoplado ao cromatógrafo nanoAcquity (Waters, Milford, MA). As moléculas foram dessalinizadas usando a pré-coluna 2G-V/M SymC18 (180 μm X 20 mm, 5 μm). Utilizou-se 5,0 μL do volume para injeção da amostra, a qual foi separada por cromatografia líquida utilizando a coluna BEH 130 C18 (100 μm X 100 mm, 1,7 mm – Waters, Milford, MA) em eluição 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, com gradiente linear de acetonitrila (10% - 90%), contendo 0,1% de ácido fórmico. Os espectros de massas sequenciais foram obtidos utilizando o espectrômetro ESI Q-ToF micro (Waters, Milford, MA) com interface para o sistema de cromatografia capilar nanoAcquity. A ionização por eletrospray (ESI) foi realizada utilizando 3300V, com temperatura da fonte de 90 °C e voltagem do cone de 35V.

A aquisição dos dados e controle do instrumento foi conduzida no programa MassLynx (Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 200-2000 razão massa/carga (m/z), utilizando intervalos de 1 segundo, aplicados durante todo o processo cromatográfico. Dados dependentes da aquisição de fragmentação MS/MS foram realizados nos precursores com cargas +2 e +3, ao longo de um intervalo de 50-2000 (m/z) com um intervalo de 1 m/z . A partir de cada espectro (MS) no máximo 3 íons foram selecionados para posterior fragmentação por MS/MS. A dissociação

induzida por colisão (CID) foi obtida através da utilização do gás argônio a uma pressão de 50 psi e uma energia de colisão com variação de 20 a 110V dependendo da carga e massa do precursor.

Os espectros obtidos foram processados e através do software Mascot Distiller, gerando arquivos com formato *mgf* (Mascot Generic File). Os arquivos gerados foram utilizados para realizar buscas em bancos de dados através do software MASCOT (Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros utilizados para as análises foram: enzima tripsina; carbamidometilação na cisteína como modificação fixa e como modificação variável oxidação da metionina. O número de tolerância de peptídeos de $\pm 0,5$ Da e número da tolerância MS/MS $\pm 0,5$ Da.

Foram submetidas à análise por espectrometria de massas as amostras obtidas por SDS-PAGE e as frações obtidas da cromatografia de troca iônica.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento e obtenção do material vegetal

Para o desenvolvimento do trabalho foram realizados 6 plantios, conforme descrito no item 3.1, dos quais 5 tiveram todo seu desenvolvimento até a utilização nos ensaios em casa de vegetação, e apenas 1 teve seu início de desenvolvimento em casa de vegetação, até o estágio vegetativo V3, em que as plantas apresentavam o terceiro e segundo trifólio totalmente desenvolvido, e depois transferido para outro lugar.

O motivo da remoção das plantas no último plantio foi devido a infestação de lagartas na casa de vegetação. Durante o desenvolvimento deste trabalho, a casa de vegetação teve duas grandes infestações por lagartas, no período entre os meses de janeiro e fevereiro, período em que aumenta a infestação da lagarta devido ao excesso de calor (fonte: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/03/lavouras-de-soja-do-rs-sofrem-com-ataque-da-lagarta-falsa-medideira.html>).

Apenas no primeiro e segundo plantios as plantas foram divididas em 2 grupos, conforme descrito a seguir. Nos demais plantios, todas as plantas foram cultivadas até o estágio vegetativo V6, por ser o último estágio antes da floração, em que as folhas apresentavam coloração verde mais intensa, com possivelmente maior quantidade de cloroplastos.

As plantas obtidas no primeiro plantio foram divididas em 2 grupos, com cerca de 50 plantas cada. O primeiro grupo foi utilizado para crescimento das plantas até o estágio reprodutivo R8, onde ocorre a maturação plena dos grãos. Neste plantio, foi obtido aproximadamente 300 g de grãos de soja. Estes

grãos foram utilizados como sementes nos demais plantios. O segundo grupo foi cultivado até o estágio vegetativo V6. Este grupo de plantas foi utilizado para obtenção do EF (item 3.3).

No segundo plantio as plantas também foram divididas em 2 grupos, sendo que uma parte das plantas foi utilizada para estabelecer o método de extração e purificação dos cloroplastos, pois não foi possível utilizar as mesmas condições de centrifugação do protocolo original (SEIGNEURIN-BERNY *et al.*, 2008), como rotores, velocidades, e tempo. Também foi nesta etapa do trabalho que foram feitos os ajustes de quantidades de folhas necessárias para a extração e adequação dos volumes de homogenato em cada tubo com gradiente de Percoll[®], com a segunda parte das plantas.

A partir do terceiro plantio, já com as condições de extração adequadas, é que foi realmente possível obter os extratos para realização das análises efetuadas. Em cada plantio, a quantidade média de massa de folhas obtidas e utilizadas para a extração de cloroplastos foi de aproximadamente 150 g, gerando cerca de 10 mL de ECI com aproximadamente 0,2 µg/mL de concentração de proteínas.

