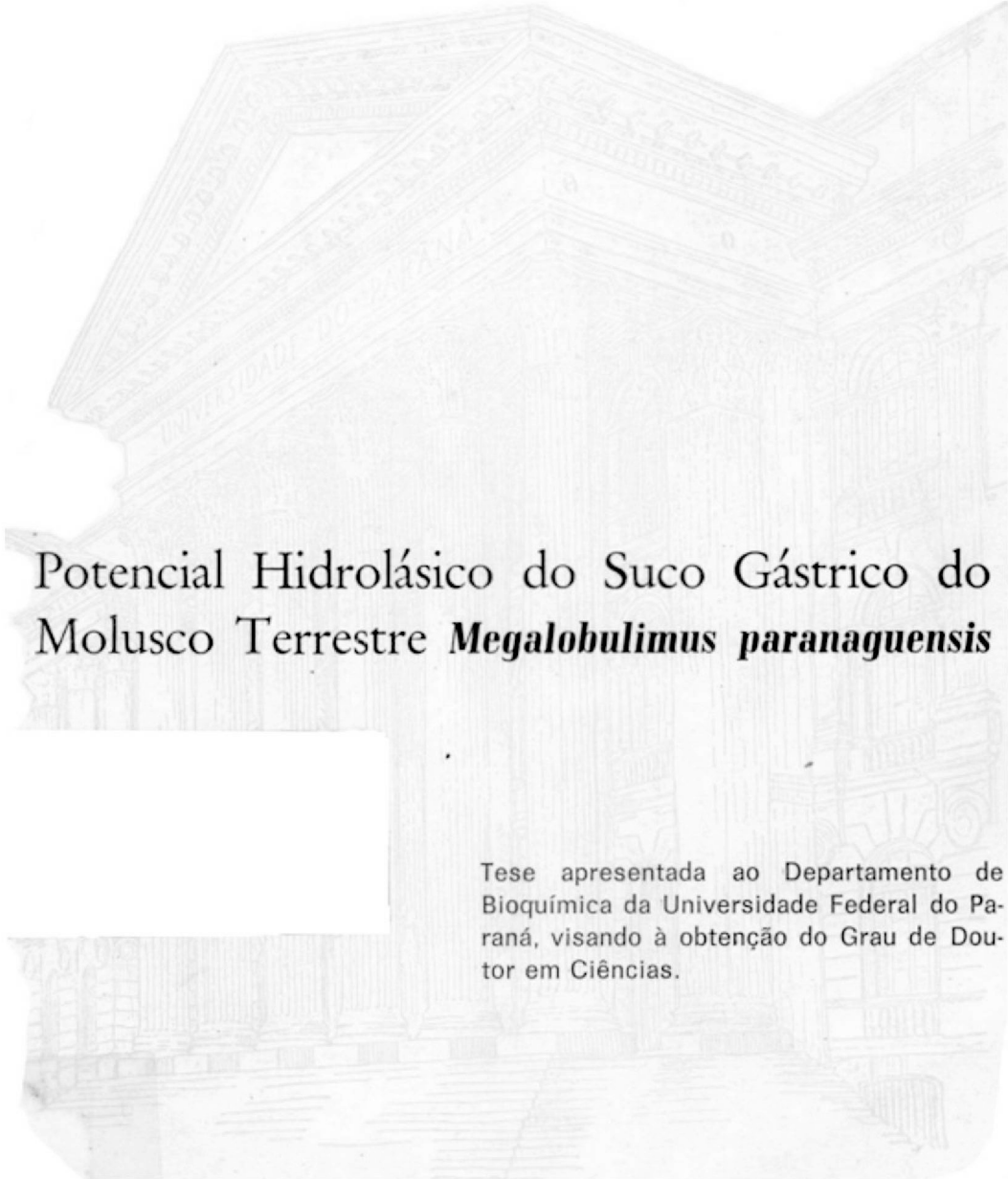


MUNIF GEBARA



Potencial Hidrolásico do Suco Gástrico do
Molusco Terrestre *Megalobulimus paranaguensis*

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Pa-
raná, visando à obtenção do Grau de Dou-
tor em Ciências.

CURITIBA

1989

MUNIF GEBARA

Potencial Hidrolásico do Suco Gástrico do
Molusco Terrestre *Megalobulimus paranaguensis*

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Pa-
raná, visando à obtenção do Grau de Dou-
tor em Ciências.

CURITIBA
1989

POTENCIAL HIDROLÁSICO DO SUCO GÁSTRICO DO MOLUSCO TERRESTRE

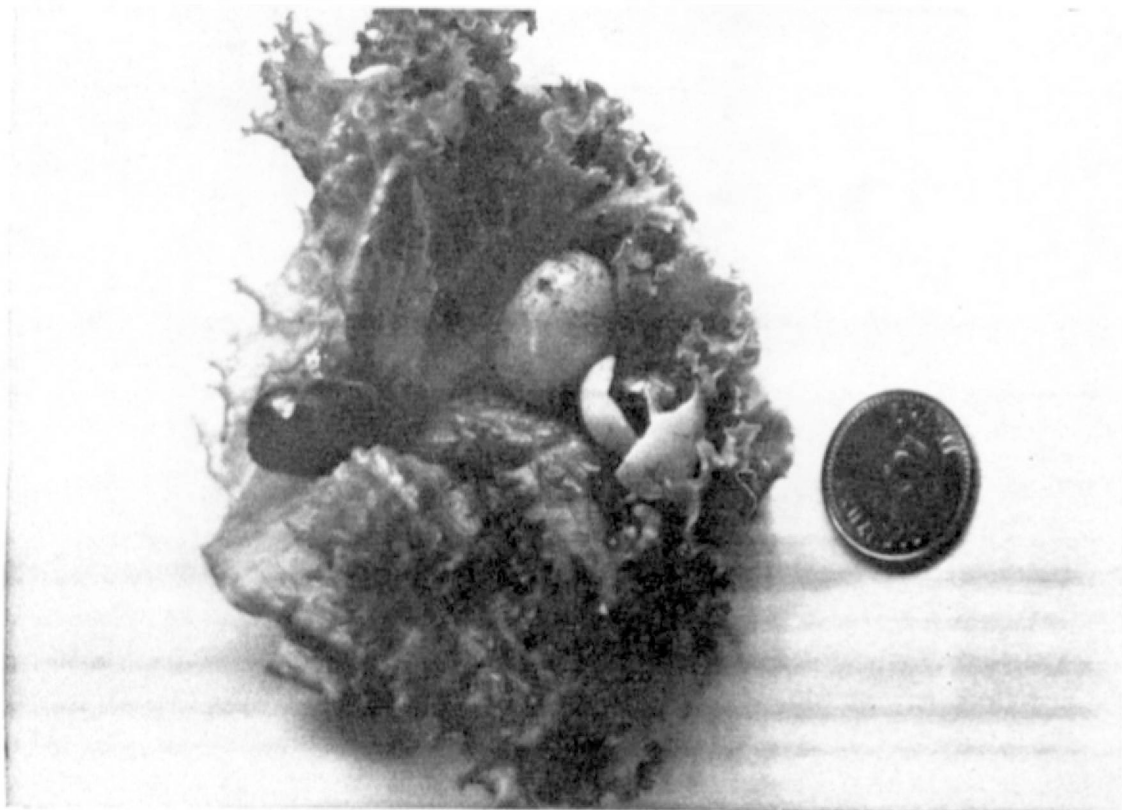
Megalobulimus paranaguensis, PILSBRY E IHERING (1900)

Doutorando: Munif Gebara

(Depto. Bioquímica - FUEM - Maringá - PR)

Orientador: José Domingos Fontana

(Depto. Bioquímica - UFPR - Curitiba - PR)



(Eclosão do *Megalobulimus paranaguensis*, "Jatutá")

Foto : Dante Romanó Neto: academ. Lic. C. Biológicas - UFPR - Iniciação Cient. CNPq;
Antonio Dunaiski: aperfeiçoamento - CNPq.

Dedicatória

*À Josil, minha esposa,
Cláudia Maria e Munif Jr.
meus filhos, geradores de
estímulo e razão de viver.*

Homenagem

*ao Prof. Dr. José Domingos Fontana,
pela orientação segura e constante
e por seu exemplo como vocação in-
cansável para a docência e pesquisa,
agradeço seu apoio, confiança e ami-
zade demonstrados durante a execu-
ção deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. João Batista Chaves Correa e José Hazencleve Duarte pelas sugestões apresentadas após leitura criteriosa dos originais deste manuscrito.

A farmacêutica Ivone Nunes Lyra, bolsista do RHAÉ-CONCITEC, pelo auxílio na obtenção de fotomicrografias das experiências de protoplastificação e incansável acompanhamento nas tarefas de compilação de dados e documentação desta tese.

A farmacêutica-bioquímica Christine Krawiec Fontana, do LACEN - FSCMR pelas análises no isolamento e identificação do microblota do suco gástrico objeto desta tese.

Ao Dr. K. G. Johnson, da DBS-NRC, Ottawa, Canadá, pelas análises confirmatórias do perfil hidrolásico.

Ao Prof. Horácio Ferreira Jr., FUEM - PR, pelas fotomicrografias de levedura e seus protoplastos.

A tecnologista Roseli A. P. Rocha pelo auxílio quando das primeiras manipulações com microrganismos.

Aos colegas A. M. Barbosa, A.M. de Souza, A. Nieri Neto, A. Dunaiski, D. Romanó Neto, J. Chociai, M. B. Chociai, M. C. O. Haully, M. Passos, N. P. C. Albuquerque, P. C. Miranda e T. L. Pie, pelo carinho e estímulo nos momentos tanto fáceis, quanto difíceis das caminhadas cotidianas.

A todos Professores e Funcionários do Departamento de

Bioquímica da UFPR pelo convívio nestes anos de tese.

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela permanente atenção e assistência.

Ao Sr. José dos Santos Silva Filho e Sra. Stella Elias da Silva por terem partilhado seu lar comigo, em Curitiba.

A Universidade Estadual de Maringá, seus dirigentes e colegas de docência que me proporcionaram as condições para a realização do curso de doutorado.

À CAPES, suporte de uma bolsa de estudos.

Enfim, a todos os que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xxiii
SUMMARY	xxiv
I INTRODUÇÃO	1
Objetivos básicos da tese	5
II MATERIAIS E MÉTODOS	
1 Cultivo em cativeiro	6
2 Coleta de suco gástrico	6
3 Clarificação do suco gástrico	7
4 Desinfecção bacteriana e outras floras mi- crobianas	7
5 Eliminação de micro-metabólitos	8
6 Técnicas gerais	8
7 Determinações espectrofotométricas	10
7.1 Carboidratos totais	10
7.2 Carboidratos redutores	10
7.3 Proteínas	10
8 Métodos cromatográficos	10

8.1	Em papel	10
8.2	Em camada delgada	10
8.3	Em fase gasosa	10
9	Protoplastificação	11
9.1	Fungos e leveduras	11
9.2	Vegetais superiores	12
10	Ensaio padrão para xilanase e outras polis- sacaridasas	13
11	Determinação da atividade de O-acetil-xi- lana-esterase	14
12	Determinação de outras atividades hidrolá- sicas	15

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

1	Captura e Cativeiro para <i>M. paranaguensis</i>	16
2	Isoeletrofocalização	24
3	Microbiota	24
4	Enzimologia aplicada	30
5	Protoplastificação de células e tecidos	32
5.1	Leveduras	32
5.2	Fungos	34
5.3	Tecidos vegetais superiores	45
6	Degradação enzimática de edulcorantes na- turais e artificiais	58
7	Potencial hidrolítico em glicanas naturais ...	70
7.1	Avaliação prévia	70
7.2	Glicanas poliméricas cromogênicas	72
7.3	Glicosídeos cromogênicos simples	75

7.4	Oligossacarídios naturais	76
7.5	Proteínas	78
7.6	Ácidos nucleicos	80
7.7	Lipídios	80
8	Espectroscopia e espectrofotometria de xilanas	82
9	Estrutura fina de heteroxilanas	88
9.1	Fragmentação e análise preliminar	88
9.2	Metodologia para a caracterização das enzimas complementares do complexo xilanolítico: α -(4-O-metil)-D-glucuronidase e β -D-xilobiase (β -D-xilosidase)	95
9.3	Enzimas complementares do complexo xilanolítico: O-acetil-xilana esterase	123
9.4	Enzimas complementares do complexo xilanolítico: ácido ferúlico (ácido p-coumarico) esterases	126
9.5	Sinopse de algumas atividades hidrolásicas do suco gástrico de M. paranaguensis para substratos hemicelulósicos e correlacionados	136
10	α -xilo-D-glucanase	136
11	Hidrólise de substratos contendo D-apiose	145
12	Atividade lipásica de suco gástrico de M. paranaguensis	153
13	Atividades transglicosilantes do suco gástrico de M. paranaguensis	161

IV	CONCLUSÕES	165
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168

LISTA DE TABELAS

01	Características do molusco terrestre Megalobulimus paranaguensis , Pilsbry e Ihering	21
02	Características da secreção (suco) gástrica de M. paranaguensis	22
03	Determinação do conteúdo protéico do suco gástrico de M. paranaguensis	23
04	Individualização celular e protoplastificação de tecido foliar de vegetais superiores por ação do suco gástrico (S-10) de M. paranaguensis	57
05	Perfil hidrolásico preliminar do suco gástrico de M. paranaguensis sobre algumas glicanas naturais ...	71
06	Análise cromatográfica em fase gasosa (GLC) para mono- e dissacarídeos neutros e ácidos resultantes da hidrólise enzimática (suco gástrico de M. paranaguensis) ou ácida trifluoracética de hetero-xilanas	99
07	Estabilidade do complexo xilanásico de suco gástrico de M. paranaguensis em função do tratamento de armazenamento	108
08	Atividade xilanásica do suco gástrico de M. para-	

	naguensis : comparativo das frações obtidas por cromatografia de troca iônica	111
09	Recuperação da atividade xilanásica do suco gástrico de M. paranaguensis após fracionamento protéico com sal ou solvente orgânico	113
10	Monitoramento cromatográfico em fase gasosa (GLC) de derivados sililados de ácidos fenol-carboxílicos liberados pela ação do suco gástrico de M. paranaguensis sobre materiais ligno-hemicelulósicos	135
11	Perfil enzimático do complexo hidrolásico do suco gástrico de M. paranaguensis	137
12	Preparação de xiloglucana bruta de sementes de T. indica	140
13	Propriedades da xiloglucana bruta extraída de sementes de T. indica	141
14	Análise cromatográfica em fase gasosa (GLC) de derivados sililados de D-apiose e outros monossacarídeos liberados de substratos apiosilados naturais por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	154

LISTA DE FIGURAS

01	Manutenção em cativeiro de M. paranaguensis	17
02	Exemplar adulto de M. paranaguensis	18
03	Dissecção de exemplares adultos de M. paranaguensis e exposição de trato digestivo	19
04	Coleta de suco gástrico de M. paranaguensis (sucção a vácuo)	20
05	Isoeletrofocalização do suco gástrico de M. paranaguensis	25
06	Isoeletrofocalização preparativa	26
07	Microbiota isolado de suco gástrico fresco de M. paranaguensis	27
08	Microbiota e xilanolítico de suco gástrico de M. paranaguensis	28
09	Microbiota xilanolítico (cultura de longa duração)	29
10	Provas bioquímicas de diferenciação das cepas xilanolíticas isoladas de suco gástrico de M. paranaguensis	31

11	Enzimologia aplicada: caracterização de um biofilme polissacarídico bacteriano (<i>Acetobacter</i> sp.) através do suco gástrico de <i>M. paranaguensis</i>	33
12	Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (C) (mutante M-300)	35
13	Células (C), Protoplastos (P) e Protoplastos em Ruptura (P(R)) de <i>S. cerevisiae</i> M-300	36
14	Protoplastos (P) de <i>S. cerevisiae</i> M-300	37
15	Células (C), Células em brotamento (Cb) e Pseudohifas (PH) de <i>Torula utilis</i>	38
16	Células (C), Células em brotamento (Cb) e Protoplastos (P) de <i>Torula utilis</i>	39
17	Células (C) e Células em brotamento (Cb) de <i>Pichia stipitis</i>	40
18	Protoplastos (P) de <i>Pichia stipitis</i>	41
19	Hifas (H), Esporos (E), Esporos em coalescência (E(s)), Protoplastos livres (P), Protoplastos em coalescência (P(s)) e Protoplastos em ruptura (P(R)) de <i>Aspergillus niger</i>	42
20	Massa Micelial (M), Protoplastos livres (P) e Protoplasto em processo de liberação (P*) do fungo <i>Tricholoma nudum</i>	43
21	Protoplasto de <i>Dahlia</i> sp.	46

22	Tecido foliar de Stevia rebaudiana em desagregação pela ação do suco gástrico de M. paranaguensis	47
23	Individualização de elementos anatômicos foliares de Stevia rebaudiana por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	49
24	Individualização de elementos anatômicos de Stevia : xilema e cutícula foliar	51
25	Individualização celular (Ci), Esferoplastificação (Esf) (foto A) e Protoplastificação (P) (foto B) de Tecido Foliar de Stevia rebaudiana por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	53
26	Protoplasto livre (P), Protoplasto em coalescência (P(s)), Cloroplastos livres (Cl) ou Associados (CL(s)) de Stevia rebaudiana após longa incubação de tecido foliar com suco gástrico de M. paranaguensis	55
27	Análise cromatográfica em camada delgada dos produtos de desdobramento hidrolítico de edulcorantes naturais glicosilados, por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	61
27A	Estrutura de alguns edulcorantes naturais e sintéticos hidrolizáveis pelo suco gástrico do molusco M. paranaguensis	59
28	Análise cromatográfica em camada delgada (TLC)	

	de edulcorantes naturais de Stevia rebaudiana e seus produtos de hidrólise por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	62
29	Análise eletroforética de alta voltagem em papel dos produtos de enzimólise de edulcorantes naturais de Stevia rebaudiana e Glycyrrhiza glabra por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	64
30	Análise cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise do edulcorante artificial ASPARTAME por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	66
31	Enzimólise do ASPARTAME pelo suco gástrico de M. paranaguensis	67
32	Análise eletroforética de alta voltagem em papel para os produtos de enzimólise do ASPARTAME por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	68
33	Eletroforetograma para produtos de enzimólise de ASPARTAME com o suco gástrico de M. paranaguensis	69
34	Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) da enzimólise de glicanas poliméricas cromogênicas por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	73
35	Análise cromatográfica em camada delgada (TLC)	

	da hidrólise de vários glicosídeos cromogênicos simples por ação do suco gástrico de M. parana- guensis	77
36	Análise Eletroforética da proteólise limitada de albumina bovina por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	79
37	Espectrofotometria de xilana	84
38	Análise espectral da reação cromogênica entre xilanas de diversas fontes e o reagente iodo /iodetado em cloreto de cálcio saturado	85
39	Zimograma para xilanase	87
39A	Estrutura parcial esquematizada para heteroxi- lana acídica de angiosperma	89
40	Etapas seqüenciais na preparação de heteroxila- nas ácidas e seus derivados acídicos mono- e oligossacarídicos	91
41	Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) para os mono- e oligossacarídios componentes da glicofitobiomassa do tipo (lig- no)-hemicelulósica: desenho de uma mistura sol- vente de alta resolução	92
41A	Cromatograma em camada delgada (TLC) para mono- e oligossacarídios neutros e ácidos de hidróli- se de heteroxilana	93
42	Resolução eletroforética de alta voltagem em	

	papel para os principais mono- e oligossacarí- dios neutros e ácidos resultantes da hidrólise ácida ou enzimática de fitobiomassa lig- no-hemicelulósica	94
43	Cromatografia em fase gasosa (GLC) ilustrativa da resolução de mono- e dissacarídeos neutros e ácidos de fração hemicelulósica de fitobiomassa ..	97
43A	GLC (complemento da fig. 43)	98
44	Análise cromatográfica em fase gasosa (GLC) pa- ra caracterização do componente ácido da hete- roxilana de caule de <i>Larix</i> sp. liberado pela ação do suco gástrico de <i>M. paranaguensis</i>	101
45	Cromatografia gás-líquido (GLC) (A) e caracte- rização por espectrometria de massa (GLC-MS) do ácido (4-O-Metil)-D-glucurônico liberado de he- teroxilana de <i>Larix</i> sp. por ação do suco gás- trico de <i>M. paranaguensis</i>	102
46	Identificação dos monossacarídeos ácidos e neu- tros da hidrólise enzimática de xilana de <i>Mimo- sa scabrella</i> com suco gástrico de <i>M. parana- guensis</i> mediante cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	103
47	Resolução dos componentes da digestão de farelo de trigo com enzimas do suco gástrico de <i>M. pa- ranaguensis</i> por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	105

48	Cromatograma de camada delgada (TLC): diferenciação entre os Sistemas xilanolíticos do suco gástrico de M. paranaguensis (S-10) e dos Meios de Cultivo de Streptomyces sp* induzido por substratos ligno-hemicelulósicos	106
48A	Diferenciação dos complexos xilanolíticos do suco gástrico de M. paranaguensis e Streptomyces sp.; Detecção do componente α -(4-O-Metil)-D-glucuronidase e atividade de xilosidase (S-10)	107
49	Comprovação da linearidade da reação hidrolítica de xilana pelo componente α -(4-O-Metil)-D-glucuronidase presente no suco gástrico de M. paranaguensis	116
50	Detecção de isoenzimas para a atividade α -(4-O-Metil)-D-glucuronidase do complexo xilanolítico do suco gástrico de M. paranaguensis através de eletroforetograma em papel	117
51	Eletroforetograma de alta voltagem em papel: produtos de hidrólise de glicanas ácidas por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	119
52	Cromatograma em papel: produtos de hidrólise de glicanas ácidas por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	120
53	Eletroforetograma de alta voltagem em papel: análise da atividade de	

	α -(4-O-Metil)-D-glucuronidase após fracionamento do suco gástrico de M. paranaguensis por Troca iônica e sais	121
54	Cromatograma em camada delgada: atividade xilânica após fracionamento do suco gástrico de M. paranaguensis por cromatografia de troca iônica (DEAE ⁻ , CM ⁻), precipitação com sulfato de amônio (SA) ou acetona (A)	122
55	Cromatograma em fase gasosa (GLC) dos produtos (sem derivatização) da cinética de tempo de hidrólise (desesterificação) de xilana de Larix sp. (quimicamente re-O-acetilada) por ação do suco gástrico de M. paranaguensis (S-10)	124
56	Reprodução de cromatograma em camada delgada (TLC) da desesterificação do padrão sintético de D-xilose-(1,2,3,4-tetra-O-Acetato por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	125
57	Estrutura do FA(X): um oligossacarídeo-limite da hemicelulólise exaustiva de heteroxilana de bagaço de cana por ação de celulase fúngica (Celluclast®)	127
58	Estrutura de alguns ácidos fenol-Carboxílicos que esterificam a cadeia polissacarídica de glicanas pécticas e hemicelulósicas	128
59	Cromatograma em fase gasosa (GLC) de silyl-derivados dos padrões de ácidos fe-	

	nol-carboxílicos p-coumárico e ferúlico	130
59A	GLC de silil-derivados: "Blank" de enzima de M. paranaguensis	131
59B	GLC de silil-derivados da fração solúvel em metanol anidro após digestão exaustiva de bagaço de cana com celulase fúngica (Celluclast®) = pró-FAX	132
59C	GLC de silil-derivados da reação de pró-FAX com suco gástrico de M. paranaguensis : atividades de p-coumaroil e feruloil-esterases	133
59D	GLC de silil-derivados da reação de bagaço de cana nativo com suco gástrico de M. paranaguensis : ação moderada de p-coumaroil e feruloil-esterases	134
60	Estrutura parcial de xiloglucana	138
61	Filtração molecular em gel do suco gástrico de M. paranaguensis (S-10) e monitoramento da atividade de α -D-xilo- β -D-glucanase (XGTase)	142
62	Cromatograma em camada delgada (TLC): produtos da hidrólise exaustiva de xiloglucana de tamarindo pelo componente α -D-xilo- β -D-glucanase do suco gástrico de M. paranaguensis (S-10)	143
63	Cromatograma (TLC) do perfil de atividades α -xilo- β -glucanase ou β -glucanase no suco gástrico de M. paranaguensis e suas frações de	

	filtração em biogel P-60	144
64	Cromatograma em camada delgada (TLC): monitoramento da atividade de α -xilo- β -glucanase em diferentes frações derivadas de suco gástrico de M. paranaguensis	146
65	Estrutura da apiina	148
66	Cromatograma em camada delgada (TLC) da hidrólise ácida (TFA) ou enzimática (S-10) de substratos naturais apiosilados	149
67	Cromatograma em camada delgada (TLC): reforço à evidência de uma atividade do tipo D-apio-hidrolase no suco gástrico de M. paranaguensis	151
68	Cromatograma em fase gasosa (GLC) de silil-derivados do padrão de D-apiose	152
68A	GLC de silil-derivados: "Blank" de suco gástrico de M. paranaguensis	156
68B	GLC de silil-derivados: "Blank" de substrato = apiopectina (PS-6)	157
68C	GLC de silil-derivados dos produtos de hidrólise de (β)-D-apiosil- α -D-galacturonana (apiopectina) por ação do suco gástrico de M. paranaguensis	158
68D	GLC de silil-derivados: "Blank" de Celluclast®	

	+ Pectinase	159
68E	GLC de silil-derivados dos produtos de hidrólise de (β)-D-apiosil- α -D-galacturonana (apiopectina) por ação da mistura de enzimas: celulase + pectinase	160
69	Cromatograma em camada delgada (TLC) da ação de lipases do suco gástrico de M. paranaguensis sobre fosfolipídios brutos de semente de soja	162
70	Monitoramento cromatográfico em camada delgada (TLC) de possíveis atividades transglucosilantes do suco gástrico de M. paranaguensis	164

RESUMO

O suco gástrico do molusco terrestre **Megalobulimus paranaguensis** (Pilsbry & Ihering) é uma solução de alta e heterogênea concentração protéica (aproximadamente 140 mg proteínas totais/ml; 35 bandas protéicas visíveis por isoeletrofocallização).