4.2 Extratos de sementes (ES) e folhas (EF) de soja

Os extratos de semente e folhas de soja, denominados de ES e EF, respectivamente (Tabela 3), foram preparados para fins de otimização das condições de ensaio a serem feitas com o extrato de cloroplastos íntegros (ECI). Também serviram como fonte de comparação para os níveis de atividade ureásica detectados. Não é novidade que a semente de soja possui uma alta quantidade de urease, refletindo em uma alta atividade nos ensaios.

Nas folhas, entretanto, esta atividade é consideravelmente reduzida, provavelmente pela quantidade da enzima nesta parte da planta.

Tabela 3: Ensaio de atividade ureásica dos extratos ES e EF. O tempo de reação do ensaio foi de 2 h, a 37 °C, com concentração final de 25 mM de ureia para o ESS e 100 mM para o EFS. Foram aplicadas 14,50 µg de proteínas. Uma unidade de atividade ureásica é a quantidade de enzima que libera 1 µmol de produto/min de reação a 37°C.

Fração	Quantificação de proteínas (µg/mL)	Atividade enzimática (U/mg)
ES	20,55	6321,43
EF	0,29	3,91

4.3 Purificação dos cloroplastos

Como mencionado no item 4.1, foi necessário realizar várias adaptações do protocolo disponível (SEIGNEURIN-BERNY *et al.*, 2008) até chegar-se às condições ideais de obtenção da organela pura. Para utilização dos rotores disponíveis, testes utilizando-se o homogenato foram realizados variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação, além de ajustar os volumes de gradiente de Percoll® e do homogenato em cada tubo.

Depois de estabelecidas as melhores condições, procedeu-se a purificação da organela. Na centrifugação, os cloroplastos íntegros, por serem mais densos, permaneceram em suspensão na fase mais densa do gradiente, enquanto membranas da organela rompida e seu conteúdo extravasado, por estarem dispersos e serem menos densos, ficaram em suspensão na fase superior do gradiente de Percoll®, conforme Figura 6.

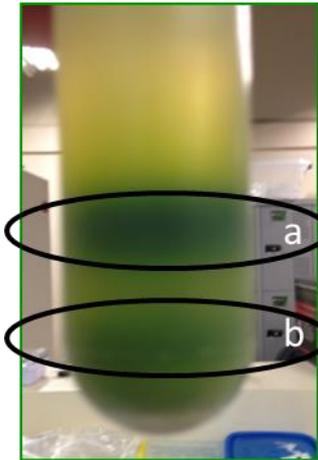


Figura 6: gradiente de Percoll®: após a centrifugação, é possível observar a fração menos densa, contendo os cloroplastos rompidos (a), e na fração mais densa (b) os cloroplastos íntegros.

4.4 Verificação da integridade dos cloroplastos por microscopia

A microscopia de fluorescência atestou a integridade dos cloroplastos purificados. As imagens apresentadas nas Figuras 7a e 7b foram feitas com a fração de cloroplasto purificado (Figura 6), imediatamente antes da lise mecânica, que originou então o extrato ECI. Observamos na microscopia de campo claro e na microscopia de fluorescência que os cloroplastos apresentaram-se íntegros no final do processo (Figura 7a), e fluorescentes, efeito causado pela clorofila (Figura 7b).



Figura 7: microscopias. Em (a) microscopia de cloroplasto íntegro, (b) microscopia de fluorescência do cloroplasto íntegro (excitação 440 nm e emissão em 685 nm); (c) microscopia de cloroplastos rompidos – Magnificação 125 X.

4.5 Detecção da urease no extrato de cloroplasto purificado (ECI)

4.5.1. Detecção por atividade ureásica

Foi detectada atividade ureásica no extrato ECI, em um ensaio longo de 2 h. Em tempos menores que 2 horas, não foi possível a detecção, ou mesmo a intensidade de cor produzida pelo branco de ureia era igualmente alta, não possibilitando uma conclusão. As atividades ureásicas detectadas nesta fração e nas demais que foram usadas como fonte de comparação estão compiladas na tabela 4.

Como pôde ser visto, não há atividade ureásica presente nas últimas frações de lavagem (LI4 e LR4), especialmente naquela fração contendo o cloroplasto ainda não rompido, que gerou o extrato ECI (Figura 6). Desta forma, demonstra-se que a atividade detectada pelo método enzimático não é oriunda de contaminação citoplasmática ou mesmo oriunda de cloroplastos rompidos.

Tabela 4: Resultados da quantificação de proteínas e da atividade enzimática em cada fração analisada. EF= extrato de folhas; ECI= extrato de cloroplastos íntegros; ECR= extrato de cloroplastos rompidos; LI4= última fração de lavagem dos cloroplastos íntegros; LR4= última fração de lavagem dos cloroplastos rompidos: (*) Os valores de absorvância à 570 nm são extremamente baixos (A_{570} :0,009 para LI4 e A_{570} = 0,008 para LQ4), indicando que não foi detectada atividade enzimática para estas frações.