Várias atividades hidrolásicas estão presentes; a maior parte delas facilmente detectáveis quando se utilizam substratos polissacarídicos estruturalmente correlatos com as glicanas naturalmente presentes na arquitetura da parede celular de leveduras, fungos e vegetais superiores (β -glucanas), heteroxilanas, celulose, pectinas). Assim, o suco digestivo deste caracol se constitui em ferramenta útil na esferoplastificação destes tipos de células e tecidos. Igualmente, são hidrolizáveis algumas glicanas de reserva (amido e correlatos) e glicosídeos naturais (sacarose e outros fruto-glicosídeos) ou artificiais (substratos cromogênicos de pentoses e hexoses).

O suco presta-se, ademais, à cisão da ligação glucosídica e uronosídica de edulcorantes naturais (esteviosídeo e glicirrizina, respectivamente) bem como à quebra das ligações amida e metil-éster de um edulcorante artificial (aspartame).

Em função do perfil enzimático acima sumarizado, o suco gástrico de **Megalobulimus paranaguensis** se constitui, pois, numa ferramenta de amplo espectro para fins de enzimologia aplicada.

SUMMARY

High protein concentration (140 mg/ml) and heterogeneity (35 components resolved on isoelectrofocalization) are two remarkable features for the gastric juice from the snail **Megalobulimus paranaguensis**.

Several hydrolytic activities are detectable when using as substrates the polysaccharides which bear structural resemblance to the natural constituents of yeast, mold, and plant cell wall architecture. Treatment of these cells and tissues with snail juice allows the obtention of the respective espheroplasts/protoplasts. Some reserve glucans (starch-like), natural (sucrose and other fruto-glycosides) and artificial (pentose and hexose derived chromogenic substrates) glycosides are hydrolyzed as well.

The juice also brings out the scission of the glucosidic and uronosidic linkages of natural sweeteners (stevioside and glycyrrhizin, respectively) as well the amide and methyl-ester linkages from an artificial sweetener (aspartame).

The above mentioned enzymatic profile indicates a wide spectrum for the use of **Megalobulimus paranaguensis** snail juice concerning applied enzymology.

I - INTRODUÇÃO

O molusco *Megalobulimus paranaguensis* Pilsbry & Ihering, de porte avantajado e acessível "habitat" natural nos contrafortes da Serra do Mar paranaense (regiões de Antonina e Morretes, entre outras), encontra na flora vegetal local, de pequeno porte a dieta alimentar, cujo aproveitamento integral se dá graças a um variado e complexo equipamento enzimático presente na secreção digestiva (suco gástrico). Este complexo encerra, entre outras, as enzimas do tipo hidrolase para a depolimerização dos polissacarídeos comuns e compulsoriamente presentes a nível de parede celular e citoplasma das células vegetais: celulose, hemicelulose, pectinas e outras glicanas; amido, bem como carboidratos mais simples como a sacarose (FONTANA, FEIJÓ & DUARTE, 1976).

A polivalência enzimática digestiva deste tipo de animais invertebrados, com características anatômicas e fisiológicas exacerbadas para as peças do aparelho digestivo (gástrica, hepatopancreática), é objeto de exploração comercial muito bem consolidada, como exemplificado pelos produtos "Glusulase" (da NEN Research Products - Du Pont) e "Cytohelicase" (da IBF/LKB Produkter AB), ambos obtidos a partir do caracol de jardim europeu ou *Helix pomatia*. Aplicações correntes para estes produtos são a lise seletiva de parede celular de leveduras e a hidrólise de esteróides sulfatados (WEIRICH, 1986).

De fato, tão significativa chega a ser a atividade de algumas destas enzimas, que algumas preparações passam a ser denominadas em função desta propriedade: algumas "helicases" são diretamente supridas como mistura de β -glucuronidase e sulfatase, como no caso dos produtos Sigma (variando de dezenas até milhares de unidades/mg de sólidos), preparadas a partir de *Patella vulgata* (molusco marinho) e também do mesmo *Helix*.

Não existe, todavia, provedor nacional deste tipo de insumo da maior utilidade para a investigação de ordem básica (e.g., degradação enzimática até monômeros para fim composicional de polissacarídeos ou sua estrutura fina através de análise de fragmentação parcial) ou mesmo biotecnológica (protoplastificação de leveduras e fungos para fins de hibridização e estirpes melhoradas de interesse econômico). No recentemente implementado Programa Nacional para Insumos Básicos em Ciência e Tecnologia (CNPq/PADCT, 1984) uma iniciativa isolada nesta direção logrou o apoio institucional e a presente tese abriga-se centro da referida iniciativa, somando esforços de duas unidades universitárias paranaenses: o Laboratório de Química/Biotecnologia de Biomassa (Departamento de Bioquímica da UFPR) e o Departamento de Bioquímica FUEM - Maringá. Preparações preliminares de suco gástrico de *M. paranaguensis* (simples clarificação centrifugacional) já resultaram em insumo valioso na protoplastificação de leveduras de interesse vinícola pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul - RS (CARRAU, 1986).

A antes referida polivalência enzimática e as semelhanças existentes na composição do envoltório natural (TAYLOR & CAMERON, 1973; DOW & RUBERY, 1977; GORDON et al., 1977), tanto

de células mais simples (leveduras, fungos, algas), quanto vegetais superiores - todas envolvendo uma arquitetura maiormente de natureza polissacarídica - explicam a possibilidade de aplicação de ditas preparações enzimáticas também na obtenção de "células nuas" de vegetais superiores ou seja esferoplastos e protoplastos (HOLDEN, PIRIE & TRACEY, 1950; FOWKE & CONSTABEL, 1985), insumos de valor aos fins da engenharia genética. O mesmo material atende também a objetivos específicos e de mais difícil obtenção por outros métodos, tais como: preparação de membranas (HALL & TAYLOR, 1979), componentes celulares e organelas como cloroplastos e mitocôndrias (NISHIMURA, GRAHAM & AKAZAWA, 1976) em condições suaves de lise ou seja com alta preservação de estrutura nativa. Planta transgênica, mediante a inserção de DNA de outras fontes (HOLL et alii, 1974), é outro avanço tecnológico que pode ser mediado por protoplastos vegetais, por sua vez resultantes de manipulação de tecidos vegetais com enzimas de molusco ou fúngicas.

J. H. Duarte nucleou no ex-Instituto de Bioquímica da UFPR (a partir de 1964) linha de pesquisa na bioquímica de carboidratos de reserva de **M. paranaguensis** e outros moluscos. Os interessantes resultados acumulados com o envolvimento de colaboradores (DUARTE, 1985) continuam ensejando até a data, ramificações de interesse tanto de ordem de pesquisa básica (e.g., lectinas), quanto de ordem aplicada (e.g., potencial hidrolásico do suco gástrico, objeto desta tese).

Particularmente quanto a depolimerização de parede celular de fungos ou sua protoplastificação, a preparação gástrica de **M. paranaguensis** já se prestou a estudos de aprofundamento do conhecimento bioquímico de caracterização de esta-

dos nutricionais e morfológicos de **Picnoporus cinnabarinus** (CURY, 1974), taxonomia de um fungo produtor de galactose oxidase (KEMMELMEIER, 1976), melhor conhecimento bioquímico de **Neurospora crassa** (FONTANA, 1980; FONTANA & TORRES, 1981; FONTANA & GEBARA, 1986) e liberação de protoplastos de **Dactylium dendroides** (AMARAL; KUBICKI & TEREZI, 1983).

No tocante à estrutura fina de polissacarídeos componentes da fitobiomassa ligno(hemi)celulósica, outra linha tradicional do Departamento de Bioquímica da UFPR - a de hemiceluloses de leguminosas, nucleada por J.B. CORREA e col., experimentando progressiva expansão - beneficiou-se do uso da mesma preparação enzimática de **Megalobulimus paranaguensis** para a obtenção de fragmentos neutros e ácidos da 4-O-metil-glucuroxilana do caule de **Mimosa scabrella** (bracatinga) (GANTER, 1988; SIERAKOWSKI, 1988).

O amplo espectro de biomoléculas passíveis de modificação hidrolítica pela ação do equipamento enzimático variado presente no suco gástrico de moluscos e particularmente naquele de **Megalobulimus paranaguensis** exclui, por sua heterogeneidade e amplitude, uma abordagem mesmo que superficial que contemple todo este grupo de substâncias, razão pela qual estas substâncias naturais ou sintéticas serão abordadas, na medida da necessidade (III - Resultados & Discussão, nesta tese).

O presente trabalho de doutoramento foi concebido como um enfoque de natureza centrada em Enzimologia Básica e Aplicada, no qual pudesse contemplar a investigação do potencial hidrolásico do suco gástrico do molusco **Megalobulimus paranaguensis** e alguns objetivos dirigidos foram estabelecidos na direção do domínio do cultivo do gastrópode, da qualificação

desta preparação enzimática e seus usos na Bioquímica de Carboidratos:

- 1) Cultivo do animal em cativeiro;
- 2) Propriedades e preservação da preparação enzimática;
- 3) Protoplastificação de leveduras, fungos e vegetais superiores;
- 4) Degradação de edulcorantes alternativos e de uso contemporâneo;
- 5) Caracterização detalhada do complexo xilanolítico, incluídas as hidrolases de processamento de detalhes finos da estrutura: α -(4-O-Metil)-D-Glucuronidase, O-acetil-D-Xilana Esterase e Fenolcarboxil-Esterases;
- 6) Polissacaridasas para outras glicanas acídicas (apiopectina) e neutras (xiloglucana) e monossacaridasas;
- 7) Estabelecimento de metodologias adequadas à compreensão estrutural de componentes de natureza glicídica da fito-biomassa.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 CULTIVO EM CATIVEIRO

Exemplares adultos (2 incursões/ano; coleta em média de uma centena de exemplares) foram capturados nas cercanias dos municípios paranaenses de Morretes e Antonina. Transportados até o local de trabalho, a maior parte foi distribuída nos compartimentos de um viveiro de alvenaria (exemplares adultos e jovens, em separado), recoberto com telagem metálica para circulação de ar e insolação, esta evitada nos períodos de verão pleno mediante a cobertura do viveiro com chapas de papelão. A cada 2 dias, proveu-se alimentação farta de verduras (alface, repolho, espinafre) suplementada com folhagens locais (chuchu, hortelã, erva-doce, etc.) e farinha de casca de ovo (essencial como suplemento de cálcio, necessário na época de ovideposição).

2 COLETA DE SUCO GÁSTRICO

Periodicamente, separaram-se lotes de cerca de 50 animais, escolhidos entre os mais desenvolvidos (dimensões da concha), submetendo-os à lavagem (remoção de terra, dado o hábito de se enterrarem para fins de abrigo do excesso de sol, hibernação e ou tempo de ovideposição), e a uma dieta reforça-

da por 2 a 3 dias, seguido de jejum absoluto nas 24 horas seguintes. Seguiu-se a ruptura mecânica da casca para exposição das partes moles totais. Com auxílio de instrumentos cirúrgicos simples (pinças e tesouras), procedeu-se à exposição final da peça estomacal e com auxílio de agulha hipodérmica (conectada a mangueira e linha de vácuo) fez-se a punção estomacal e coleta de suco gástrico, recebido em recipiente em banho de gelo.

3 CLARIFICAÇÃO DO SUCO GÁSTRICO

Foi procedida mediante centrifugação a 5 krpm em centrífuga refrigerada Sorval RC-5 (rotor JA-20), descartando-se o precipitado, exceto pequena alíquota do mesmo, esta destinada ao isolamento de microbiota. O sobrenadante clarificado (livre de restos celulares, parte da flora microbiana mais densa) foi mantido em banho de gelo, congelado a -18°C ou liofilizado, até o momento de uso e dependendo do objetivo experimental.

4 DESINFECÇÃO BACTERIANA E OUTRAS FLORAS MICROBIANAS

O procedimento mais efetivo, embora tedioso e custoso, com vistas à eliminação da flora natural (necessariamente requerendo eliminação prévia em experimentos como os de protoplastificação) requereu a diluição do suco nativo da ordem de 3 a 4 X, seguindo-se ultra-filtração por cartuchos Millex-GV (0.22 micra; Millipore).

5 ELIMINAÇÃO DE MICRO-METABÓLITOS

Dada a natureza da dieta usual (riquíssima em carboidratos), a maioria dos usos em estudos de outros carboidratos (e.g., ensaios de depolimerização enzimática) exigiu a redução do teor de carboidratos livres presentes no suco, o que rapidamente se logrou por filtração em Bio Gel P-2 ou Sephadex G-25 ($V_t = 50$ ml; dimensões 7,5 x 4 cm), tomando-se como preparação final a faixa de eluição em torno de V_0 para cada coluna.

6 TÉCNICAS GERAIS

As medições de pH foram realizadas a temperatura ambiente em aparelho Micronal, modelo B-274, equipado com um microeletrodo. As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em espectrofotômetro Varian-Intralab modelo DMS 80, utilizando-se cubetas de vidro para a faixa visível e de quartzo para a faixa de ultravioleta. O suco gástrico bruto de **M. paranaguensis** foi clarificado em centrífuga Sorvall modelo RC-5, a 10 krpm (equivalendo a cerca de 8.000 x g). Centrifugações de rotina foram feitas em centrífuga clínica da Fanem, modelo Baby II (aproximadamente a 3 krpm). As liofilizações, com prévio congelamento das amostras a -18°C foram feitas em liofilizador da New Brunswick Scientific. As esterilizações de meios de cultivo foram feitas em autoclave Fabbe, a vapor fluente por 30 min ou eventualmente a 1 atm. por 15 min, mantendo-se fonte de carbono e outros suprimentos em frascos separados, cuja mistura dava-se imediatamente antes do uso. Pa-

ra as incubações foram utilizados:

- a) agitador rotatório da New Brunswick, a 110 rpm, 28°C (cultivo de microrganismos);
- b) agitador recíproco (banho Dubnoff), com 60 inversões/minuto, a 30°C (protoplastificação);
- c) banho termostaticado a 40°C, sem agitação, para hidrólise enzimática de substratos;
- d) banho-maria fervente ou estufa regulada a 100°C para hidrólises ácidas. Outras variações contam dos textos das figuras ou tabelas de Resultados e Discussão.

Para as eletroforeses:

- a) de alta voltagem de papel, utilizou-se uma cuba cromatográfica cheia com tetracloreto de carbono ("coolant") onde se submergia o suporte previamente umectado nos tampões indicados;
- b) de baixa voltagem em tiras de acetato de celulose (Cello-gel), recolhendo-se o conjunto em câmara de refrigeração a 5°C;
- c) de isoeletrofocalização, utilizou-se um gradiente contínuo de sacarose de 5 a 40%, a mistura de anfólitos, com pI 3 a 10 e aparelho Pharmacia EPS 500/400 (analítica) ou LKB Bromma 8100 (preparativa).

Como fontes de potencial utilizou-se um equipamento Savant ou Permatron (alta voltagem) ou LKB Bromma 3371E (baixa voltagem). Para o acompanhamento do processo de individualização de células e ou protoplastificação utilizou-se, na rotina, um microscópio ótico comum da Leitz e para o registro de imagens, um microscópio Nikon, equipado com um sistema de fotográfico AFX-II/FX-35. Os demais métodos foram executados como previa-

mente descrito (FONTANA, 1975; GEBARA, 1977 e FONTANA, 1980).

7 DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

7.1 Carboidratos totais: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al.)

7.2 Carboidratos Redutores: reativo cupro-alkalino (SOMOGYI-NELSON).

7.3 Proteínas: cupro-alkalino do biureto (GORNAL), reativo de Folin (LOWRY et al. ou HARTREE et al.), reativo do Coomassie (BRADFORD) e absorvância no ultravioleta ($A_{280\text{nm}}$).

8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

8.1 Em papel: com suporte Whatman nº 1, com os solventes indicados nos textos e revelação com o nitrato de prata (TREVELYAN) ou cloridrato de p-anisidina (DAWSON, 1969).

8.2 Em camada delgada: cromatoplasas de sílica Gel 60 (Merck), reveladas a 105°C após nebulização com orcinol (0,25 g) : ácido sulfúrico (5 ml) : metanol (95 ml).

8.3 Em fase gasosa: utilizando rotineiramente um aparelho CG modelo 37 (fluxo de nitrogênio como gás de arraste a 60 ml/min) ou Varian-Intralab modelo 3300 (pressão de nitrogênio a 30 psi), ambos equipados com detector de ionização de chama. A derivatização dos produtos de reação para a cromatografia de

fase gasosa (GLC) foi procedida da seguinte maneira: para a técnica de sililação, as amostras de mono- e dissacarídeos ou outros componentes de baixo peso molecular, previamente liofilizadas, eram suspensas num volume mínimo de piridina (50 a 100 microlitros) e em seguida adicionadas do reagente contendo hidroxilamina (50 microlitros; para formação de oximas de mono- e dissacarídeos) e depois acrescidas do agente sililante (BSTFA). A cada adição de reagente, seguia-se um aquecimento a 65°C por 30 minutos. O conteúdo da reação de cada amostra era injetado diretamente em coluna com fase estacionária de SE-30 ou OV-17 (metil-siliconas) nas condições indicadas em Resultados e Discussão.

9 PROTOPLASTIFICAÇÃO

9.1 Fungos e leveduras

Os seguintes microrganismos foram objeto de preparação de protoplastos: **Aspergillus niger** (produtor de pectinase, ácido cítrico e glucose-oxidase); **Tricholoma nudum** (produtor de invertase e com transporte preferencial de monossacarídeos para fins de metabolização), como modelos de fungos. **Pichia stipitis**, **Candida shehatae** e **Torula utilis** (fermentadoras de pentoses, úteis na bioconversão a solventes orgânicos e proteína unicelular) e **Saccharomyces cerevisiae** M-300 (mutante natural, hiperprodutora de etanol), como modelos de leveduras. Utilizaram-se culturas de fase exponencial em meio rico: glucose 2 g%, extrato de levedura e malte 0,5% cada e suplemento salino (VOGEL) 0,5 ml%, pH ajustado para 5,5. As células colhidas por centrifugação foram lavadas em água destilada e nu-

ma densidade ótica aproximada de 0,100-0,150 (A_{650nm}), conduzidas à protoplastificação em meio contendo sorbitol 1 M + mercaptoetanol 0,1 g% + suco gástrico previamente clarificado e filtrado por membrana de ultrafiltração numa diluição final de aproximadamente 10 X.

9.2 Vegetais superiores

Tecido foliar jovem (meristema plenamente clorofilado e com morfologia típica já estabelecida para folha) das seguintes espécies foram processados: **Stevia rebaudiana**, **Spinacia oleracea**, **Phaseolus vulgaris**, **Glycine hispida** e **Dhalia sp.**

A cutícula subaxial foi removida com auxílio de lâmina de barbear e ou bisturi e em seguida o tecido foliar foi lavado com etanol 70% (1 minuto), água destilada estéril, para finalmente ser cortado em segmentos de cerca 1 a 2 mm². Este material fragmentado era lavado 2 X com água destilada, seguida de manitol 0,4 M para remoção de células rompidas, clorofila livre e outros componentes solubilizados. A suspensão residual de tecido foliar fragmentado era então tratada com manitol 0,4 + ditiotreitol 0,1 M + cloreto de cálcio 0,1 M + suco gástrico diluído 10 X (concentração final). Eventualmente, preparação celulásica fúngica (Celluclast®, Novo Industry) numa relação 1 : 10 (referida àquela de suco gástrico de **M. paranaguensis**) era incluída. Em alguns experimentos de mais longa duração incluía-se também Benomyl e penicilina S/estrep-tomicina (20 a 60 microgramas/ml de meio hiperosmótico) como inibidores de ascomicetos e bacteriostáticos, respectivamente.

Alíquotas de cerca de 50 microlitros de cada suspensão, incubadas a 30°C com agitação suave (banho de Dubnoff, cerca

de 30 inversões/minuto) eram removidas periodicamente, submetidas à microscopia ótica comum e examinadas sucessivamente com objetivas de 4, 10 e 40 X, combinadas a uma ocular de 10 X. Os resultados foram documentados com filme a cores, sensibilidade de 200 ASA. Eventualmente, a mistura de tecido residual, células individualizadas, esferoplastos, protoplastos, organelas e outros componentes celulares ou anatômicos liberados pela ação hidrolítica do suco sobre as paredes celulares ou mesmo por lise celular final, era depositada sobre um gradiente com camadas sobrepostas de cloreto de céσιο saturado, sacarose 60% e sacarose 30% para um fracionamento parcial, ocorrendo então a formação espontânea de bandas para cada população, determinada pela respectiva densidade. Como controle da desagregação e ou protoplastificação, células de fungos ou leveduras e tecidos triturados eram, submetidos a idêntico tratamento, exceto pela omissão das enzimas hidrolíticas. A pectinase de *A. niger* foi também utilizada, em alguns experimentos, como elemento de comparação, dada sua maior especificidade para a lamela média de junção dos elementos celulares de cada tecido vegetal.