Fração	Quantificação de proteína total (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mg)
EF	0,2990	3,91
ECI	0,2278	36,89
ECR	0,0753	64,71
*LI4	0,0408	*
*LR4	0,0461	*

4.5.2 Detecção por ELISA

Somente o extrato ECI foi ensaiado por ELISA, conforme explicado em 3.8, e nele foi detectada a presença de urease. De acordo com a curva padrão, a enzima estava presente naquela amostra na concentração de 450 ng/mL, equivalente a 1,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total. Estes resultados estão apresentados na Figura 8.

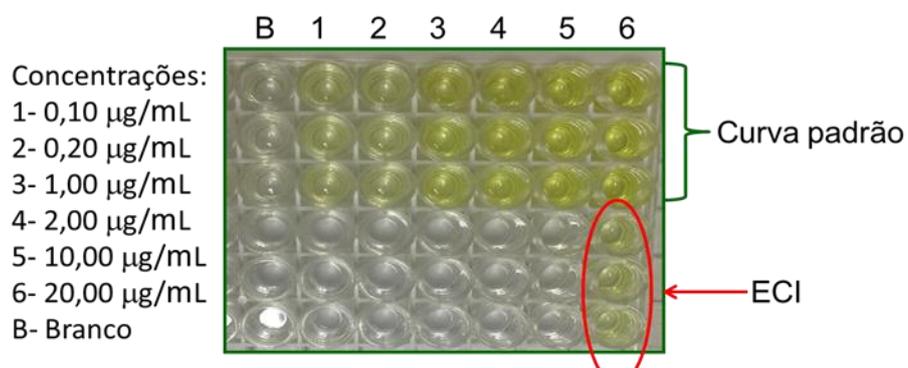


Figura 8 Ensaio de ELISA: pôde-se verificar a imunoreatividade do extrato ECI com o anticorpo anti-urease, indicando a presença de urease no extrato, além de determinar a quantidade de urease no extrato ECI.

4.5.3 SDS-PAGE e Western blot

O gel obtido no SDS-PAGE foi submetido à análise por Western blot. Visualmente, o resultado não foi satisfatório. Problemas com a revelação,

associados à baixa quantidade da proteína de interesse não possibilitaram a identificação visual da urease quando comparada ao padrão de massa molecular.

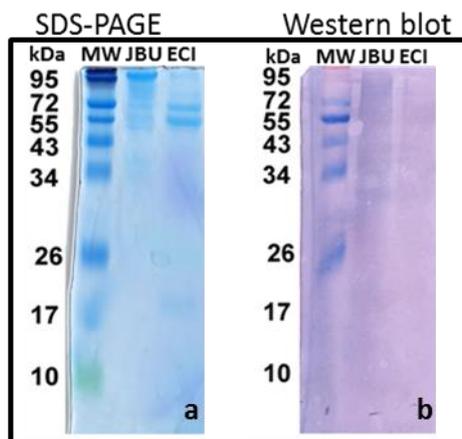


Figura 9: Análise por SDS-PAGE e Western blot do ECI. (a) gel de poliacrilamida a 10%. Legenda: MW= padrão de massa molecular; JBU= 20 µg de urease de *C. ensiformis*; ECI= 20 µL do extrato contendo aproximadamente 50 µg de proteínas. (b) proteínas do gel de poliacrilamida com as proteínas transferidas para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo anti-urease de *C. ensiformis* e com IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina. As amostras das canaletas do Western blot são correspondentes às da Figura 9a.

4.5.4 Cromatografia de troca iônica

O extrato ECI foi submetido à cromatografia de troca iônica, em coluna MonoQ HR 5/5, conforme explicado no item 3.11. As ureases são enzimas que normalmente estão negativamente carregadas em pH ao redor de 7. As atividades enzimáticas foram feitas conforme descrito no item 3.7, de cada tubo da cromatografia.

Conforme a figura 10, observamos uma distribuição da atividade ureásica ao longo da eluição. Foram detectadas quatro zonas de atividade distintas. Em uma primeira região do cromatograma, a atividade distribuiu-se entre 10 mL e 12,5 mL, correspondendo a regiões de fração não retida e eluída. Entre 15 mL (400 mM NaCl) e 17,5 mL (620 mM NaCl), foram

detectados dois picos de atividade, e mais uma última fração com enzima ativa e que ficou bastante retida na coluna, sendo eluída com aproximadamente 750 mM de NaCl (75 mS/cm). Esta cromatografia foi feita duas vezes, em partidas diferentes, e o perfil cromatográfico foi mantido.