10 ENSAIO PADRÃO PARA XILANASE E OUTRAS POLISSACARIDASES

Salvo indicação em contrário, o ensaio padrão para medida de xilanase e outras enzimas hidrolíticas foi conduzido num volume final de 0,5 ml contendo: substrato (1 a 2 mg a partir de soluções-estoque de 5 a 20 mg/ml dependendo da solubilidade), tampão acetato sódico 50 mM pH 5,5 e 5 a 20 microlitros de suco gástrico de *M. paranaguensis*. Eventualmente,

outras preparações enzimáticas (Celluclast; Pectinase e outras enzimas fúngicas) substituíram a enzima referencial de caramelo. As incubações foram efetuadas em banho a 40°C (com agitação para os substratos insolúveis como SolkaFloc, farelo de trigo, etc.) seguindo-se inativação por adição de 2 a 3 volumes de metanol gelado (precipitação da matéria proteica ou polissacarídica residual; no caso de amostragem para análises cromatográficas ou eletroforéticas) ou por rápida imersão do tubo de ensaio em banho congelador (gelo + cloreto de sódio + acetona; no caso de interesse de posterior liofilização) ou ainda pela adição do reativo alcalino de Somogyi (caso de determinação espectrofotométrica de poder redutor liberado). Estas técnicas foram por vezes aplicadas simultaneamente a diferentes alíquotas dos incubados. Em algumas determinações especiais (e.g., liberação de ácidos fenol-carboxílicos de substratos ligno-hemicelulósicos) procedeu-se à prévia extração com os solventes indicados (acetato de etila), uma vez ocorrida a partição de fases.

11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE O-ACETIL-XILANA-ESTERASE

Utilizou-se como substrato (condições do ensaio padrão, exceto pelo tampão: agora citrato-fosfato 50 mM pH 6,5) a hetero-xilana de *Larix* sp. (lariço) (JOHNSON et al., 1988). Procedida a inativação por fervura, alíquotas de cada ensaio foram diretamente injetadas, sem prévia derivatização, em coluna de Porapak Q, operada isotermicamente na faixa de 170 a 180°C em cromatógrafo.

12 DETERMINAÇÃO DE OUTRAS ATIVIDADES HIDROLÁSICAS

Para a determinação de outras hidrolases (e.g., apiose-hidrolase, xilo-glucanase, etc.) as condições vão apontadas nos respectivos resultados (figuras e tabelas).

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 CAPTURA E CATIVEIRO PARA *Megalobulimus paranaguensis*

As fotos de 1 a 4 documentam as condições de manutenção dos animais em cativeiro e sua manipulação com vistas à obtenção do insumo principal para a realização da presente tese. No período de 4 anos, foram observadas pelo menos 3 ovodeposições significativas (uma delas permitindo a coleta de cerca de 30 ovos (ver capa deste documento), indicando que, providas as condições ideais de alimentação, abrigo e proteção de predadores (principalmente formigas), o caramujo completa o ciclo biológico em cativeiro e, pelo menos parte dos ovos eclodidos alcança a maturidade. Em reforço à documentação fotográfica, na tabela 1 e 2 aparecem os dados característicos do animal e ovos, os quais são convincentes para a conveniência da exploração de *Megalobulimus paranaguensis* como alternativa válida à *Helix* sp. para a provisão de enzimas hidrolíticas de interesse científico e tecnológico. Na tabela 3, nota-se que o elevado teor proteico característico do suco gástrico (140 mg/ml = 14 g%), aliado ao razoável volume que se pode obter de cada animal (tab. 2) torna-se efetivamente atrativo e economicamente rentável a exploração do suco gástrico deste caracol.

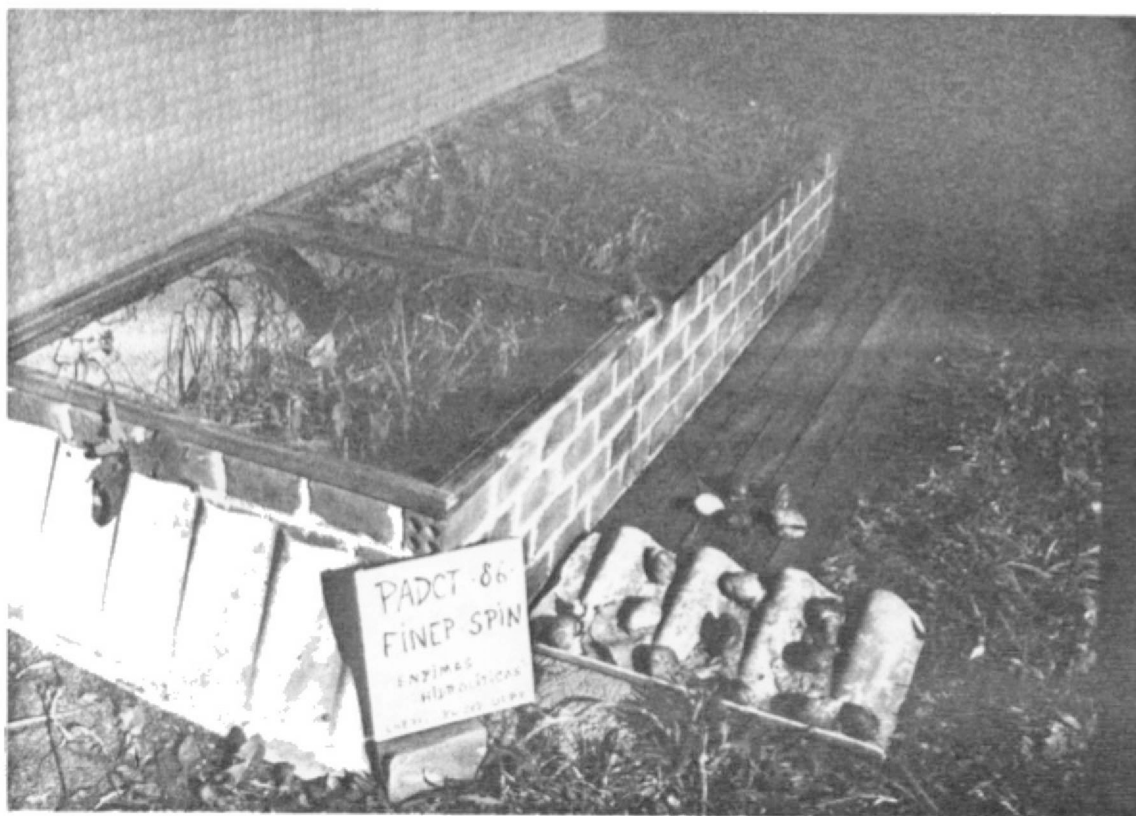


Figura 1. Manutenção em cativeiro de *M. paranaguensis*

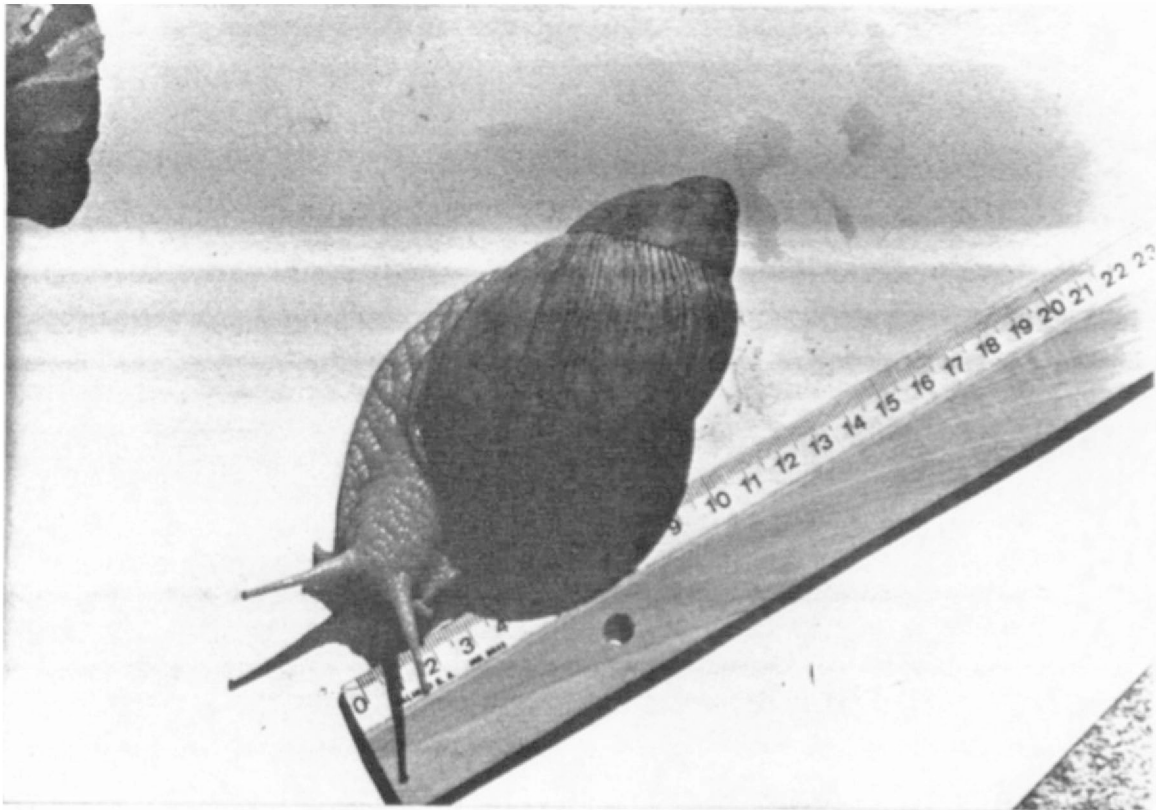


Figura 2. Exemplar adulto de *M. paranaguensis*



Figura 3. Dissecção de exemplares adultos de *M. paranaguensis* e exposição do trato digestivo.

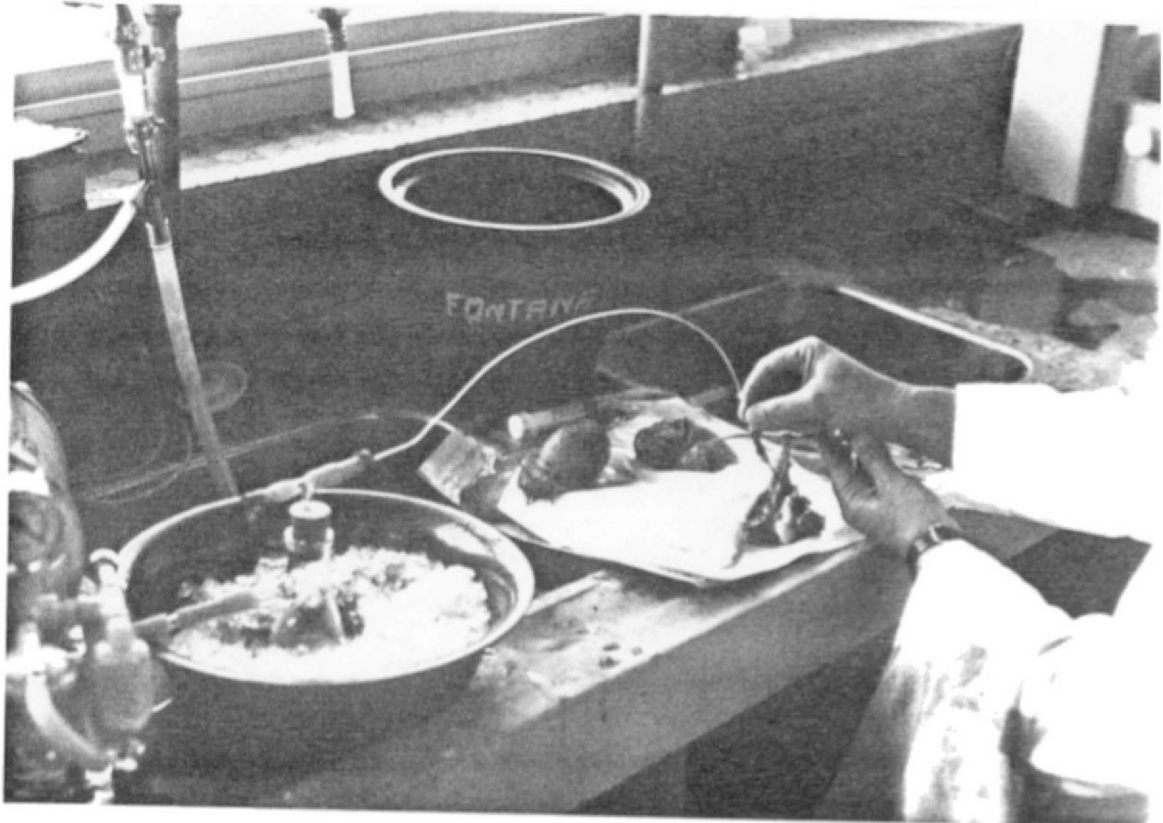


Figura 4. Coleta do suco gástrico de *M. paranaguensis*
(sucção a vácuo)

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DO MOLUSCO TERRESTRE *M. paranaguensis**

ESPÉCIME	DIMENSÕES MÉDIAS (cm) (comprim. x largura)	PESO MÉDIO (g)
1. OVO**	2,6 x 2,0	2,7 - 3,5
2. ANIMAL		
2.1 Recém eclodido**	3,1 x 1,9	2,4 - 3,1
2.2 Adulto	15,0 x 6,0	130,0 - 140,0

* Exemplares capturados nos contrafortes da Serra do Mar, adjacentes aos Municípios de Morretes e Antonina, PR.

** Obtidos por reprodução e eclosão em ambiente de cativeiro; terreno adjacente ao Depto. de Bioquímica da UFPR.

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DA SECREÇÃO (SUÇO) GÁSTRICO DE *M. paranaguensis*.

PROPRIEDADE	VALOR
1. Volume médio ¹	3 a 6 mL
2. pH	5,3 a 5,5
3. Cor	marrom escuro
4. Sólidos totais ²	20 a 22 g / 100 mL
5. Densidade ³	1,0836 g / mL
6. Viscosidade ⁴	1.310 cp

¹ por punção gástrica em animais adultos em jejum por 24 h.

² em suco clarificado a 10 krpm por 15 min.

³ método do picnômetro; 25° C.

⁴ viscosímetro de Ostwald; 37,8°C.

TABELA 3. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DO SUCO GÁSTRICO DE *M. parana-guensis*.

MÉTODO	AMOSTRA	mg / ml
BIURETO	Suco nativo ¹	185
	Suco fracionado c/ TCA ²	133
	Suco fracionado c/ Etanol ³	148
LOWRY	Suco nativo ¹	160
	Suco fracionado c/ TCA ²	126
	Suco fracionado c/ Etanol ³	120
HARTREE*	Suco nativo	130
BRADFORD**	Suco nativo	> 200

* modificação do método de Lowry.

** baseado no "binding" entre Coomassie-Blue e proteína.

¹ Secreção gástrica total clarificada a 10 krpm por 15 min.

² Preparação (¹) tratada com 1 vol. de ácido tricloroacético 20 g% a frio, seguindo-se a determinação no precipitado de 3 krpm.

³ Preparação (¹) tratada com 5 vol. de etanol anidro a frio, seguindo-se a determinação no precipitado de 3 krpm.

2 ISOELETRIFOCAIZAÇÃO

Na fig. 5, mostra-se o perfil de isoeletroenfocado da população proteica do suco gástrico de *M. paranaguensis* (gradiente com anfólitos na faixa de pI de 3,1 a 9,9; tingimento do gel de acrilamida com Coomassie Brilliant Blue G). Um mínimo de 33 bandas proteicas aparecem individualizadas. Estreitamento da faixa de anfólitos (e.g., na faixa aniônica) permite a resolução ainda mais afinada, podendo-se aquilatar que o número acima possa converter-se em uma centena de distintos componentes proteicos. Chama a atenção também a distribuição qualitativa dos componentes proteicos entre os dois campos de carga, com concentração mais pendente para população aniônica, na qual, aliás, concentra-se também a pigmentação marrom escura, característica do suco e do próprio tecido hepatopancreático. Esta distribuição de população proteica se constitui num primeiro indício de ocorrência "latb sensu" de sistemas isoenzimáticos para atividades hidrolíticas ou pelo menos de espécies antagonicamente carregadas para a mesma catálise (resultado e discussão que será mais especificamente abordado adiante: xilanases, glucuronidases e xiloglucanases). Na fig. 6 aparece um perfil de isoeletroenfocado preparativo e a coleta de frações para um estudo das atividades hidrolíticas antes mencionadas.

3 MICROBIOTA (FLORA BACTERIANA NATIVA)

Discussão válida é aquela a respeito da significância da contribuição da flora microbiana ao potencial enzimático do

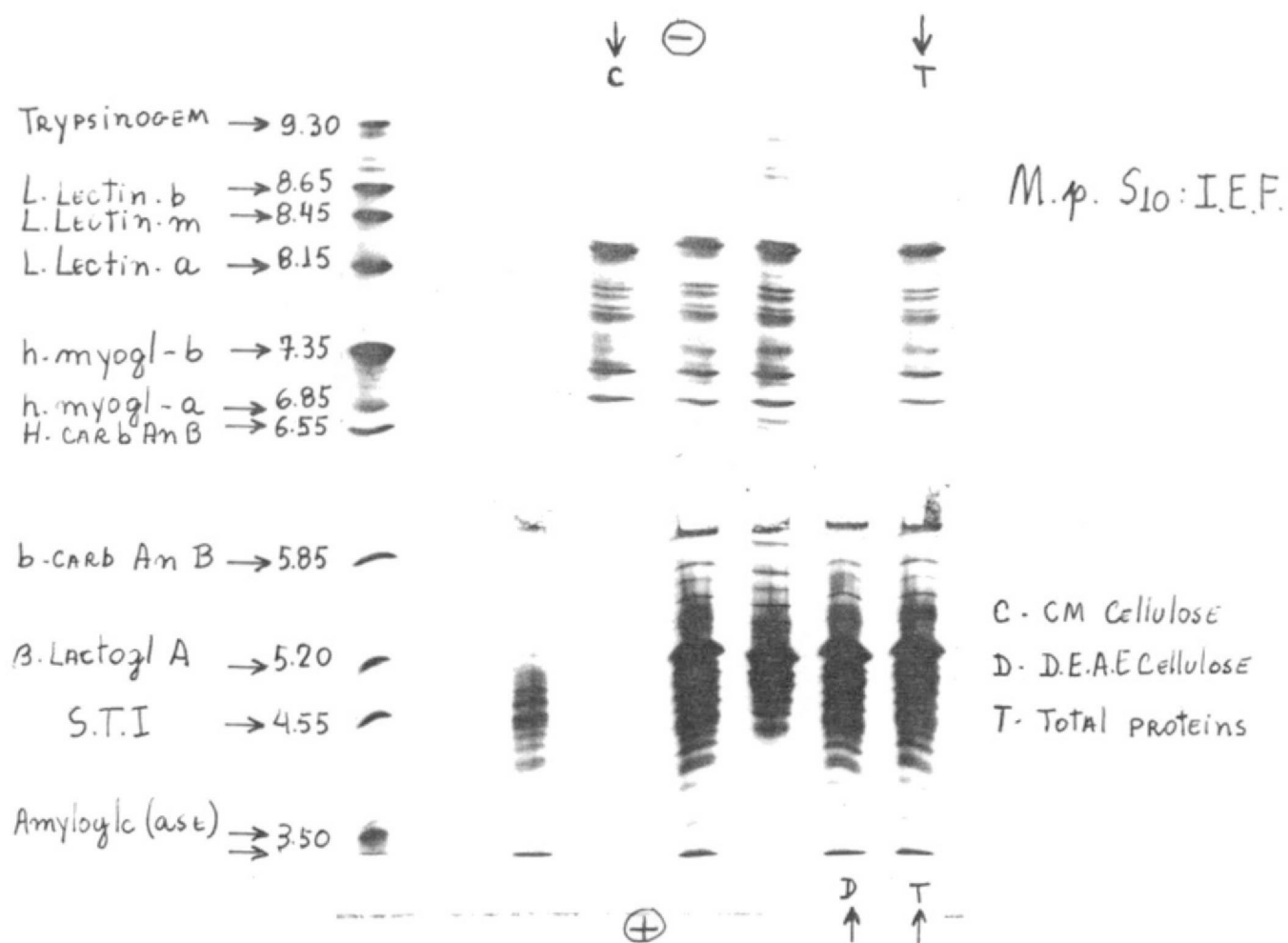


Figura 5. Isoeletrofocalização do suco gástrico de *M. paranaguensis*

Padrões (em ordem decrescente de pI):

trypsinogênio; lectinas básica, média e ácida de lentilha; mioglobinas básica e ácida de cavalo; anidrase carbônica B humana; anidrase carbônica B bovina; beta-lactoglobulina A; inibidor triptico de soja e amiloglucosidase.

Amostras:

T = suco gástrico total
 D = fração ácida retida em DEAE - celulose
 C = fração básica retida em CM - celulose

(Outros detalhes em Materiais e Métodos).

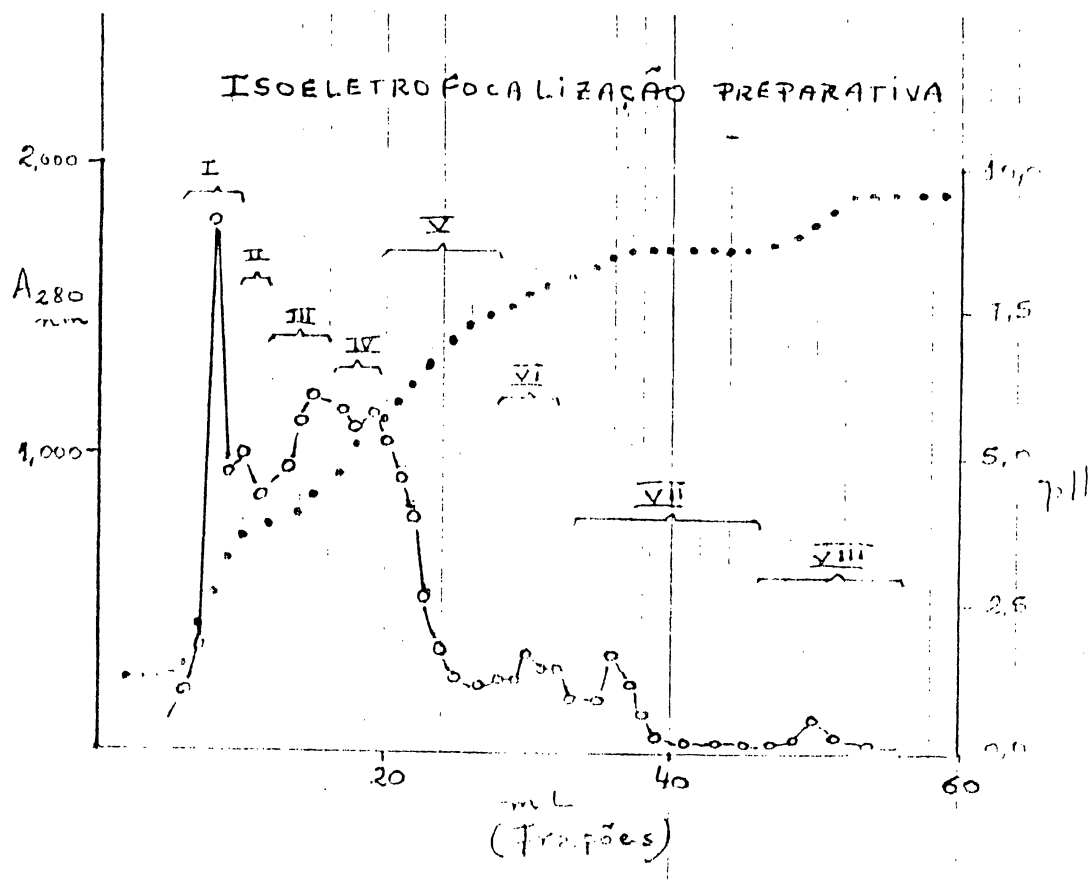


Fig. 6. Isoeletrofocalização preparativa do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(I a VIII são os "pools" de frações tomados separadamente; outros detalhes: Materiais e Métodos).