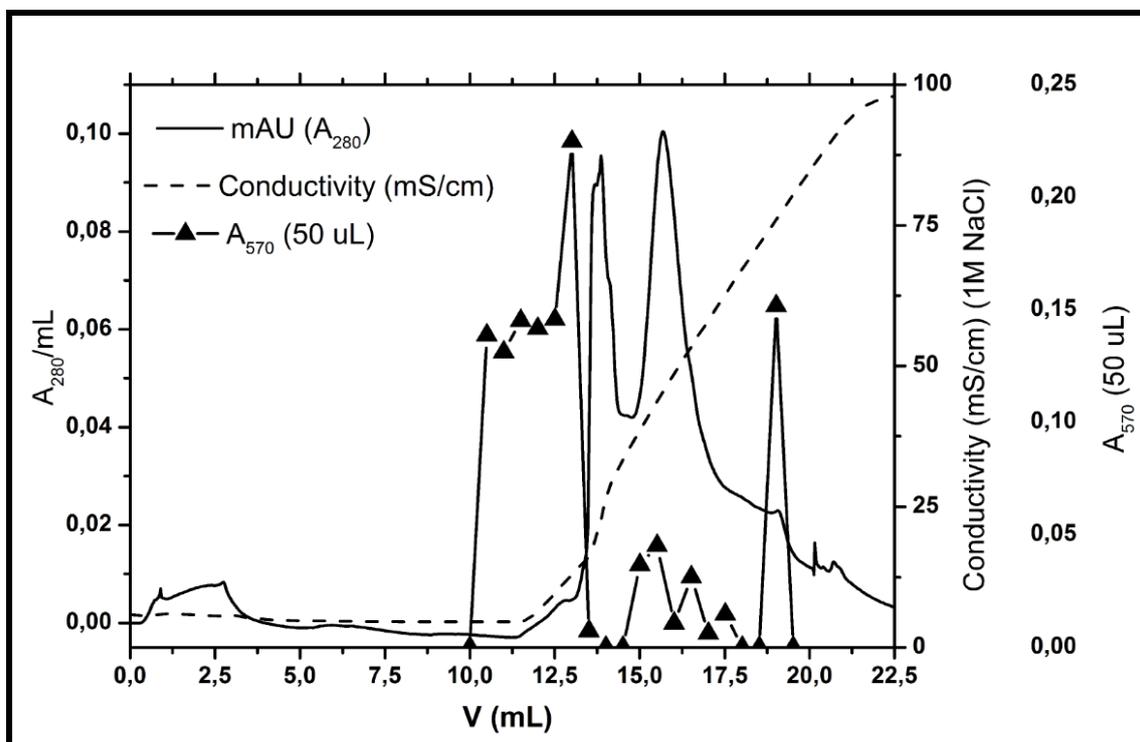


Figura 10: Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q do extrato de cloroplastos íntegros. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl 1 M em tampão de fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Frações de 0,5 mL foram coletadas. Foi medida condutividade (mS/cm), absorvância em 280 nm e atividade enzimática das frações eluídas, expressas como $A_{570}/50 \mu\text{L}$. Os valores de A_{570} expressos já estão com desconto do respectivo branco de reação.

4.5.5 Espectrometria de massas

Os dados obtidos por espectrometria de massas não foram satisfatórios para a identificação da urease e outras proteínas. Mesmo que tenhamos utilizado diferentes bancos de dados de busca e variando a adstringência para

níveis mais baixos, infelizmente, nenhuma proteína pôde ser identificada por espectrometria de massas até o momento, nos materiais analisados.

5 DISCUSSÃO

Cloroplastos são estudados das mais diversas formas. No caso do presente estudo, uma questão importante foi levantada em 2010, em que demonstrou-se evidências de que alguma urease de soja pudesse estar localizada nos cloroplastos. Naquela ocasião, várias proteínas típicas de cloroplastos foram detectadas por espectrometria de massas, ao ser realizado um estudo de co-imunoprecipitação. Tanto a cobertura de sequência, como a quantidade de peptídeos únicos, bem como a característica bioquímica das proteínas detectadas reforçam que a urease poderia estar interagindo com elas de alguma forma. O anticorpo utilizado naquela ocasião foi monoclonal, específico para a urease de *Canavalia ensiformis* (DEMARTINI *et al.*, 2011).

No presente trabalho, com o intuito de avançar na investigação da localização subcelular da urease de soja, resolvemos purificar cloroplastos de folha de soja. Para isto, um processo de purificação de cloroplastos foi desenvolvido até um estágio suficientemente homogêneo para verificar, por ferramentas bioquímicas, imunoquímicas e por espectrometria de massas se a urease estaria ou não presente na organela.

O processo aqui empregado para extração e purificação de cloroplastos mostrou-se eficaz para obter a organela íntegra, como pode ser verificado nas microscopias (Figura 7), com alto grau de enriquecimento. Neste momento não foi possível ainda realizar a validação do grau de pureza da organela com o uso de anticorpos específicos. Normalmente são utilizados para esse fim, anticorpos contra proteínas internas do tilacóide (Tic 40 e Toc 75).