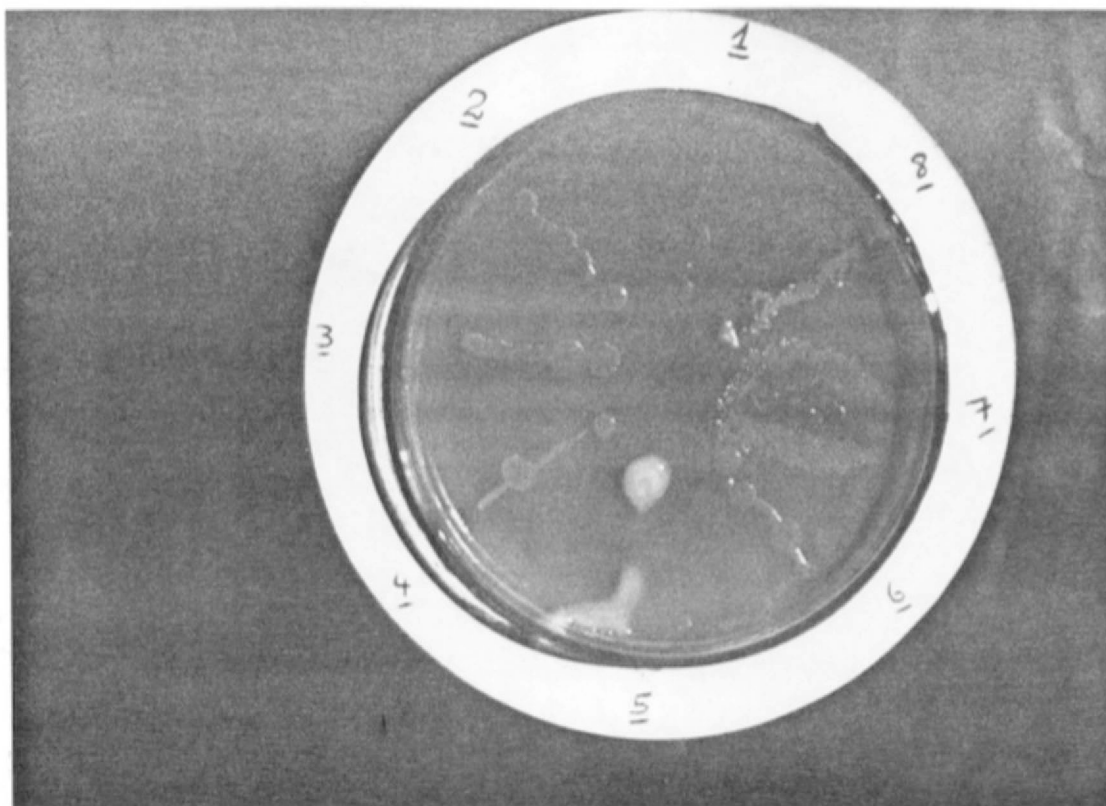


Figura 7. Microbiota isolado de suco gástrico fresco de **M. paranaguensis**. (placa de ágar contendo xilana de **Larix** sp a 1% + extrato de levedura 0,1%; cultura de 48 h a 32°C no LACEN/FSCMP por Christine Krawiec Fontana).

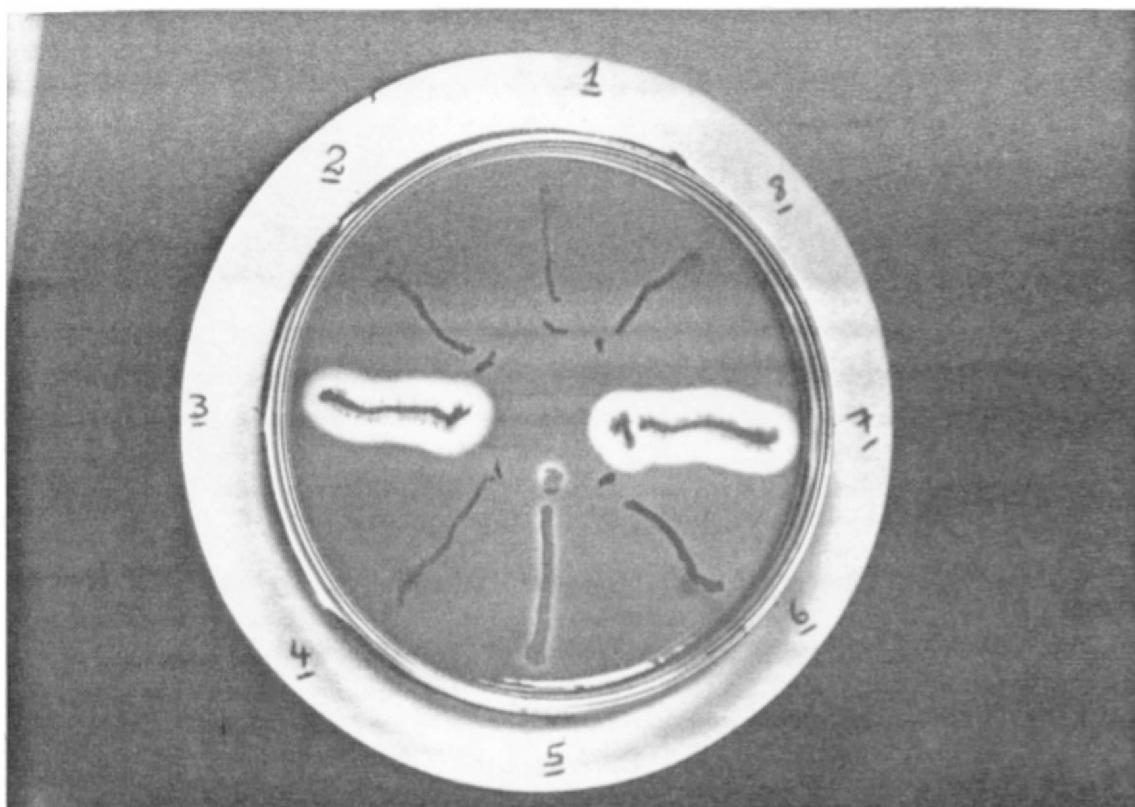


Figura 8. Microbiota xilanolítica de suco gástrico fresco de *M. paraguayensis*. (duplicata da placa da Fig.7; revelado c/ KI-I₂-CaCl₂).

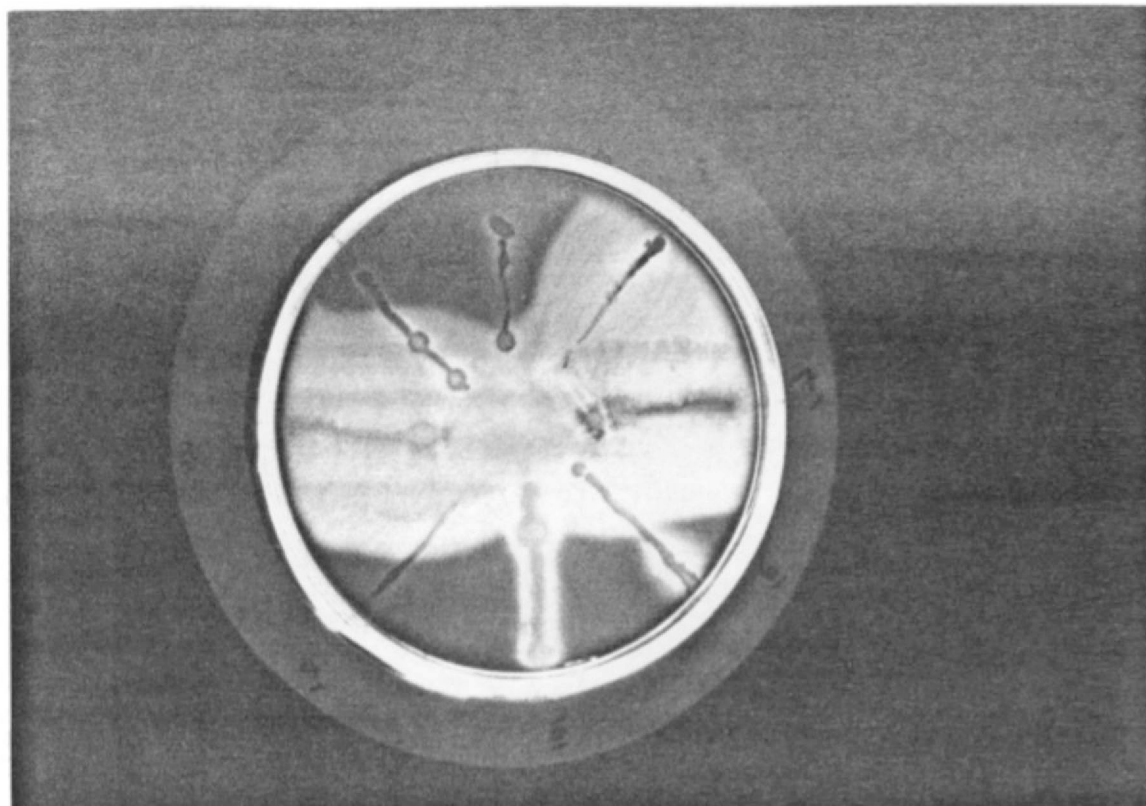


Figura 9. Microbiota xilanolítica de suco gástrico de *M. paranaguensis* (experimento geminado ao da fig. 7, exceto que a cultura foi estendida até 72 h previamente ao coramento da placa com o reativo de KI-I₂-CaCl₂ sat.; halos de xilanólise exacerbados e confirmando a ordem de eficiência xilanolítica decrescente entre os isolados: 7 ≈ 3 >> 5).

suco gástrico de molusco, principalmente no que toca à flora bacteriana. Um procedimento esclarecedor seria a reprodução dos moluscos em condições axênicas, o que está fora dos propósitos presentes e condições materiais existentes. De qualquer modo, da operação de clarificação do suco gástrico por centrifugação ou mesmo do suco bruto pode-se isolar uma variada gama de espécies bacterianas (um perfil destas é o da fig.7), das quais algumas são francamente xilanolíticas (figs. 8 e 9), as duas mais potentes, diferenciáveis entre si, por provas bioquímicas de fermentação (fig. 10): a cepa de n^o3, (+) para malato e a cepa de n^o7, (+) para arabinose e uréia. Na transferência para meios líquidos agitados, com xilana de *Larix* sp. como única fonte de C (e suplementados com 1/10 da fonte de C em extrato de levedura ou sais de Vogel), ambas as cepas levam à obtenção de (4 unidades de xilanase/ml de meio de cultivo isento de células. Como este nível secretório situa-se muito aquém daqueles observáveis em fungos hemicelulóticos (BARBOSA e FONTANA, 1989), as cepas bacterianas em tela despertam obviamente menor interesse para fins de processamento tecnológico de xilanas. Esta circunstância, aliada ao fato de que em bactérias a atividade auxiliar de β -xilosidase confina-se intracitoplasmaticamente (OKADA & SHINMYO, M.E. 160) descartaria a utilização de dita flora, exceção a algum possível tipo particular de fermentação, não explorado no presente trabalho.

4 ENZIMOLOGIA APLICADA

Uma das limitações dos complexos celulolíticos fúngicos (e.g., *Trichoderma*) é a paralela inadequação de níveis hidro-

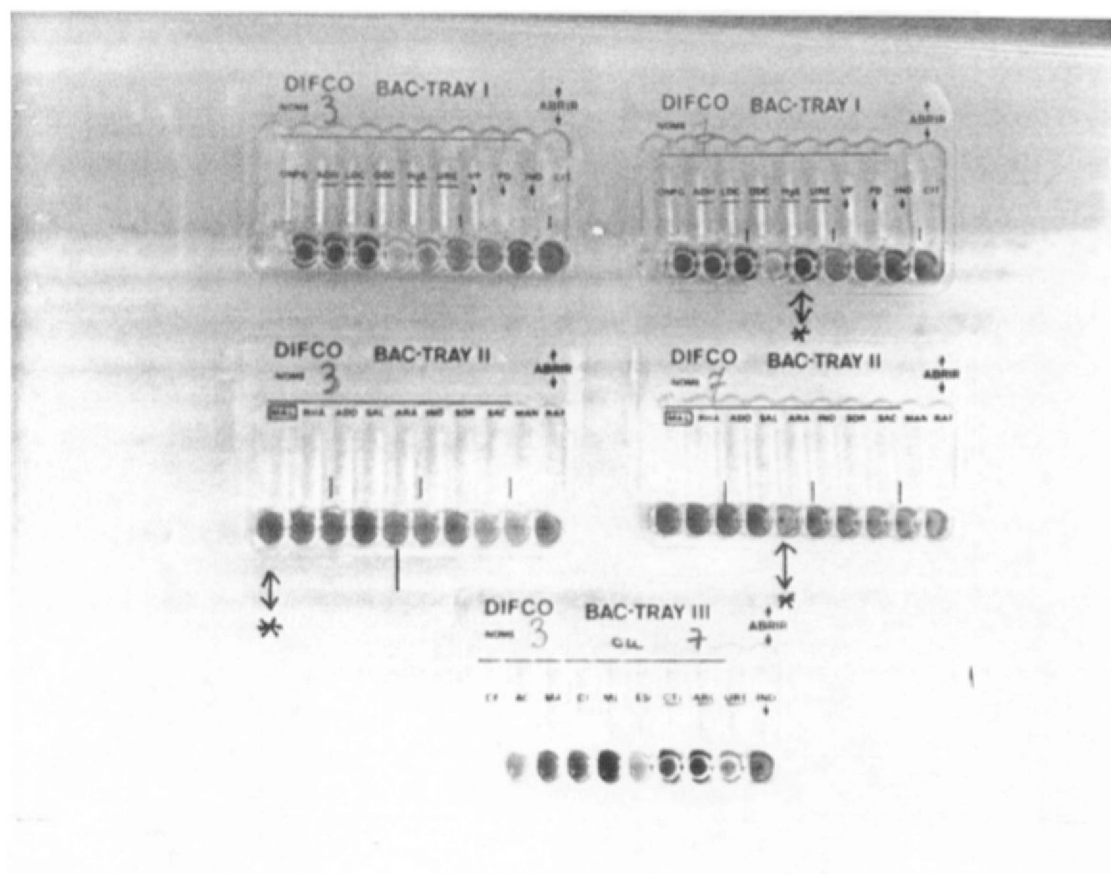


Figura 10. Provas bioquímicas de diferenciação das cepas xilanolíticas isoladas de suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(† = provas diferenciais: uréia, malato e arabinose)

líticos auxiliares (e.g., celobiase ou β -glucosidase), combinada à forte inibição que os produtos mais avançados de hidrólise (=celobiose e glucose) exercem no próprio complexo enzimático das celulases (WOOD & McCREA, 1979). Na fig. 11 é mostrada a ação comparativa de celulases fúngicas (áreas 1-C e 3-BF, respectivamente para as celulases fúngicas da Novo Industry e BioFerm) e aquela presente no suco gástrico de *M. paranaguensis* (2-SJ). O substrato é um biofilme de natureza celulósica produzido por *Acetobacter* sp. (FONTANA et al., 1989), depositado sobre uma camada de ágar e tamponado a pH 4,8 com citrato-fosfato (50 mM.) Nas áreas indicadas foram aplicados (100) microlitros de diluções 1 : 10 de cada preparação enzimática (respectivamente 1,65 , 1,6 e 1,0 mg de proteína total para 1-C, 2-SJ e 3-BF; filtrados recentes de mini-colunas de Bio Gel P-2/P-4) para ação a 37°C durante aproximadamente 12 horas. A área (-) corresponde ao quadrante do biofilme não tratado com enzimas. Em seguida, o biofilme foi umedecido com uma mistura enzimática cromogênica constituída de glucose oxidase/peroxidase/o-dianisidina, com vistas a revelar as áreas em que a degradação enzimática fosse mais completa ou seja, levando à formação do monômero D-glucose. O quadrante superior direito do biofilme mostra que esta situação foi plenamente atingida no caso da celulólise promovida pelo suco gástrico de *M. paranaguensis*.

5 PROTOPLASTIFICAÇÃO DE CÉLULAS E TECIDOS

5.1 Leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* retém no cenário

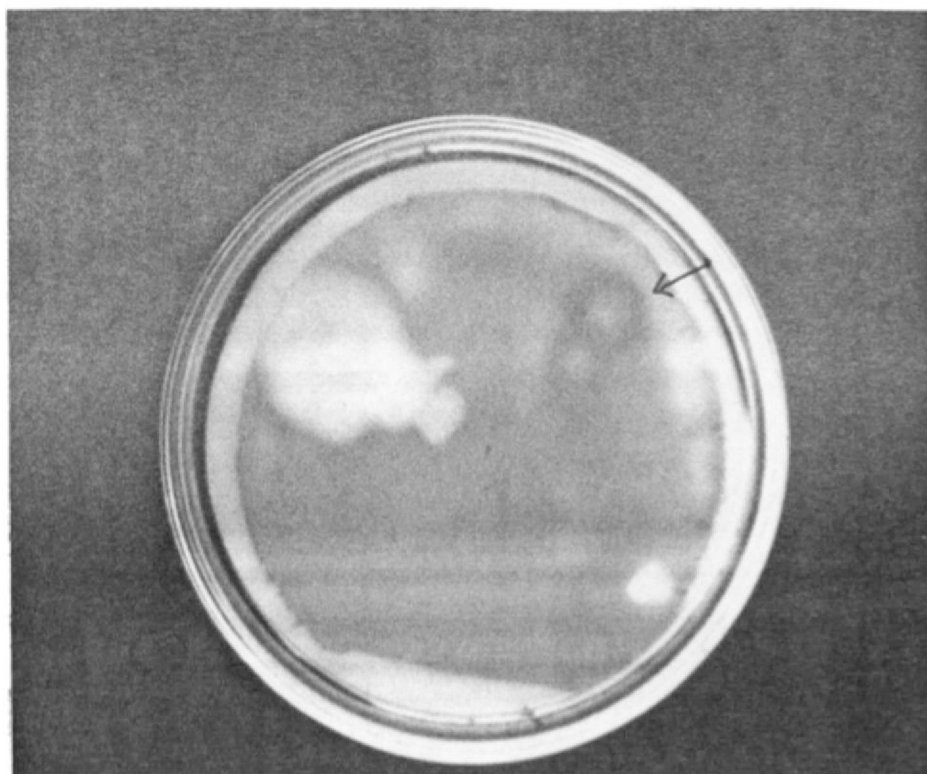


Fig. 11. Enzimologia aplicada: caracterização de um biofilme polissacarídico bacteriano (*Acetobacter* sp.) através do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(o biofilme foi entumescido em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 4,8 e depositado sobre uma placa de ágar. Nas zonas periféricas apontadas foram aplicados 100 μ l de diluições 1:10 das seguintes preparações enzimáticas: 1-C = Celluclast® (Novo. Industri); 2-SJ = suco de *M. paranaguensis* e 3-BF = celulase Bioferm. Após incubação por 12 h a 32°C o biofilme foi irrigado com uma solução pH 8 contendo o "coquetel" glucose-oxidase / peroxidase / o-dianisidina).

(Notar que o sistema enzimático revelador auxiliar aparece marcadamente positivo apenas no setor 2-SJ).

(-) : setor do biofilme sem adição de enzimas celulolíticas.

nacional e internacional importante posição de destaque em funções de seu uso biotecnológico na obtenção de etanol e produtos de panificação. A mutante natural M-300 tem sido aplicada por indústrias canavieiras paulistas em função de melhor desempenho de fermentação de caldo de cana. As figs. 12, 13 e 14 mostram a seqüência da conversão de células desta levedura em protoplastos mediante ação do suco gástrico de **M. paranaguensis**. Ao exame das figs. 15 e 16 (**Torula utilis**) e 17 e 18 (**Pichia stipitis**) comprova-se que a utilidade do suco de caramol presta-se também à protoplastificação de outros vetores biotecnológicos de interesse moderno como leveduras bioconversoras de fitobiomassa C-5 (pentoses) **Torula utilis** (produção de proteína unicelular) e **Pichia stipitis** (produtora de etanol a partir de D-xilose, por sua vez oriunda de hemiceluloses de bagaço de cana).

5.2 Fungos

A população de fungos presta-se ao processamento biotecnológico de vários tipos de alimentos e a obtenção de protoplastos fúngicos é um poderoso instrumento com vistas à obtenção de híbridos com melhor desempenho enzimático ou fermentativo. Como ilustração do potencial do suco gástrico de **M. paranaguensis** nesta direção, as figs. 19 e 20 mostram, respectivamente, a liberação de protoplastos a partir da massa micelial de **Aspergillus niger** (produtor de ácido cítrico; pectinase e glucose-oxidase; (BOSE, 1946) e de **Tricholoma nudum** (fungo micorrízico e com habilidade fermentativa diferencial para hexoses (REUSSER et al., 1960).

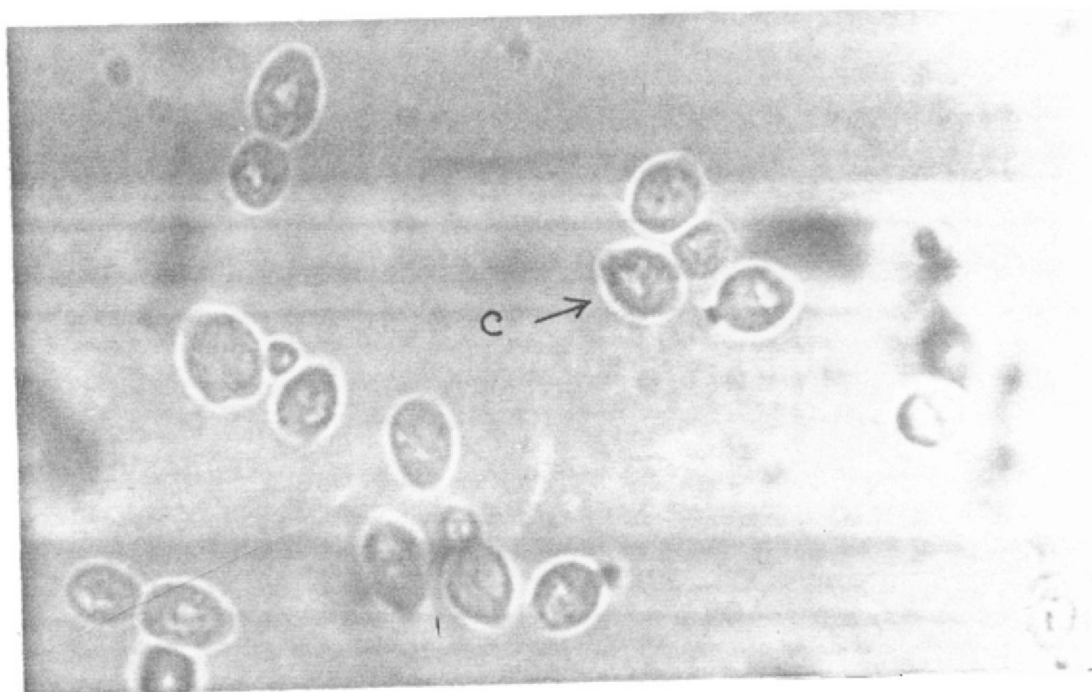


Figura 12. Células (C) de *Saccharomyces cerevisiae* (mutante M-300).

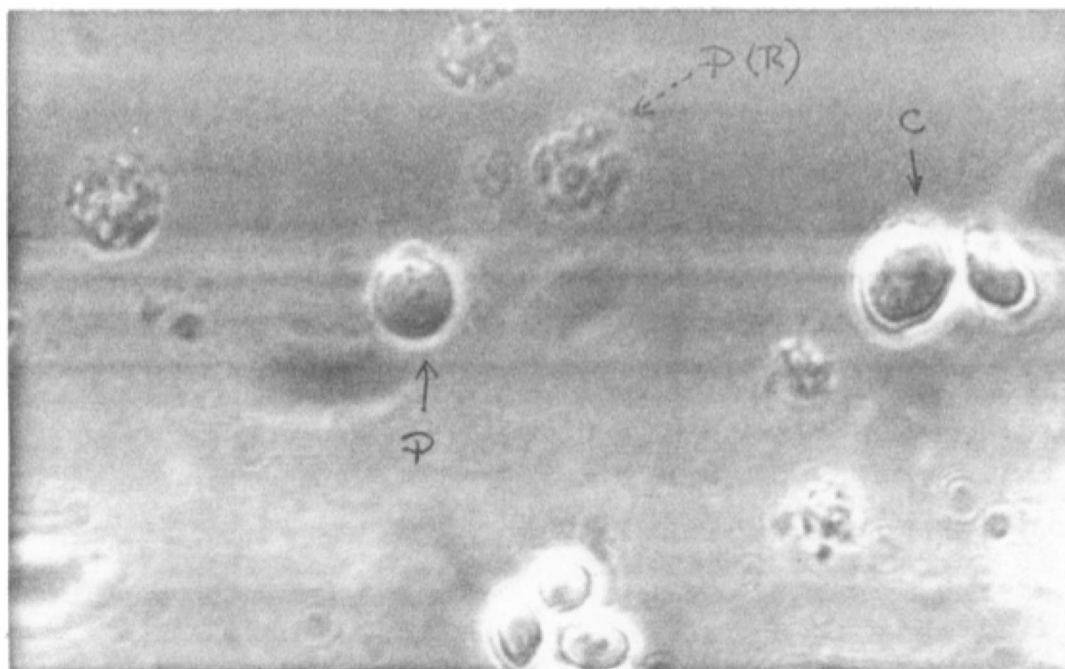


Figura 13. Células (C), Protoplastos (P) e Protoplastos em ruptura (P(R)) de *S. cerevisiae* M-300.

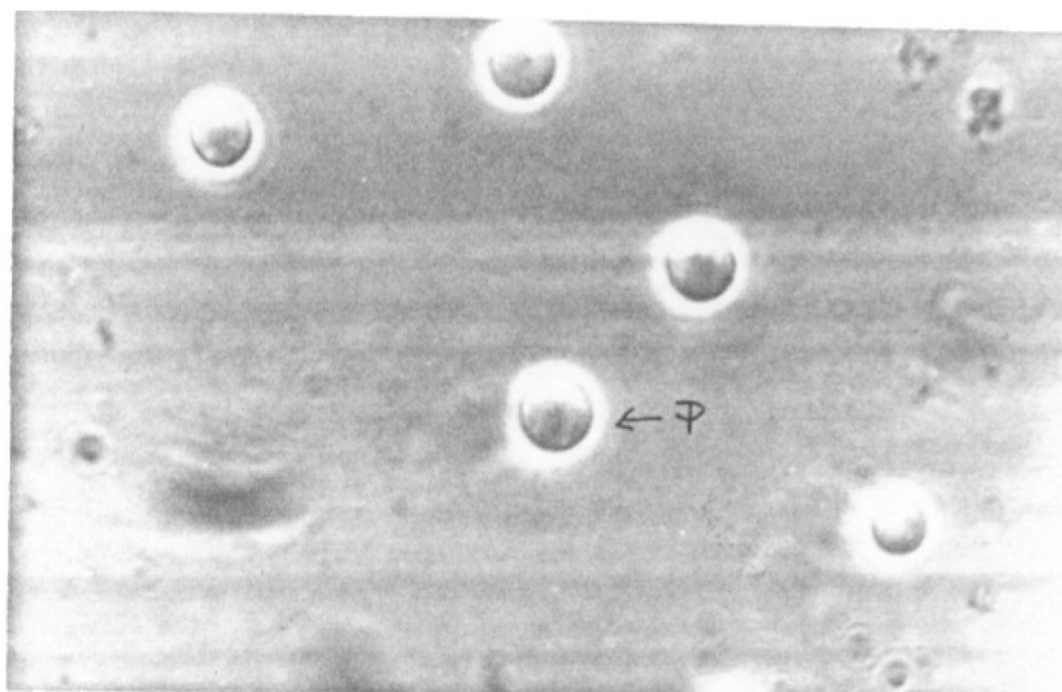


Figura 14. Protoplastos (P) de *S. cerevisiae* M-300.



Figura 15. Células (C), Células em brotamento (Cb) e Pseudohifas (PH) de *Torula utilis* (10 . 40 X).

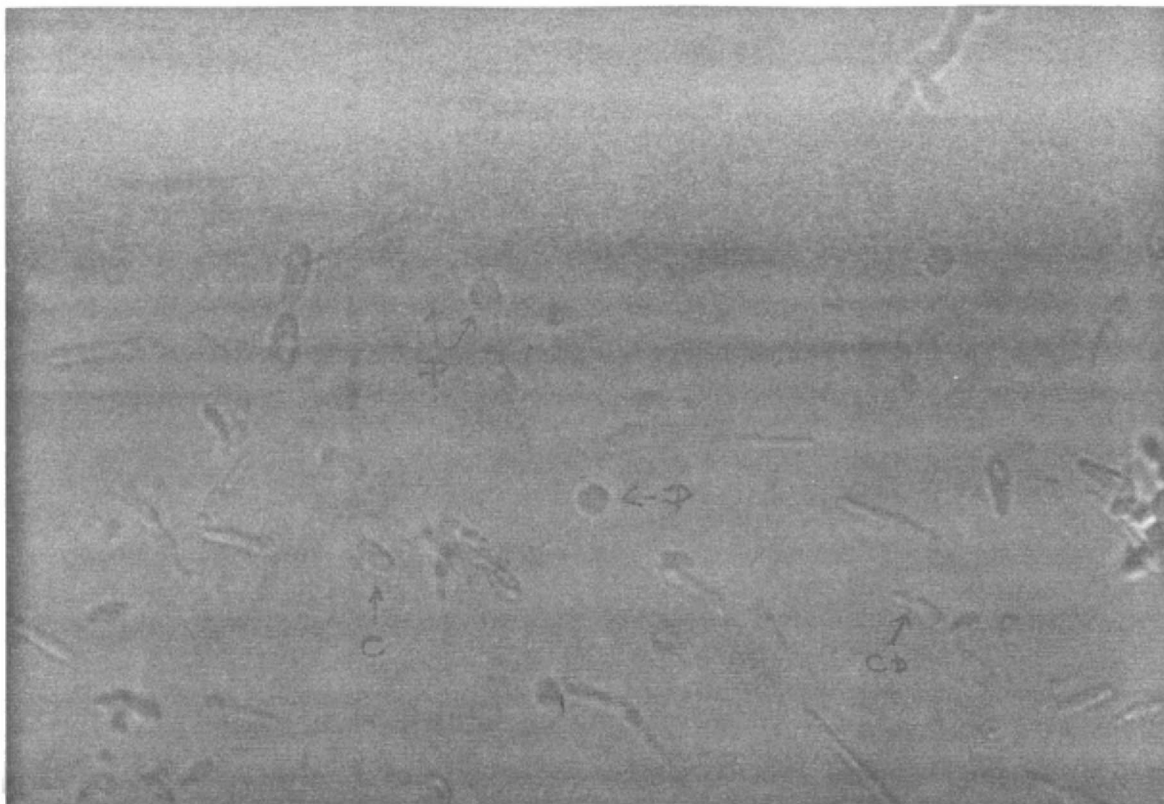


Figura 16. Células (C), Células em brotamento (Cb) e Protoplastos (P) de *Torula utilis* (10 . 40 X).

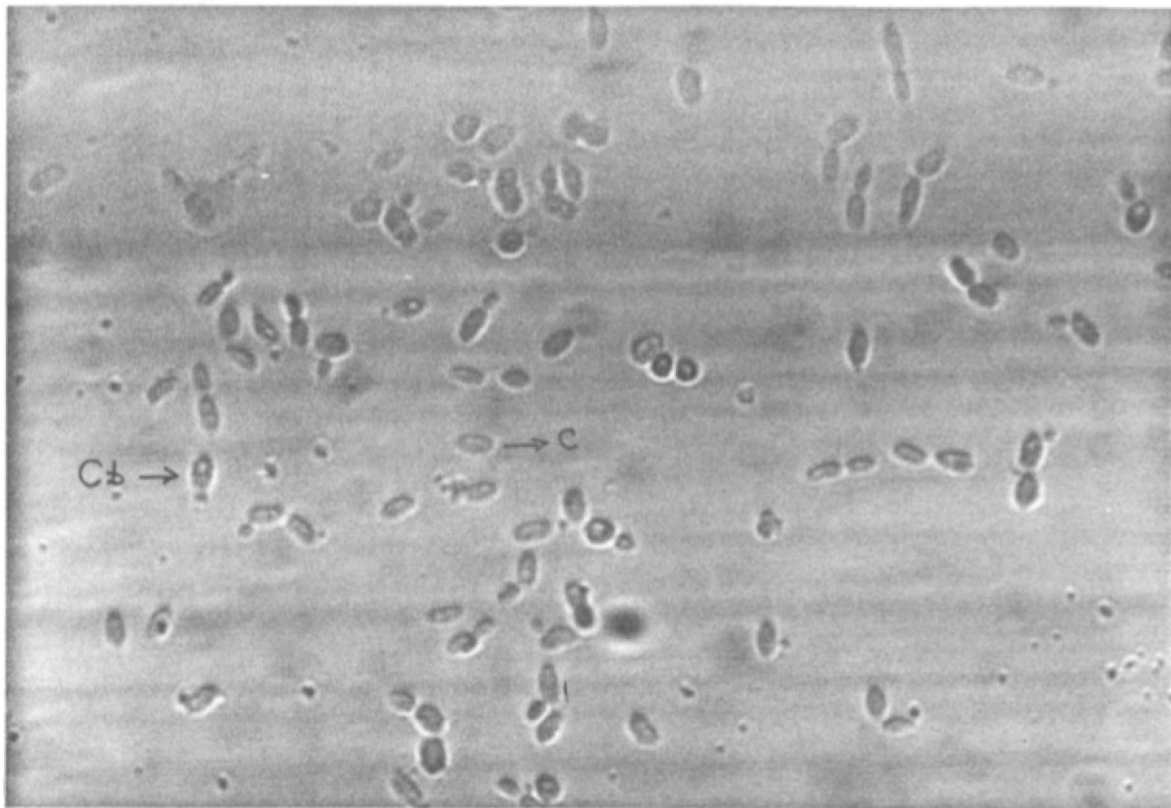


Figura 17. Células (C) e Células em brotamento (Cb) de *Pichia stipitis* (10 . 40 X).

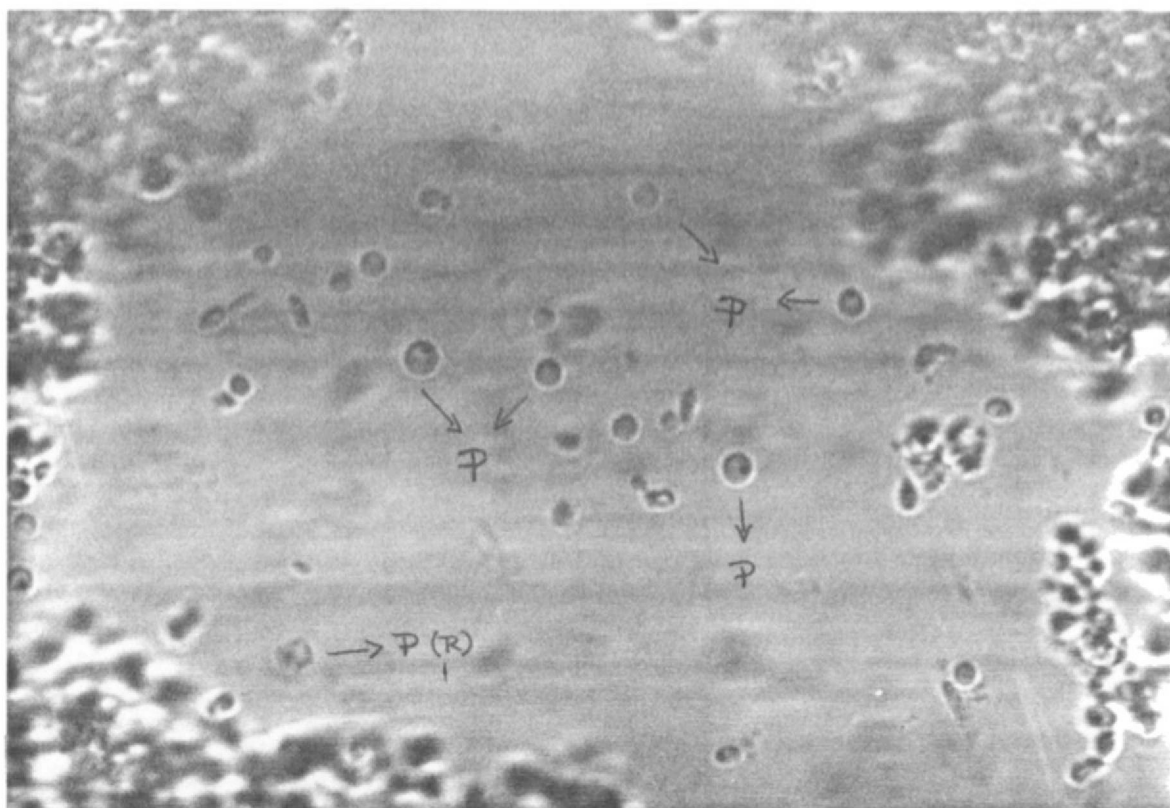


Figura 18. Protoplastos (P) de *Pichia stipitis* (10 . 40 X).

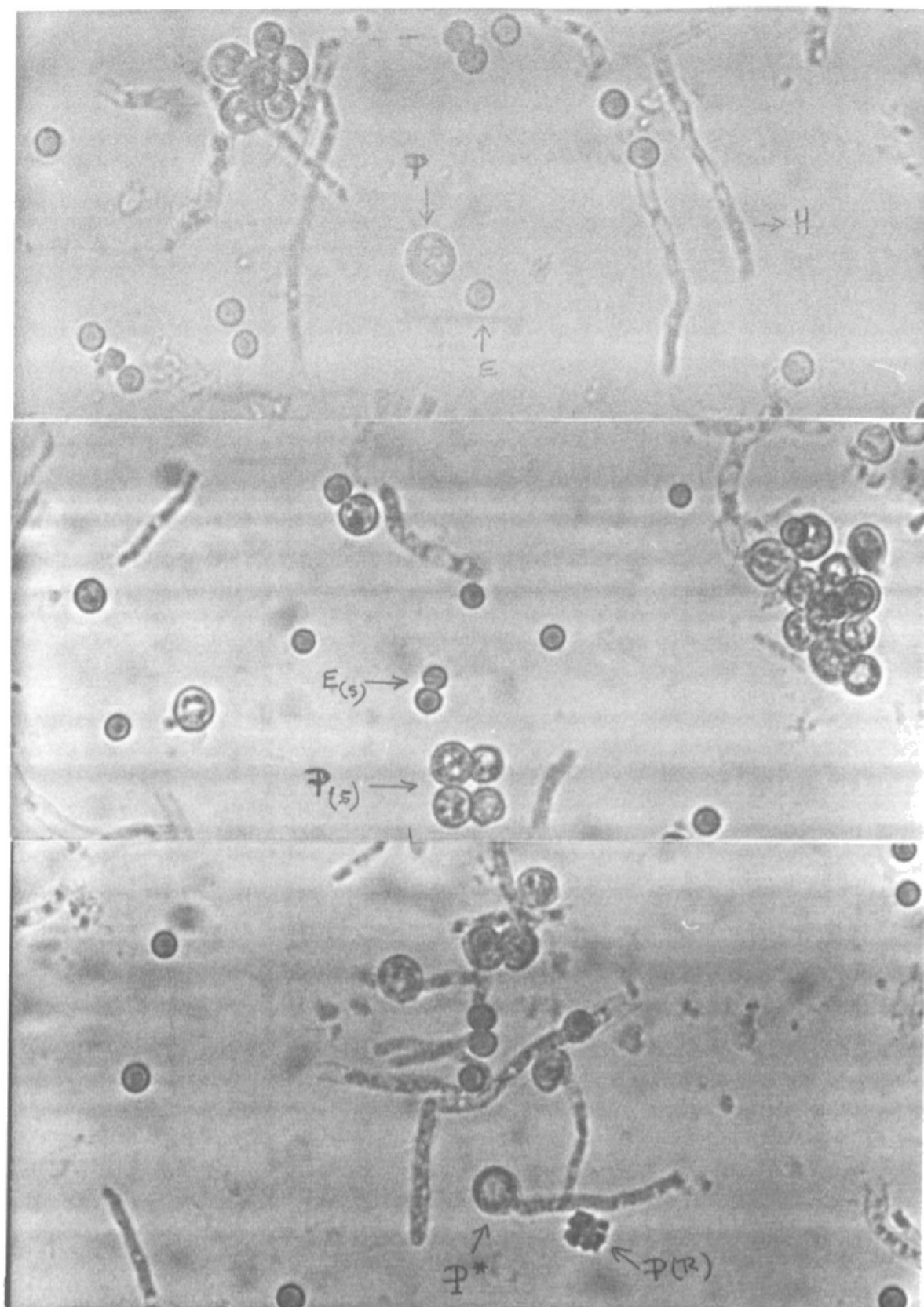
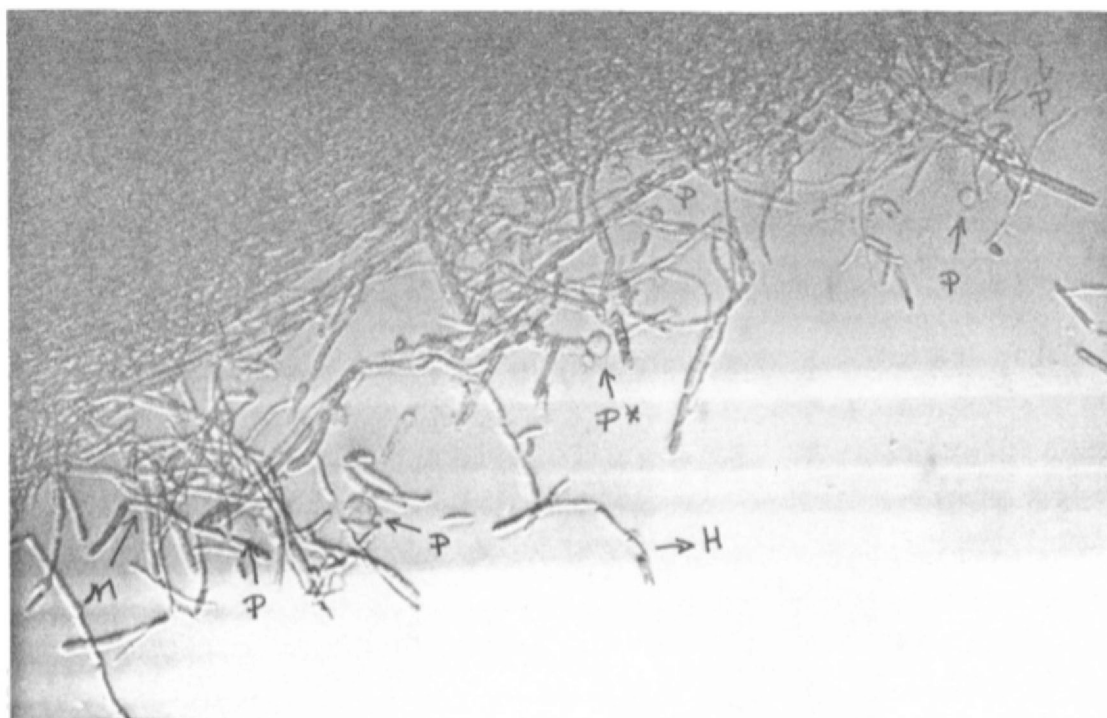


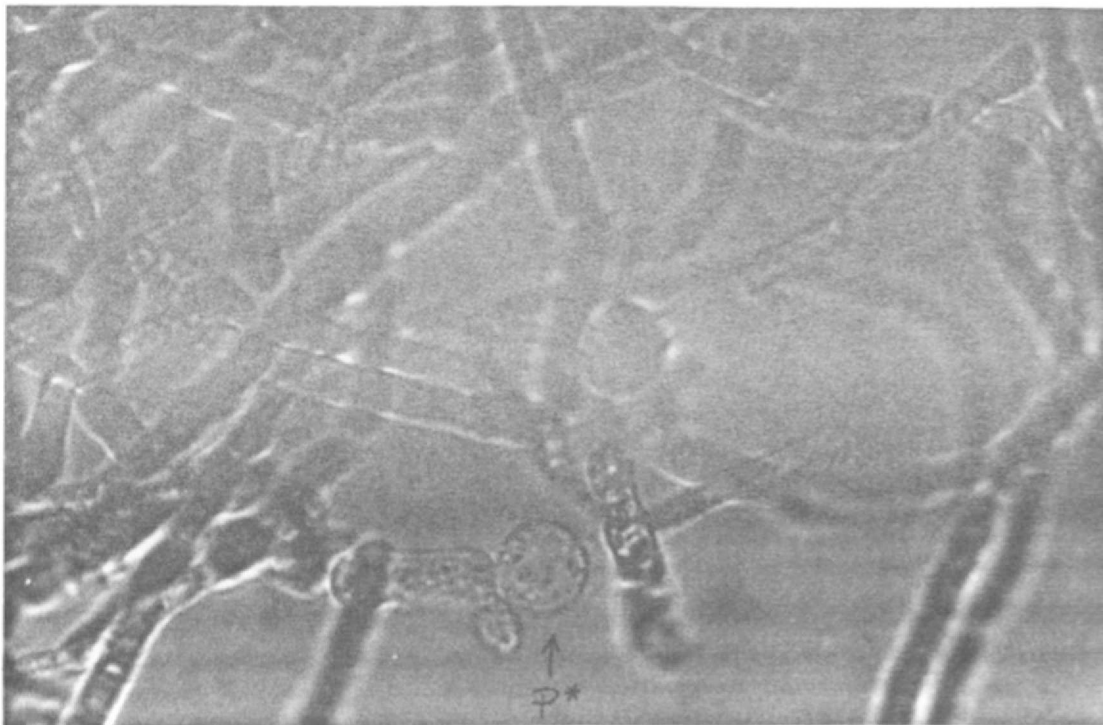
Fig. 19. Hifas (H), Esporos (E), Esporos em coalescência (E(s)), Protoplastos livres (P), Protoplastos em coalescência (P(s)) e Protoplastos em ruptura (P(R)) de *Aspergillus niger* (10 . 40 X).