Neste estudo, obtiveram-se evidências da presença de ureases no cloroplasto isolado (extrato ECI). Ensaio de atividade ureásica confirmaram a

presença da enzima. Este resultado foi reproduzível nas diversas extrações feitas e foi confirmado também pelo ELISA. Sabe-se que a urease está presente no citoplasma da célula vegetal (FAYE *et al.*, 1986), entretanto, a atividade detectada no extrato ECI (36,9 U/mg), quando comparada com a detectada no extrato total de folhas EF (3,9 U/mg) é consideravelmente maior, reforçando que, uma parcela considerável de urease está associada ou presente na organela de alguma forma, e que esta enzima foi enriquecida junto com o processo de purificação dos cloroplastos. A atividade ureásica não foi detectada em tempos curtos de reação. O melhor tempo foi de 2 h, uma vez que, em tempos mais prolongados a enzima já perdia a sua atividade.

Em nosso teste de ELISA, o reconhecimento de ureases no ECI foi feito por um anticorpo diferente daquele usado no trabalho de DEMARTINI e colaboradores (2011). Naquele estudo, foi usado um anticorpo monoclonal e no presente caso, utilizou-se um anticorpo policlonal, ambos para a urease de *Canavalia ensiformis* (seção 3.8). Mesmo que as ureases de soja e de *Canavalia* compartilhem ao redor de 86 % de identidade de aminoácidos, esta diferença pode interferir em alguns estudos. Aqui, apesar de todas as tentativas feitas, não pudemos identificar a urease no extrato ECI por Western Blot (Figura 9), apesar do resultado positivo no ELISA. A quantidade de urease detectada por ELISA reforça que ela é pouco abundante na organela, ainda que sua atividade seja mensurável. Isto não é uma surpresa com ureases. O mesmo fato ocorre com outras, como a urease recombinante de *Helicobacter pylori*. A urease purificada apresenta altíssima atividade enzimática, mesmo que a quantidade de proteína seja praticamente indetectável. Ureases de *Canavalia* e também de soja apresentam-se negativamente carregadas em pH

ao redor de 7,4 (FOLLMER *et al.*, 2004). Por esta razão, decidimos avançar uma etapa no enriquecimento da urease a partir do extrato ECI. A cromatografia de troca iônica apresentada na Figura 10, demonstra um perfil de eluição da atividade ureásica um tanto difuso. Isto também não foi um dado tão surpreendente, quando comparamos com demais ureases. Estas enzimas geralmente ficam “espalhadas” em uma eluição de troca aniônica. Entretanto, no caso aqui presente, podemos ter uma associação da urease do cloroplasto com alguma(s) outra(s) proteína(s), e esta associação interfere no comportamento de eluição. Os picos eluídos foram então ensaiados para atividade ureásica (Figura 10) e submetidos à digestão de proteínas tanto em gel, como em solução, para tentar uma identificação de qual isoforma de urease de soja estaria presente na fração ECI.

Foram feitas duas tentativas, em dois equipamentos distintos: o material digerido em solução foi analisado no sistema nanoAcquity-Synapt (Waters) e no sistema nanoAcquity-QtoF (Waters), e o digerido obtido a partir de SDS-PAGE foi analisado no sistema nanoAcquity-Synapt (Waters). Infelizmente não foi possível a identificação da ureases e de nenhuma outra proteína por espectrometria de massas.

Um estudo para identificação de ribonucleoproteínas em cloroplastos de folhas de tabaco foi realizado após extração do estroma, envelope e tilacóides da organela, sendo cada fração analisada por Western blot. Neste estudo foi possível identificar a localização das proteínas de interesse através da imunorreatividade com anticorpos específicos e as proteínas foram identificadas através de Western blot (NAKAMURA *et al.*, 1999). Nos nossos ensaios de Western blot não foi possível detectar a presença de proteínas

imunorreativas para o anticorpo anti-urease. Apesar de ter sido observada uma atividade enzimática considerável na fração plastidial, a quantidade de proteínas é muito baixa, provavelmente insuficiente para se observar a interação proteína – anticorpo.

Análises por espectrometria de massas vêm sendo realizadas para identificação de proteínas de cloroplastos. Bancos de dados dedicados à anotação do proteoma de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* conta com proteínas identificadas em estroma, envelope e tilacóides do cloroplasto (BRULEY *et al.*, 2012). Entretanto, nestes estudos os pesquisadores partem de uma quantidade consideravelmente alta de material vegetal; fazem extrações diferenciais para enriquecer proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas; realizam análises por espectrometria de massas em espectrômetros distintos (dotados de analisadores diferentes), além de processarem diferentemente as digestões proteolíticas. Usam enzimas distintas para a geração de peptídeos normalmente não identificáveis. Desta forma, todas estas alterações de protocolo favorecem a identificação de proteínas menos abundantes em um sistema.