P* : um protoplasto em processo de liberação.



A - (Panorâmica 10 . 10 X)

Figura 20. Massa micelial (M), Protoplastos livres (P) e Protoplasto em processo de liberação (P*) do fungo *Tricholoma nudum*.



B - (Detalhe 10 . 40 X)

Figura 20. Massa micelial (M), Protoplastos livres (P) e Protoplasto em processo de liberação (P*) do fungo *Tricholoma nudum*.

5.3 Tecidos vegetais superiores

Na moderna indústria de edulcorantes naturais dois tipos de produtos estão assumindo posições de destaque: aqueles à base de D-frutose e assemelhados (SOWDEN, 1957) e os produtos isolados de folhas de *Stevia rebaudiana* (esteviosídeo e rebaudiosídeo). No primeiro caso, o avanço tecnológico norte-americano (ao uso do barateamento de insumos enzimáticos fúngicos e bacterianos proporcionado pela tecnologia japonesa) consagrou o amido de milho, via sacarificação a D-glucose e isomerização parcial desta a D-frutose, como fonte dos HFCS (High Fructose Corn Syrups). Alternativamente, alguns países (entre eles o Canadá) têm trabalhado a "alcachofra de Jerusalém" como fonte alternativa de D-frutose e a partir de substratos poliméricos como a inulina (MCDONALD, 1946). Um modelo vegetal de amplas possibilidades para a provisão de D-frutose em função do crescimento rápido e significativa massa dos tubérculos e a dalia (*Dahlia* sp.) (FONTANA & HAULY, 1989). Uma das maneiras de manipulação deste vegetal com vistas a cultivares hiperprodutores de inulina é a protoplastificação de tecidos foliares, seguida de hibridização ou formação de calos. Na fig. 21 ilustra-se a protoplastificação de tecido foliar de *Dahlia* sp. Com a foto de um protoplasto gigante preservado no meio hiperosmótico de reação (manitol 0,4 M). No tocante ao processamento de *Stevia*, um estudo mais aprofundado foi levado a cabo, mostrando a viabilidade de se atingir, além da protoplastificação propriamente dita (figs. 22-B, 25 e 26), outros objetivos de utilidade didática ou não aplicada, de interesse botânico, tais como: individualização de elementos anatômicos como anéis xilemáticos (figs. 23 e 24-A), estômatos e tricomas

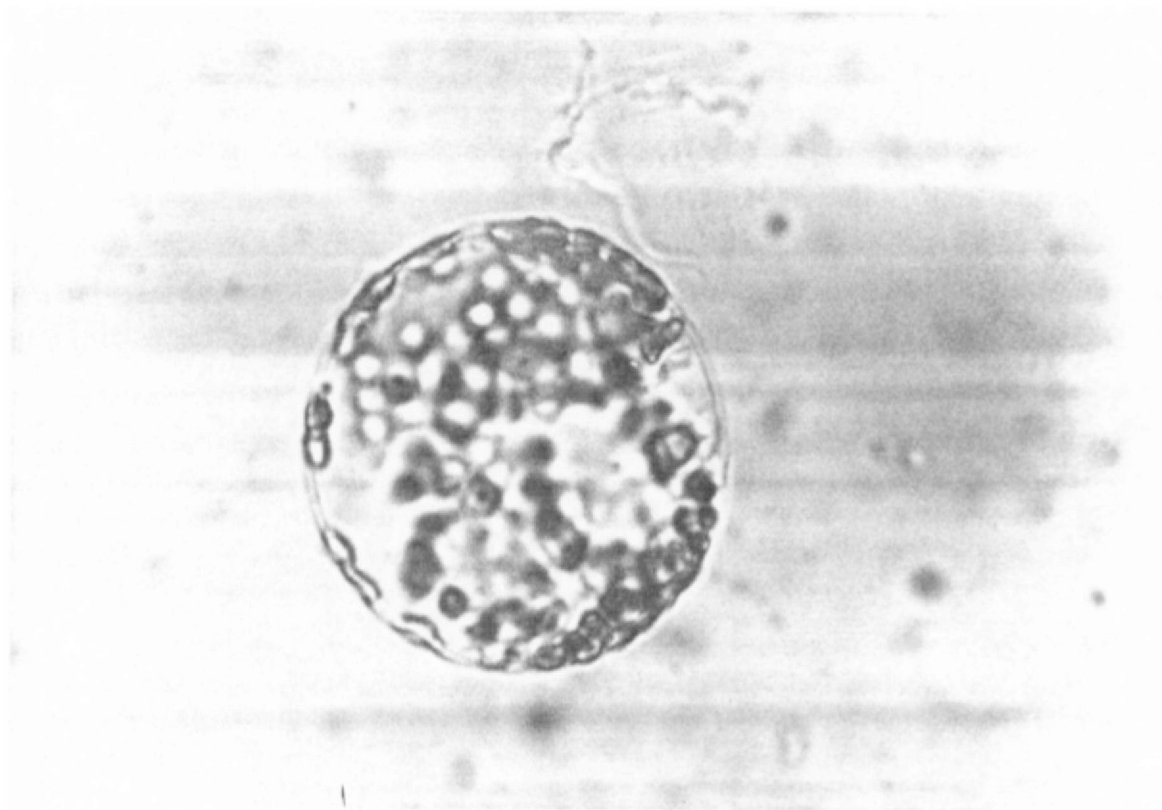
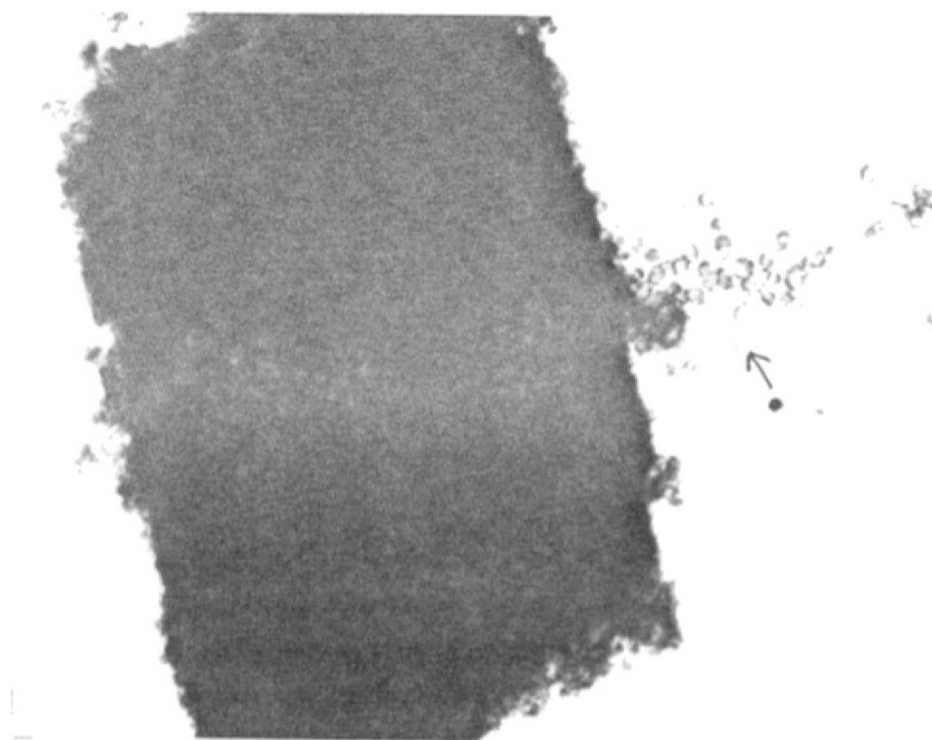
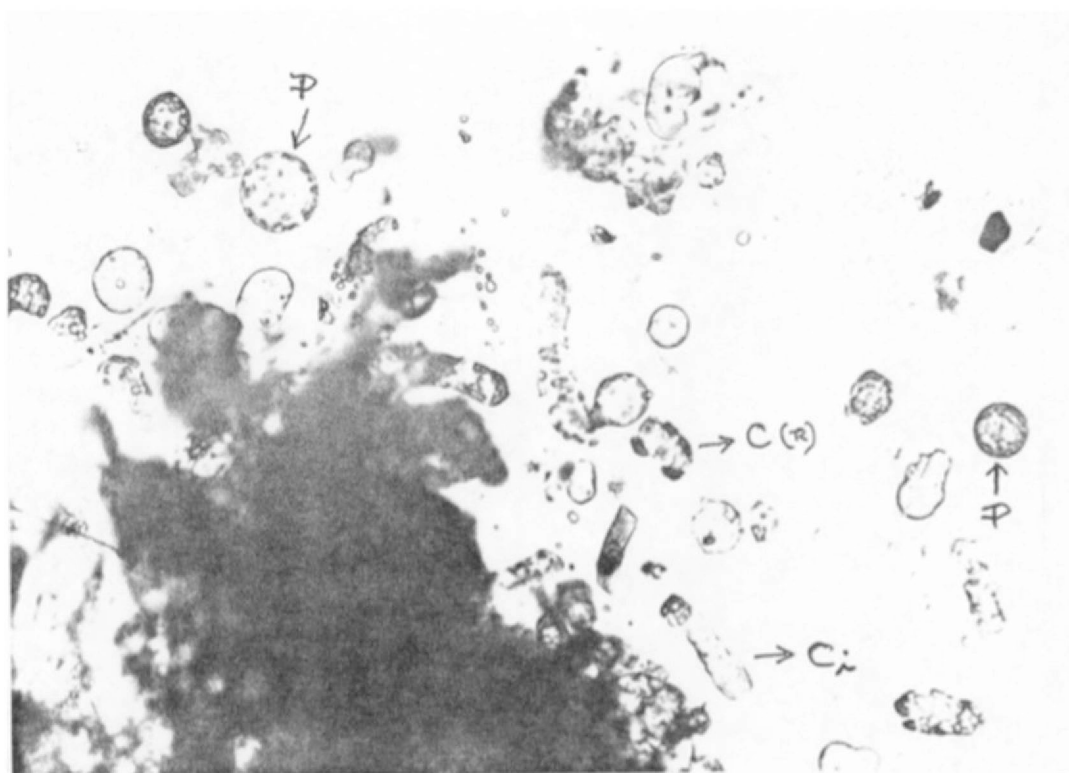


Figura 21. Protoplasto de *Dahlia* sp. (10 . 40 X)



A - (Panorâmica do tempo inicial de incubação: 15 min)
(10 . 4 X)

Fig. 22. Tecido foliar de *Stevia rebaudiana* em desagregação pela ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

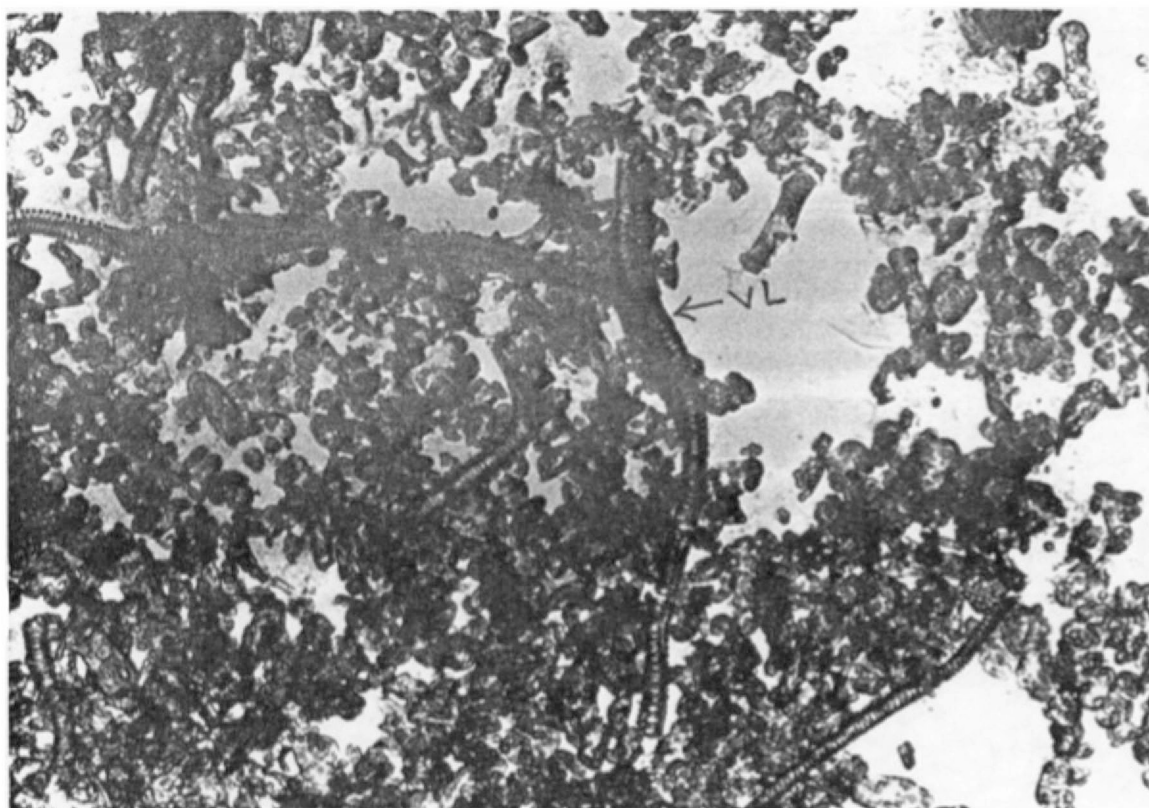


B - (Detalhe em tempo médio de incubação: 45 min)

(10 . 10 X)

C_i = célula individualizada
 $C(r)$ = célula em ruptura
 P = protoplasto ou esferoplasto

Fig. 22. Tecido foliar de *Stevia rebaudiana* em desagregação pela ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.



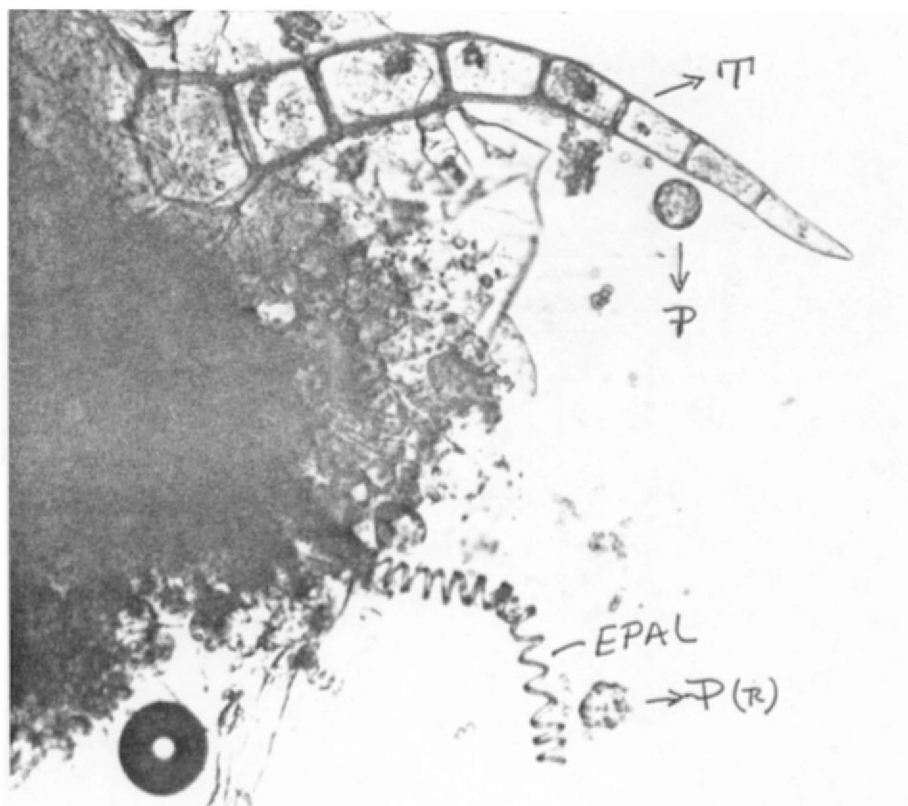
A - (3h de incubação : exposição parcial de um vaso lenhoso = VL)
(10 . 10 X)

Figura 23. Individualização de elementos anatômicos foliares de *Stevia rebaudiana* por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.



B - (12h de incubação : completa individualização de um Anel Xilemático = AX) (10 . 10 X)

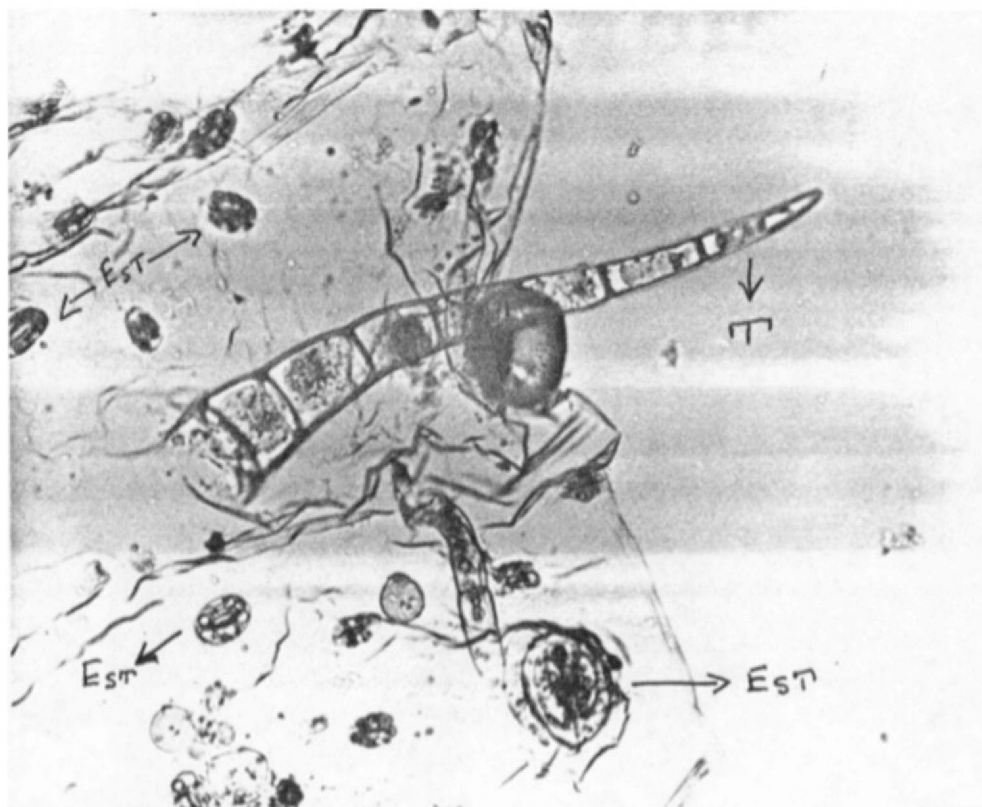
Figura 23. Individualização de elementos anatômicos foliares de *Stevia rebaudiana* por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.



A - (3h de incubação) (10 . 10 X)

- P = Protoplasto
- P(R) = Protoplasto em ruptura
- T = Tricoma (pêlo foliar)
- EPAL = Elemento parietal de anel lenhoso

Figura 24. Individualização de elementos anatômicos de **Stevia**: Xilema e Cutícula foliar.

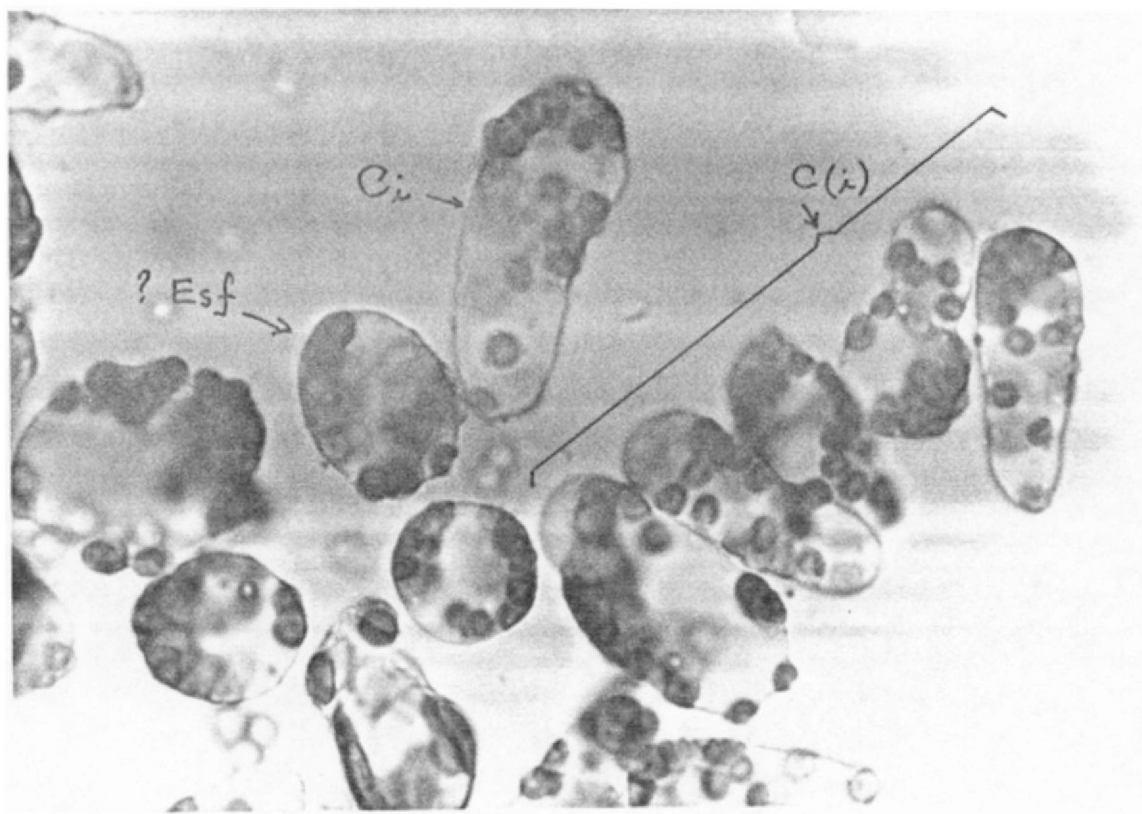


B - (12h de incubação com S -10) (10 . 10 X)

T = Tricoma

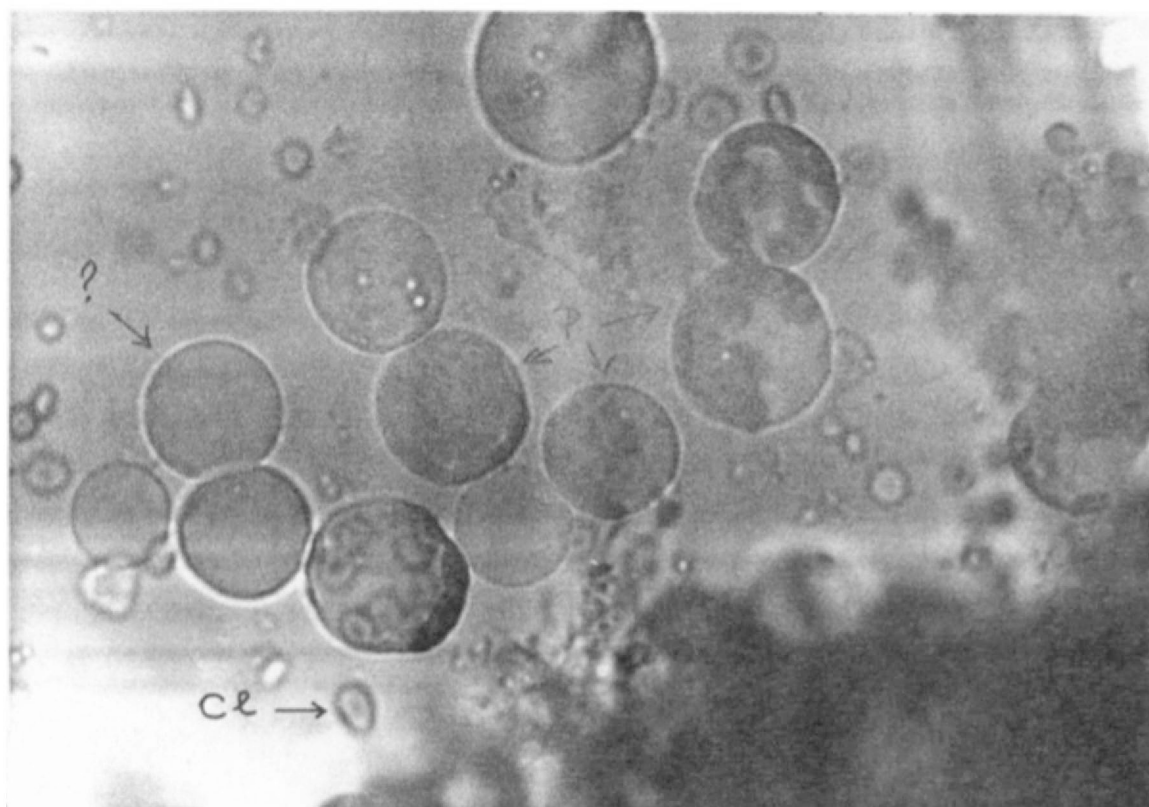
Est = Estômatos ainda inseridos na cutícula subaxial

Figura 24. Individualização de elementos anatômicos de **Stevia**: Xilema e Cutícula foliar.



A

Figura 25. Individualização celular (C(i)), Esferoplastificação (Esf) (foto A) e Protoplastificação (P) (foto B) de tecido foliar de *Stevia rebaudiana* por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*. (10 . 40 X)



B

Figura 25. Individualização celular (C(i)), Esferoplastificação (Esf) (foto A) e Protoplastificação (P) (foto B) de tecido foliar de *Stevia rebaudiana* por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*. (10 . 40 X)

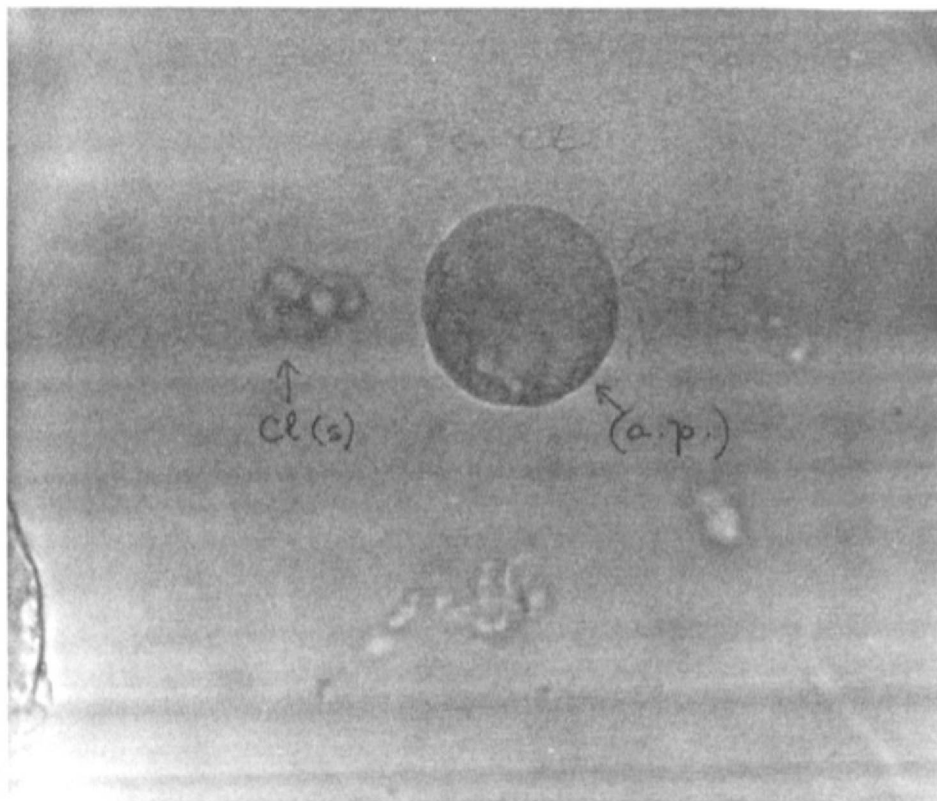


Figura 26. Protoplasto livre (P), Protoplastos em coalescência (P(s)), Clo-
roplastos livres (Cl) ou Associados (Cl(s)) de *Stevia* após lon-
ga incubação de tecido foliar com suco gástrico de *M. parana-*
guensis.

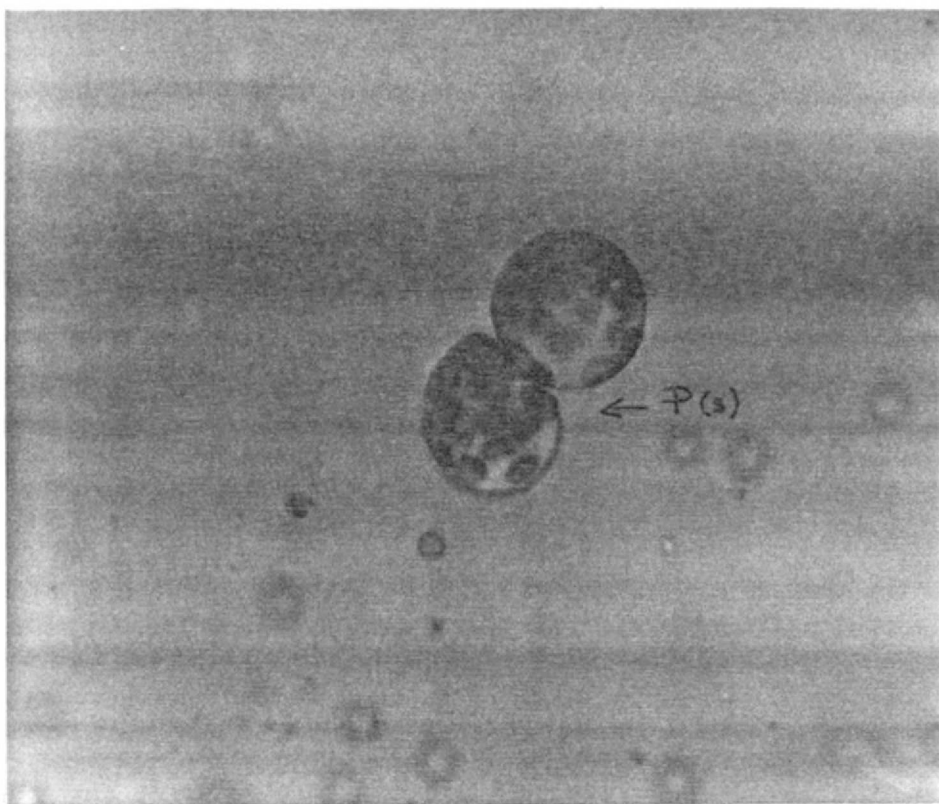


Figura 26. Protoplasto livre (P), Protoplastos em coalescência (P(s)), Cloroplastos livres (Cl) ou Associados (Cl(s)) de *Stevia* após longa incubação de tecido foliar com suco gástrico de *M. paraguayensis*.

TABELA 4. INDIVIDUALIZAÇÃO CELULAR E PROTOPLASTIFICAÇÃO DE TECIDO FOLIAR DE VEGETAIS SUPERIORES POR AÇÃO DO SUCO GÁSTRICO (S-10) de *M. paranaguensis*.

VEGETAL / PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA	CONTAGEM DE CÉLULAS* (x 10 ⁻⁶)
1. Spinacia oleracea	
1.1 S-10 liofilizado, ressolubilizado	0,38
1.2 S-10 congelado, descongelado	1,17
1.3 S-10 refrigerado	1,37
1.4 Celulase + pectinase (1 : 1)	0,48
2. Manihot utilissima	
2.1 S-10 congelado, descongelado	0,57
2.2 Pectinase	0,55
2.3 Celulase	0,60
2.4 S-10 cong., descong. + Celulase	0,95

* As células contadas em câmara de Neubauer incluem todos os elementos individualizados: células intactas (liberadas pela ação pectinolítica sobre lamela média) + esferoplastos (células com resíduos de parede celular) + protoplastos (células nuas sem parede celular).

Detalhes do protocolo experimental em Materiais e Métodos.

Obs.: Conteúdo proteico das preparações enzimáticas:

S-10 : 160 mg / ml

celulase : 165,4 mg / ml (Celluclast®)

pectinase: 15,7 mg / ml (*A. niger*)

(fig. 24-B), células individualizadas em geral (fig. 25-A) e cloroplastos (fig. 26).

Embora a preparação fresca de suco gástrico seja a mais eficiente para fins de protoplastificação de vegetais superiores (tecidos foliares de espinafre e mandioca; dados da tabela 4), esta capacidade fica satisfatoriamente retida mesmo em preparações de maior facilidade de manipulação tais como a congelada ou liofilizada. O potencial protoplastificador do suco gástrico de *M. paranaguensis* equivale ao de preparações comerciais do tipo celulase (Celluclast®) ou pectinase (Sigma) (item 2, tabela 4), embora, em alguns casos, a adição de proporção moderada de celulase (e.g., sub-item 1.4, item 1, tabela 4) favoreça a contagem de protoplastos/ml de meio incubação.

6 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE EDULCORANTES NATURAIS E ARTIFICIAIS

A fig. 27-A mostra a estrutura química de 4 adoçantes modernamente empregados na indústria farmacêutica de dietéticos e ou de alimentos em geral: o ESTEVIOSÍDIO (o qual com uma β -D-glicosilação adicional a nível do resíduo sofrósil passa a constituir o REBAUDIOSÍDIO A), a glicirrizina (um β -D-diglucuronídeo) e o edulcorante artificial ASPARTAME (o dipeptídeo aspartil-fenilalanina-metil-éster). A priori, o consumo de quaisquer destes produtos para fins alimentares humanos (em princípio, dietéticos e portanto em pequena quantidade dado o poder edulcorante na ordem de 200 a 300 X comparando-se com aquele da sacarose), levanta algumas interroga-

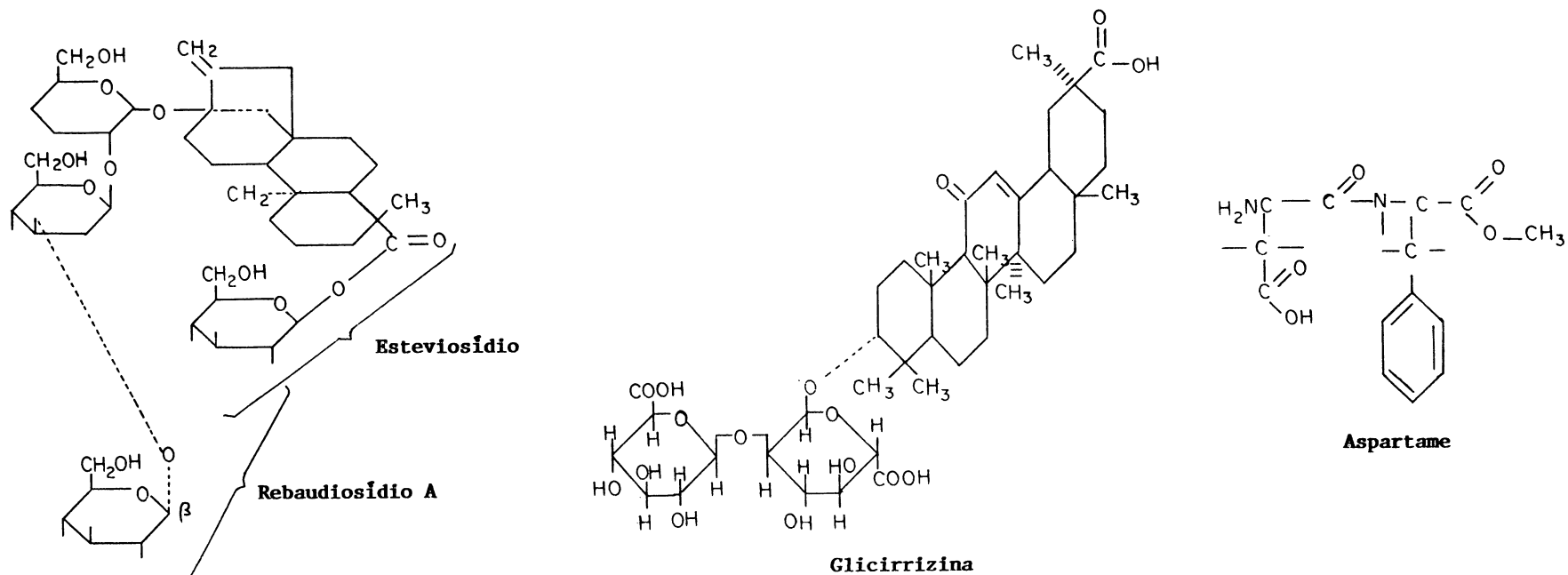


Fig. 27-A. Estrutura de alguns edulcorantes naturais e sintéticos hidrolizáveis pelo suco gástrico do molusco **Megalobulimus paranaguensis**.

(A) **Esteviosídeo**

13-((2-O-β-D-glucopyranosil-α-D-glucopyranosil) oxy) kaur-16-en-18-óico ácido β-D-glucopiranosil éster.

Rebaudiosídeo A

a partir de uma glucosilação adicional da posição 3 (β) da sofose ligada ao esteviosídeo.

(B) **Glicirrizina**

20-β-carboxi-11-oxo-30-norolean 12-en-3 β-il 2-O-β-D-glucopiranosil -α-D-glucopiranosiduronico

(ácido glicirrízico; glicosídeo ácido de ácido glicirretínico).

(C) **Aspartame**

N-L-α-aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster

ou

3-amino-N-(α-carboxifenetil)ácido succinâmico N-metil éster.

ções:

- a) se uma vez satisfeita a sensação de doce (vestíbulo bucal) as mesmas são incorporadas ou não a partir da luz gastro-intestinal;
- b) se no trânsito ou uma vez incorporadas, sofrem o processo de hidrólise ou outras reações de modificação estrutural;
- c) além das contrapartes facilmente metabolizáveis (D-glucose; ácido D-glucurônico; ácido aspártico, fenilalanina e metanol, respectivamente para esteviosídeo/rebaudiosídeo, glicirrizina e aspartame), qual o destino e ou ação biológica das agliconas esteviol e ácido glicirrético (caso dos edulcorantes naturais) e mesmo o efeito cumulativo da fenilalanina (caso do aspartame), pelo menos no caso de pacientes fenilcetonúricos.

Dada a ampla variedade de enzimas hidrolíticas para carboidratos presentes no suco gástrico de *M. paranaguensis* e o trabalho concomitante levado a cabo por FERRARESI (1985) no sentido do desdobramento enzimático de esteviosídeo, e não obstante a circunstância deste suco ter exibido limitada ação hidrolítica sobre substratos proteicos, a hidrólise dos três substratos edulcorantes foi levada a cabo e a natureza dos produtos de reação avaliada por técnicas cromatográficas de camada delgada (TLC) e eletroforéticas. Nas figs. 27 e/ou 28, mostra-se o curso da reação hidrolítica para esteviosídeo (S-1, S-2 e S-3; STV + S-10), para o rebaudiosídeo (R-1, R-2; RebC + S-10) e para a glicirrizina (G-1 e G-2), em cinéticas de tempo curto e longo). Além de D-glucose, dois sub-produtos são detectáveis a partir de esteviosídeo em tempos mais curtos de incubação (linha STV+S-10, fig. 28), indicando uma progres-

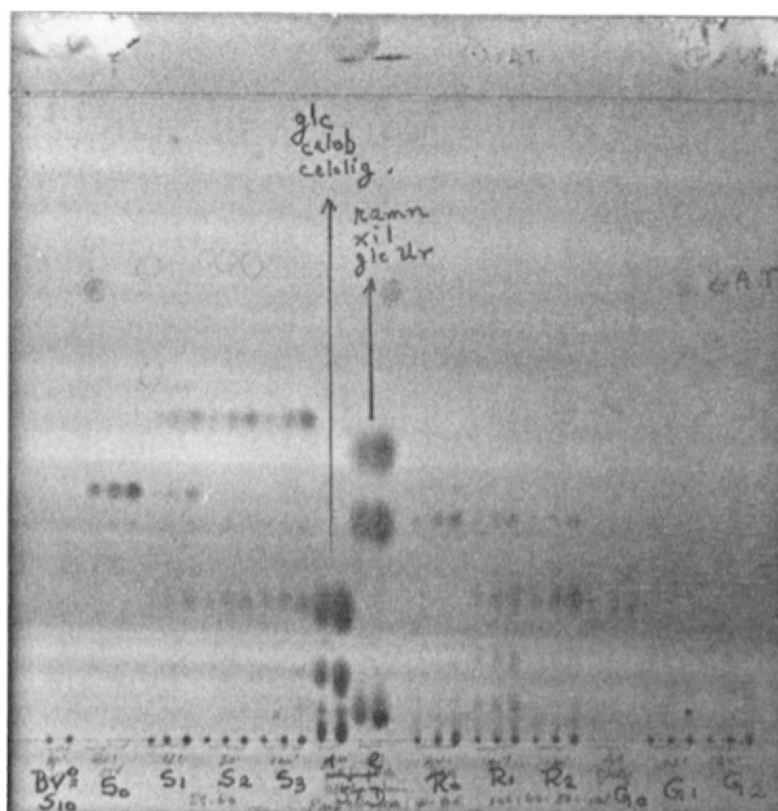


Fig. 27. Análise cromatográfica em camada delgada dos produtos de desdobramento hidrolítico de edulcorantes naturais glicosilados, por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*

(Cromatoplaça = SG-60 Merck; solvente = propanol:nitrometano:água:acetato de etila 10:4:8:10,5; revelador = orcinol sulfúrico).

Br^o S-10 = "blank" de enzima (S-10)
 So = "blank" de esteviosídeo
 S₁, S₂ e S₃ = esteviosídeo + S-10 em incubações de 15, 30 e 120 min.
 R₀ = "blank" de rebaudiosídeo A
 R₁, R₂ = rebaudiosídeo + S-10 em incubações de 15 e 120 min.
 G₀ = "blank" de glicirrizina
 G₁, G₂ = glicirrizina + S-10 em incubações de 15 e 120 min.

Padrões (STD): (em ordem decrescente de migração):

1 = D-glucose, celobiose e celoligossacarídeos
 2 = L-ramnose, D-xilose e ácido D-glucorônico

(A.T. = Azul de Timol, marcador de "front" de corrida).

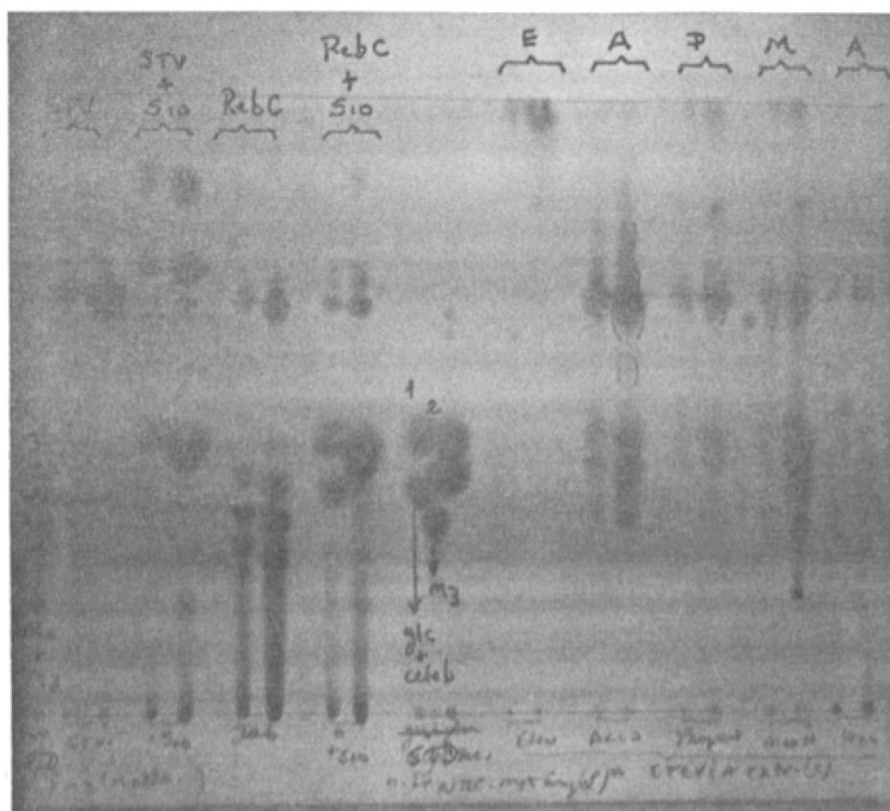


Fig. 28. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) de edulcorantes naturais de *Stevia rebaudiana* e de seus produtos de hidrólise por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(condições: mesmas da fig. 27 com solvente = Acetato de etila : ácido acético : álcool isopropílico : ácido fórmico : água 25:10:5:1:15).