Os estudos de proteomas de cloroplastos apresentaram muitas proteínas de função desconhecida, e que não têm prevista sua localização no cloroplasto (KLEFFMANN *et al.*, 2004). Este dado revela a importância de se continuar o estudo proteômico no cloroplasto, buscando informações que permitam melhor compreender a fisiologia da organela e também a função ainda não descrita de proteínas, além de aprofundar a busca por proteínas ainda não identificadas, de menor abundância. (PELTIER *et al.* 2000).

Em 2010, Ferro e colaboradores publicaram o AT_CHLORO Database (www.grenoble.prabi.fr/at_chloro; FERRO *et al.*, 2010), contendo aproximadamente 1400 proteínas não redundantes, identificadas e quantificadas por contagem espectral, oriundas de cloroplastos de folhas de *Arabidopsis thaliana*, purificados em nível de subcompartimentos celulares, através de extrações diferenciais. Não há a ocorrência de urease no banco de dados fornecido, e tampouco em bancos de dados das organelas pesquisados. Não existe para soja um banco de dados tão robusto como este e que sirva de comparação.

Até onde se sabe a urease não é codificada pelo genoma plastidial. Desta forma, a detecção da urease nos cloroplastos feita neste trabalho abre portas para se investigar um papel bioquímico desta enzima na organela. Até o momento também é difícil inferir o que a urease estaria fazendo no cloroplasto. Um dado mais novo e igualmente interessante sugere que o níquel seja incorporado pelo cloroplasto através de um transportador específico (EITINGER *et al.*, 2005; KRÄMER & CLEMENS, 2005; CLAUS-PETER, 2011;; THEG & WOLLMAN, 2014). E até onde se sabe também, a única enzima vegetal que necessita níquel para sua catálise é a urease (THEG & WOLLMAN, 2014).

Com a abordagem feita neste estudo, não foi possível saber em qual subcompartimento do cloroplasto a urease está localizada. Mas é possível afirmar que a atividade detectada é oriunda dos cloroplastos e não de contaminação citoplasmática.

Apesar das tentativas, neste estudo, as análises por espectrometria de massas não possibilitaram a identificação da urease com os parâmetros

utilizados. Apesar de algumas frações apresentarem uma elevada atividade enzimática quando analisadas individualmente, as mesmas frações não possuíam quantidade significativa de proteínas como pode ser verificado no ensaio de quantificação de proteínas de cada uma das frações da troca iônica. Para contornar essa dificuldade, devem ser investidos esforços para obter uma fração do extrato de cloroplastos com maior concentração de proteínas, o que tornaria maior as chances de sucesso em se identificar proteínas menos abundantes na organela.

6 CONCLUSÃO

O método utilizado para extração e enriquecimento de cloroplastos, adaptado de protocolos amplamente utilizados, mostrou-se um método eficiente, que possibilita a obtenção da organela íntegra, que pode ser objeto de estudo para ampliar conhecimentos sobre sua fisiologia.

Com a realização de ensaios de atividade enzimática, ELISA e estudo das frações de cromatografia de troca iônica, foi claramente possível comprovar a presença de ureases na organela, embora seja necessária a realização de mais estudos para identificar a localização da enzima no plastídio. Análises de bioinformática e filogenia podem ser ferramentas importantes para tentar responder sobre a origem de ureases nos cloroplastos, uma vez que com os ensaios analíticos realizados não permitiram identificar essa origem.

Muitas possibilidades podem ser exploradas a partir do presente trabalho, visto que não se tem conhecimento de estudos que busquem compreender a presença e a função de ureases no cloroplasto.

7 PERSPECTIVAS DE MÉDIO E LONGO PRAZO

- Aprimorar o processo de extração de cloroplastos, para obtenção da organela purificada em nível de subcompartimentos;
- Avaliar se a urease pode estar presente em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, realizando a extração de cloroplastos em diferentes momentos;
- Realizar ensaios imunoquímicos e de imagem para identificar a localização plastidial de ureases;
- Aprimorar o método de extração para obter quantidade suficiente de proteínas para realizar identificação por espectrometria de massas;
- Identificar a origem de ureases presentes no cloroplasto;
- Estudar o papel bioquímico das ureases na organela;
- Realizar análises de imagem, como microscopia confocal, onde, com o emprego de marcadores específicos, será possível uma visualização tridimensional de substâncias de interesse na organela íntegra.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. **Garland Science**, 2002.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, p. 949-951, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure, **Journal Molecular Biology**, v. 400, p. 274-283, 2010.
- BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; MITIDIERI, S.; FEDER, V.; WASSERMANN, G. E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; CARLINI, C. R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v. 41, p. 821-827, 2007.
- BENNING, C. A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 381-389, 2008.
- BOCK, R.; KHAN, M. S. Taming plastids for a green future. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 311-318, 2004.
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E.; CHECKAI, R. T. Beneficial effects of nickel on plant growth. **Journal of Plant Nutrition**, v. 10, p. 9-16, 1987.
- BRULEY, C.; DUPIERRIS, V.; SALVI, D.; ROLLAND, N.; FERRO, M. AT_CHLORO: a chloroplast protein database dedicated to sub-plastidial localization. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 205, p. 1-8, 2012.
- CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) seeds, distinct from Concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667-675, 1981.

- CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 84, p. 551–560, 1985.
- CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect by inset cathepsin-like enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 340-348, 1997.
- CLAUS-PETER, W. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, v. 180, p. 431-438, 2011.
- COOPER, G. M. *The Cell – A Molecular Approach*. 2nd ed. **Boston University**, 2000.
- COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. A.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M.A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 166-175, 2001.
- DEFFERRARI, M. S. Ação tóxica da urease de *Canavalia ensiformis* e do peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec sobre *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaidade). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2010.
- DEMARTINI, D. R.; CARLINI, C. R.; THELEN, J. J. Global and target proteomics in developing jack bean (*Canavalia ensiformis*) seedings: an investigation of urease isoforms mobilization in early stages of development. **Plant Molecular Biology**, v. 75, p. 53-65, 2011.
- DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; WATTERS, J. J.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for the nickel? **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, p. 4131-4133, 1975.

- EITINGER, T.; SUHR, J.; MOORE, L.; SMITH, J. A. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. **Biometals**, v. 18, p. 399-405, 2005.
- EMES, M. J.; TOBIN, A. K. Control of metabolism and development in higher plants plastids. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 149-201, 1993.
- FAQUIN, V. Nutrição Mineral de Plantas. **Universidade Federal de Lavras**, 2005.
- FAYET, L.; GREENWOOD, J. S.; CHRISPEELS, M. J. Urease in jack-bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) seeds is a cytosolic protein. **Planta**, v. 168, p. 579-585, 1986.
- FEDER, V. O papel da urease e proteínas acessórias na virulência de *Cryptococcus gattii*. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2012.
- FERNIE, A. R.; OBATA, T.; ALLEN, A. E.; ARAÚJO, W. L.; BOWLER, C. Levering metabolics for functional investigations in sequenced marine diatoms. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 7, p. 395-403, 2012.,
- FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 162-171, 2000.
- FERRO, M.; BRUGIÈRE, S.; SALVI, D.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; COURT, M.; MOYET, L.; RAMUS, C.; MIRAS, S.; MELLAL, M.; LE GALL, S.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; BRULEY, C.; GARIN, J.; JOYARD, J.; MASSELON, C.; ROLLAND, N. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and current information on envelope proteins. **Molecular Cell Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1063-1084, 2010.
- FOLMER, C.; REAL-GUERRA, R.; WASSERMAN, G. E.; OLIVEIRA-SEVERO, D.; CARLINI, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pateurii* ureases –

- Biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p.1357-1363, 2004.
- GOLDRAIJ, A., BEAMER, L. J., POLACCO, J. C. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. **Plant Physiology**, v. 132, n. August, p. 1801-1810, 2003.
- HELM, S; DOBRITZSCH, D.; RÖDIGER, A.; AGNE, B.; BAGINSKY, S. Protein identification and quantification by data-independent acquisition and multi-parallel collision-induced dissociation mass spectrometry (MS^E) in the chloroplast stroma proteome. **Journal of Proteomics**, v. 98, p. 79-89, 2014.
- IRELAND R. J.; LEA, P. J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism, *In* **BK Singh, ed, Plant Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology**. Marcel Dekker, New York, p. 49-109, 1999.
- JOYARD, J.; TEYSSIER, E., MIÈGE, C.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; MARÉCHAL, E.; BLOCK, M. A.; DORNE, A.; ROLLAND, N.; AJLANI, G.; DOUCE, R. The biochemical machinery of plastid envelope membranes. **Plant Physiology**, v. 118, p. 715-723, 1998.
- JOYARD, J.; FERRO, M.; MASSELON, C.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; SALVI, D.; GARIN, J.; ROLLAND, N. Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipids metabolism. **Progress in Lipids Research**, v. 49, p. 128-158, 2010.
- JUNGHANS, T. G.; MOSQUIM, P. R. Atividade da sintetase da glutamina e sintase do glutamato em explantes de frutos de soja sob diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 67-74, 1995.
- KIMATA-ARIGA, Y.; HASE, T. Multiple complexes of nitrogen assimilatory enzymes in spinach chloroplasts: possible mechanisms for the regulation of enzyme function, **Plos One** v. 9, p.1-9, 2014.

- KLEFFMANN, T.; RUSSENBERGER, D.; von ZYCHLINSKI, A.; CHRISTIOHER, W.; SJÖLANDER, K.; GRUISSEM, W.; BAGINSKY, S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel proteins functions. **Current Biology**, v. 14, n. 5, p. 354-362, 2004.
- KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 9-21, 2009.
- LIU, G.; SIMINNE, E. H.; LI, Y. Nickel Nutrition in Plants. **IFAS Extension – University of Florida**, p. 1-6, 2014.
- MENEGASSI, A.; WASSERMANN, G. E.; OLIVEIRA-SEVERO, D.; BECKER-RIT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; FEDER, V.; CARLINI, C. R. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physico-chemical characterization and antifungal properties of the protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4399-4405. 2008.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 451-480, 1995.
- MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews** v. 53, n. 1, p. 85-108, 1989.
- MULLINARI, F.; BECKER-RITT, A. B.; DEMARTINI, D. R.; LIGABUE-BRAUN, R.; STANISÇUASKI, F.; VERLI, H.; FRAGOSO, R. R.; SCHROEDER, E. K.; CARLINI, C. R. GROSSI-DE-SÁ, M. F. Characterization of JBURE-IIb Isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1758-1768, 2011.
- MULROONEY, S.B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 239-261, 2003.
- MURRAY, D. R.; KNOX, R. B. Immunofluorescent localization of urease in the cotyledons of jack bean, *Canavalia ensiformis*. **Journal of Cell Science**, v. 26, p. 9, 1977.

- NAKAMURA, T.; OHTA, M.; SUGIURA, M.; SUGITA, M. Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. **FEBS Letters**, v. 460, p. 437-441, 1999.
- OLIVEIRA, A. E. A.; GOMES, V. M.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CARLINI, C. R.; XAVIER-FILHO, J. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC] canatoxin to plant pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Biology**, v. 59, n. 1, 59-62, 1999.
- PELTIER, J. B.; FRISO, G.; KALUME, D. E.; ROEPSTORFF, P.; MILSSON, F.; ADAMSKA, I.; WIJK, J. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylacoid proteins. **The Plant Cell**, V. 12. P. 319-341, 2000.
- PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; MARCO-SALVADORI, J.; REAL-GUERRA, R.; DEFERRARI, M. S.; CARLINI, C. R. Stage-specific proteinases of the cotton sainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 1023-1032, 2008.
- PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BARCELLOS, G. B. S.; CARLINI, C. R.; MORAES, M. G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene Family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 139-145, 2003.
- POLACCO, L. C.; HAVIR, E. A. Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 1707-1715, 1979.
- POLACCO, L. C.; SPARKS, Jr. R. B. Patterns of urease synthesis in developing soybeans. **Plant Physiology**, v. 70, p. 189-194, 1982.
- POLACCO, J. C.; WINKLER, R. G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? **Plant physiology**, v. 74, p. 800-803, 1984.
- POLACCO J. C.; HOLLAND, M. A.; Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 56-103, 1993.

- ROESSING, A. C.; GUEDES, L. C. A. Cultura de Soja no Cerrado. **Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa de Potassa e Fostato**, 1993.
- RUBENSTEIN, K. E.; SCHNEIDER, R. S.; ULLMAN, E. F. Homogeneous enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 47, p 846, 1972.
- SEIGNEURIN-BERNY, D.; SALVI, D.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. Purification of intact chloroplasts from arabidopsis and spinach leaves by isopycnic centrifugation. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 3.30.1-3.30.14, 2008.
- SHANNON, J.; GARWOOD, D. Starch: Chemistry and Technology. 2nd ed. **Academic Press**, p. 43-44, 1984.
- SHEVCHENKO, M.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamyde gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.
- SIRKO, A.; BRODZIK, R. Plants ureases: roles and regulation. **Acta Biochimica Polonia**, v. 47, p. 1189-1195, 2000.
- STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULLINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, p. 753-760, 2005.
- STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. **Plant Physiology**, v. 109, p. 169-175, 1995.
- SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. **Journal of Biochemistry**, v. 69, p. 435-441, 1926.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 4 ed. Artmed, p. 156-157; 206-210, 2010.
- TORISKI, R. S.; GRIFFIN, J. D.; YENOFISKY, R. L.; POLACCO, J. C. A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Molecular & general genetics: MGG**, v. 242, p. 404-414, 1994.

- TOWBIN H.; STAEBELIN T.; GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 245-266, 2004.
- WASSERMANN, G. E.; OLIVEIRA-SEVERO, D.; UBERTI, A. F.; CARLINI, C. R. *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 56, p. 1078-1086, 2010.
- WATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-975, 1967.
- WIJK, K. J. Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 420-425, 2000.
- WINKLER, R. G.; POLACCO, J. C.; BLEVINS, D. G.; RANDALL, D. D. Enzymatic degradation of allantoate in developing soybean. **Plant Physiology**, v. 79, p.787-93, 1985.
- ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; BENINI, S.; CIURLI, S. Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 7, p. 520-530, 2011.
- ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. **Bioorganic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 116-131, 1991.