STV = "blank" de esteviosídeo
 STV + S-10 = esteviosídeo + enzima de caracol
 RebC = rebaudiosídeo cru
 RebC + S-10 = rebaudiosídeo cru + enzima de caracol

E, A, P, M e A = extratos sequenciais de folhas de *Stevia* com éter etílico, acetona, propanol, metanol e água.

Padrões (STD): (em ordem decrescente de migração)

3 = maltose (M₂) + maltotriose (M₃)
 1 = D-glucose + celobiose
 2 = maltotriose (M₃)

siva deglucosilação do substrato. Um deles (linha S-1, fig. 27), com migração cromatográfica imediatamente superior ao esteviosídeo, persiste mesmo em tempos mais longos de incubação (e não se trata da aglicona esteviol livre, assinalada nas proximidades do "front" com o auxílio de luz UV). O rebaudiosídeo A (purificado; linhas R-1 e R-2, fig. 27) ou cru (linha RebC, fig. 28) é igual e extensivamente deglucosilado. A complexidade dos princípios presentes em folhas de **Stevia** pode ser apreciada na porção direita da fig. 28, onde estão cromatografados os extratos obtidos com ordem crescente de polaridade dos agentes extratores. Quanto à glicirrizina, o único produto de reação (detectável pela técnica de revelado com orcinol) é o ácido D-glucurônico livre (linhas G-1 e G-2, fig. 27). Comparando-se as resoluções cromatográficas da fig. 27 (onde ocorre uma coincidência de migração entre um açúcar livre D-xilose e uma aglicona tetrassacarídica o rebaudiosídeo A) e da fig. 28 (completa resolução entre os substratos de **Stevia** e seus produtos de hidrólise enzimática, dá-se conta da conveniência de desenho de solventes cromatográficos mais adequados (caso da mistura solvente da cromatoplaça da fig. 28, originalmente aplicada à resolução de ácidos urônicos metilados ou não em C-4; vide figs. 41 e 41-A). Os resultados da análise eletroforética (fig. 29) parecem indicar que no curso da reação hidrolítica dos edulcorantes de **Stevia** não é preferencial à formação de sub-produto de natureza ácida ou seja esteviolbiosídeo ou rebaudiosídeo B (grupo -COOH livre da aglicona esteviol). No caso de glicirrizina tampouco foi possível a detecção da aglicona mono-glucuronosilada ou do di-glucuronídeo livre, com a ressalva de que a cinética de

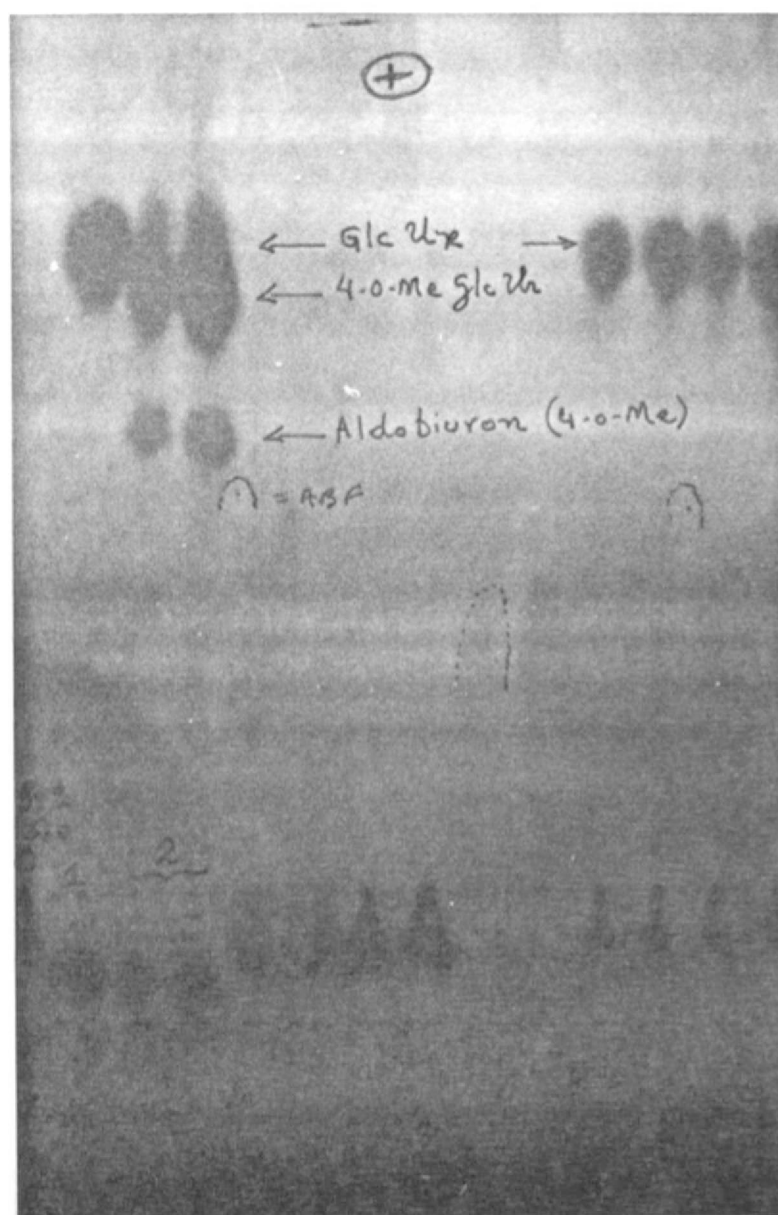


Fig. 29. Análise eletroforética de alta voltagem em papel dos produtos de enzimólise de edulcorantes naturais de *Stevia rebaudiana* e *Glycyrrhiza glabra* por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

papel = Whatman nº 1
 tampão = ácido acético (0,4%) : piridina (10,0%), pH 6,5
 revelador = AgNO_3 / NaOH
 corrida: 45 min, com 20 mA

STD (Padrões):

1 = D-xilose + ácido D-glucurônico
 2 = Ácido (4-O-metil)-D-glucurônico + ácido aldobiurônico (4-O-metilado) (+ xilose, contaminante).

Amostras:

Reb = "blank" de rebaudiosídeo
 Reb + S-10 = rebaudiosídeo + enzima de *Megalobulimus* (30' incub.)
 GlcRz = "blank" de glicirrizina
 GlcRz + S-10 = glicirrizina + enzima de *Megalobulimus* (120' incub.).

(0 = "blank" de S-10; 1ª linha à esquerda).

tempo aqui explorada não é excludente para estas possibilidades.

Com relação ao aspartame as análises cromatográficas (figs. 30 e 31) e eletroforéticas (figs. 32 e 33) mostram que o suco gástrico promove uma rápida remoção dos grupos metílicos ou seja, desesterificação do resíduo fenilalanina e daí um acúmulo mais prolongado do dipeptídeo aspartil-fenilalanina, aparecendo os produtos completos de reação hidrolítica (ácido aspártico e fenilalanina livres) apenas em tempos mais longos de incubação. Ademais, em seu conjunto, os dois sistemas cromatográficos mais os dois tampões de eletroforetização, mostraram que não se detecta um dos possíveis intermediários (fenilalanina (carboxi -metil éster) e que, portanto, a atividade (metil -esterase é muito mais intensa do que a dipeptidase ("aspartamase").

Em resumo, é no mínimo curioso que um modelo biológico com "habitat" nativo teoricamente afastado das fontes dos edulcorantes naturais aqui analisados (hábito alimentar do caracol em plantas rasteiras; atividade trepadeira limitada; ocorrência estrutural de um dissacarídeo muito raro na natureza, a soforose, tanto na estrutura do esteviosídeo quanto do rebaudiosídeo) promova hidrólise tão eficiente deste tipo de substratos (limitada inclusive por problemas de solubilidade; aproximadamente 0,1 g% no caso de esteviosídeo). O mesmo conceito parece aplicar-se ao caso da glicirrizina (obtida de raízes de *Glycyrrhiza* e também muito pouco solúvel em água; soluções aquosas a 0,5 g% promovendo a formação de géis altamente consistentes). Pelas mesmas razões antes expostas, a completa hidrólise de aspartame é ainda mais intrigante, por tratar-se de produto completamente sintético.

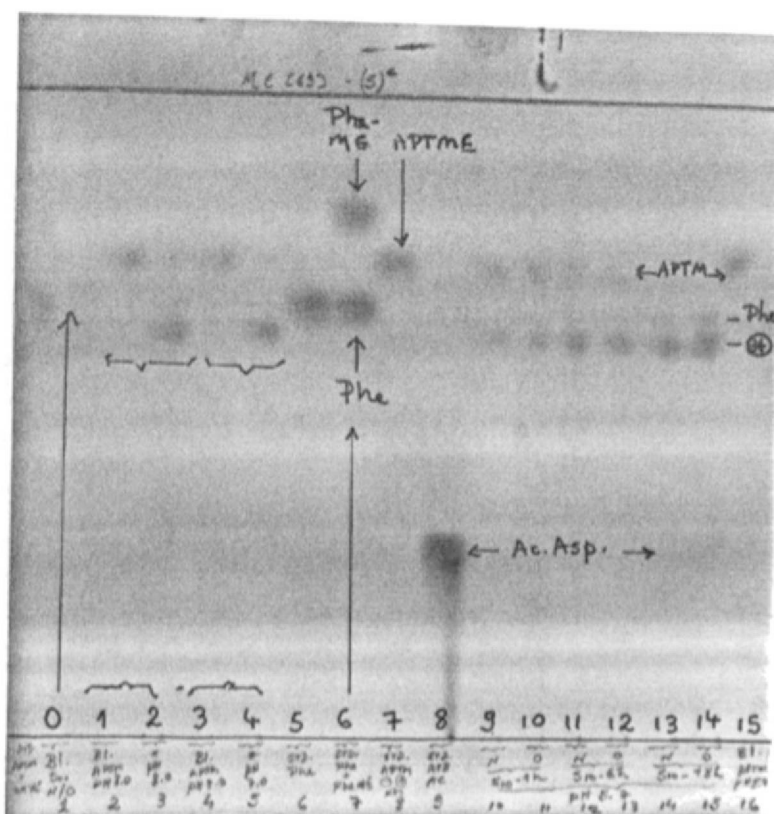


Fig. 30. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise do edulcorante artificial, **Aspartame**, por ação do suco gástrico de **M. paranaguensis**.

(Cromatoplaca = SG-60 Merck; solvente = Acetato de etila : ácido acético : álcool isopropílico : ácido fórmico : água 25:10:5:1:15; revelador = Ninhidrina acetônica).

- 0 = "blank" de enzima
- 1 e 2 = "blank" e incubação de aspartame a pH 8 (respectivamente)
- 3 e 4 = "blank" e incubação de aspartame a pH 7 (respectivamente)
- 5 = padrão de fenilalanina
- 6 = padrões de fenilalanina e seu metil éster
- 7 = padrão de aspartame
- 8 = padrão de ácido aspártico
- 9 a 14 = incubações de aspartame a pH 5,5 com duas diferentes preparações de S-10 (enzima de **M. paranaguensis**) em cinética progressiva de tempo (de 1 até 18 horas).

(Na série 9 a 14, a concomitância entre o desaparecimento de aspartame e o aparecimento de seu derivado desesterificado (demetilado = \odot^*), acompanhado de menor proporção de fenilalanina. O registro fotográfico não permitiu a documentação do menor teor de ácido aspártico, situação mais claramente mostrada na figura seguinte).

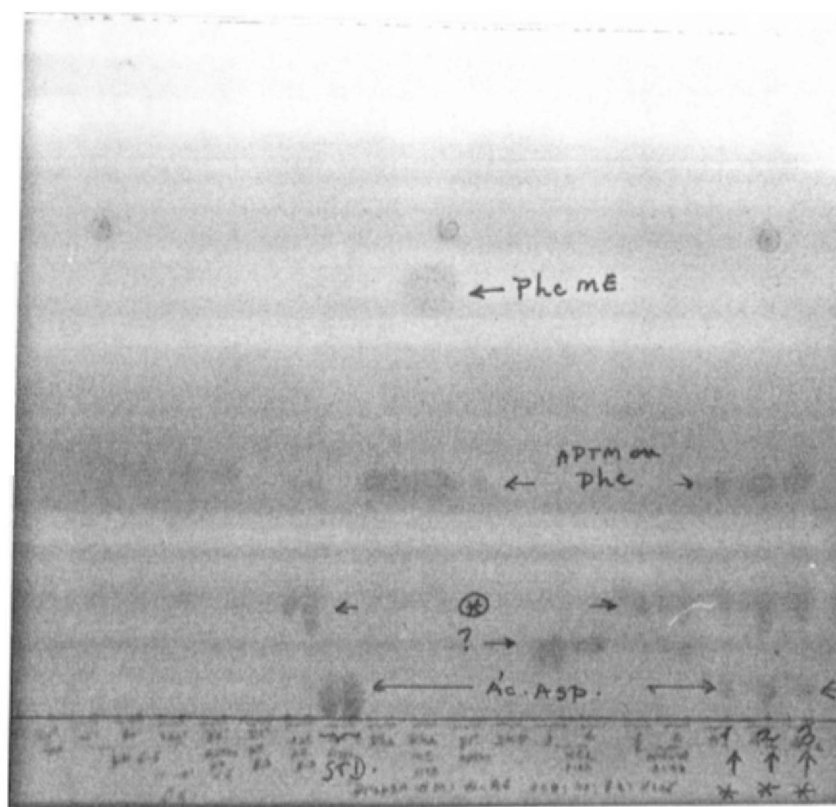


Fig. 31. Enzimólise do aspartame pelo suco gástrico de *M. paranaguensis*. (S-10)

(Cromatoplaça nas condições da figura 30, exceto pelo solvente = propanol:nitrometano:água:acetato de etila 10:4:8:10,5).

STD = padrão de ácido aspártico

1, 2 e 3 = incubações de aspartame com S-10 em pH 5,5 por 2, 12 e 24 h.

(Notar a co-geração de ácido aspártico livre a partir de fenilalanina, a qual neste solvente não experimenta resolução em relação ao substrato aspartame).

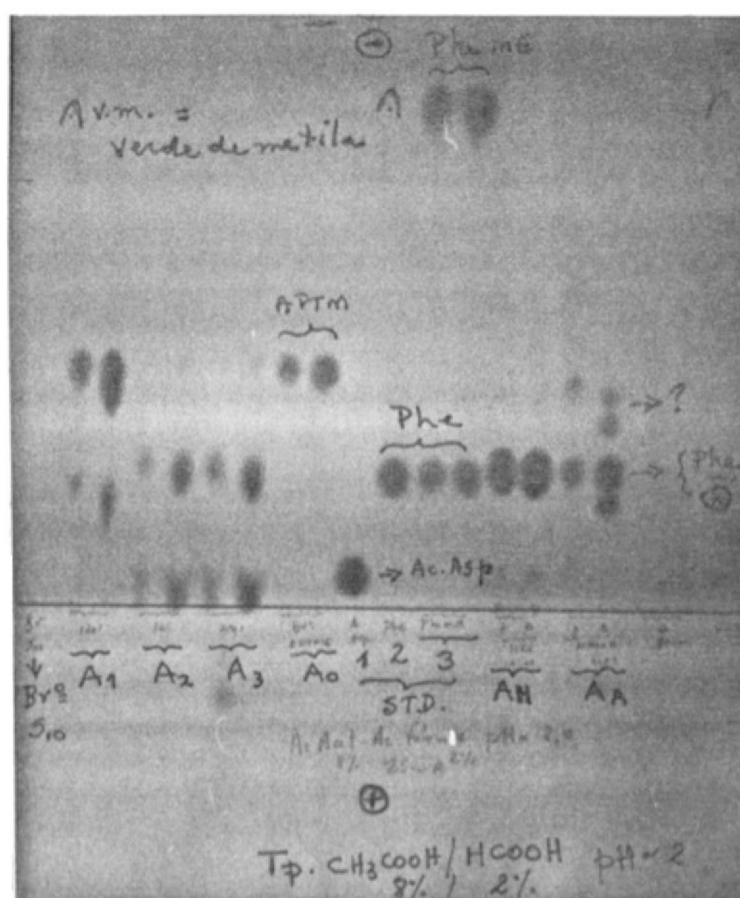


Fig. 32. Análise eletroforética de alta voltagem em papel para os produtos de enzimólise do aspartame por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

(papel = Whatman nº 1, tampão = ácido acético (8%)/ácido fórmico 2%, pH - 2; corrida de ~ 30 min com 15 mA).

(-) = catodo (revelador: ninhidrina) (+) = anodo

Br S-10 = "blank" de enzima

A₁, A₂ e A₃ = aspartame + enzima a pH 5,5 por 2, 12 e 24 horas

A₀ = "blank" de aspartame

STD (Padrões):

1 = ácido aspártico

2 = fenilalanina

3 = fenilalanina + seu metil-éster

AH = aspartame desesterificado com HCl 1:10 a frio ou à temperatura ambiente (30°C).

AA = aspartame tratado com amônia 1:10 a frio ("spot" da esq.) ou com aquecimento (80°C; 2 min).

(v.m. = verde de metila, corante marcador de corrida)

(Notar a resolução entre um possível intermediário de hidrólise (fenilalanina metilada), substrato (aspartame) e produtos finais de hidrólise (fenilalanina e ácido aspártico). Não há resolução entre um intermediário (aspartame demetilado) e fenilalanina.

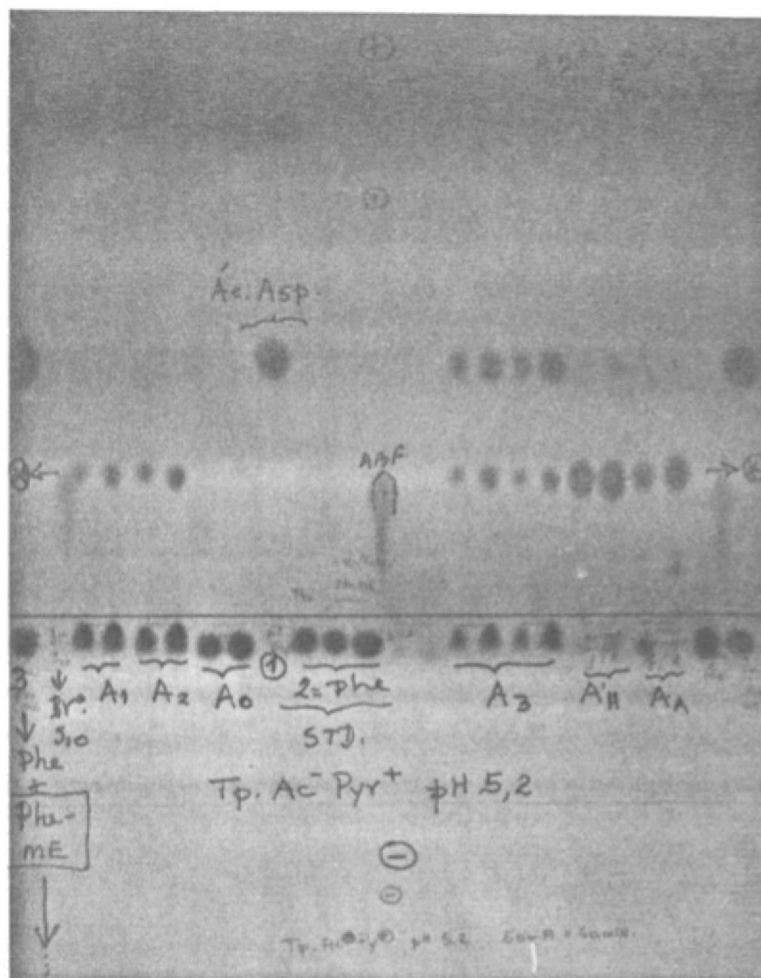


Fig. 33. Eletroforetograma para produtos de enzimólise de aspartame com o suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(condições experimentais: a mesma da fig. 32, exceto pelo tampão de corrida: acetato de piridina pH 5,2; revelador: ninhidrina acetônica) (corrida: 30 min, c/ - 20 mA).

Br^o S-10 = "blank" de S-10 (enzima)

A₁, A₂ e A₃ = incubações de aspartame com suco gástrico a pH 5,5 por 2, 12 e 24 horas.

A₀ = "blank" de aspartame

STD (Padrões):

3 = ácido aspártico, fenilalanina e seu metil-éster (o último de migração mais rápida perdido ao vaso catódico)

2 = ácido aspártico

AH = aspartame tratado com HCl 1:10

AA = aspartame tratado com amônia 1:10

(Notar a resolução pró-anódica entre ácido aspártico (gerado na incubação A₃, mais longa, e o substrato (aspartame), com leve migração catódica determinada por eletroendosse. Intermediariamente migra o produto intermediário de reação: aspartame desesterificado). Não há resolução entre aspartame e fenilalanina.

7 POTENCIAL HIDROLÍTICO EM GLICANAS NATURAIS

7.1 Avaliação prévia

Nos primórdios desta tese, procedeu-se a uma avaliação prévia do alcance do suco gástrico quanto à capacidade de hidrólise sobre polissacarídeos comumente encontrados no reino vegetal (aqui "lato sensu" incluídas as leveduras, fungos e algas) ou indistintamente também encontrados em alguns animais (casos do glicogênio e quitina). Tomando-se, nas condições de incubação discriminadas na tab. 5, o glicogênio como correspondente a 100% de hidrólise (glucose como único produto detectável cromatograficamente), a população polissacarídica pode ser dividida em quatro grupos:

- a) polissacarídeos completamente hidrolisados (glicogênio; laminarana);
- b) polissacarídeos extensivamente hidrolisados (pectina; celulose; hemicelulose);
- c) polissacarídeos pouco hidrolisados (amido, arabana, quitosana); e
- d) polissacarídeos muito superficialmente hidrolisados ou resistentes à hidrólise (manana de levedura; nigerana; quitina).

No caso, amido era nativo e a hemicelulose "A" (de bracatinga) intumesce mas não é completamente solúvel em pH 5.6, invariavelmente adotado para todas as incubações. Tendo-se em conta que os principais produtos de hidrólise para as categorias b) e c) são oligossacarídeos, fica patente a aplicabilidade do suco gástrico de *M. paranaguensis* para o processo de fragmentação da cadeia polissacarídica com vistas a estudos de ordem

TABELA 5. PERFIL HIDROLÁSICO PRELIMINAR DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis* SOBRE GLICANAS NATURAIS

SUBSTRATO	monossac. princ.	config. (lig.glicos.)	% relat. hidról.*
Amido	D-glc	α (1,4) > (1,6)	21
Glicogênio	D-glc	α (1,4) > (1,6)	100
Celulose	D-glc	β (1,4)	50
Laminarina	D-glc	β (1,3) > (1,4)	91
Nigerana	D-glc	α (1,3) > (1,4)	7
Hemicelulose	D-xil	β (1,4)	48
Arabana	L-ara	α (1,5) > (1,3)	16
Manana ¹	D-man	α (1,6) \searrow (1,2)	2
Pectina	D-galacturon	α (1,4)	71
Quitina	D-glcNH ₂ (N-Ac)	β (1,4)	3
Quitosana	D-glcNH ₂	β (1,4)	16

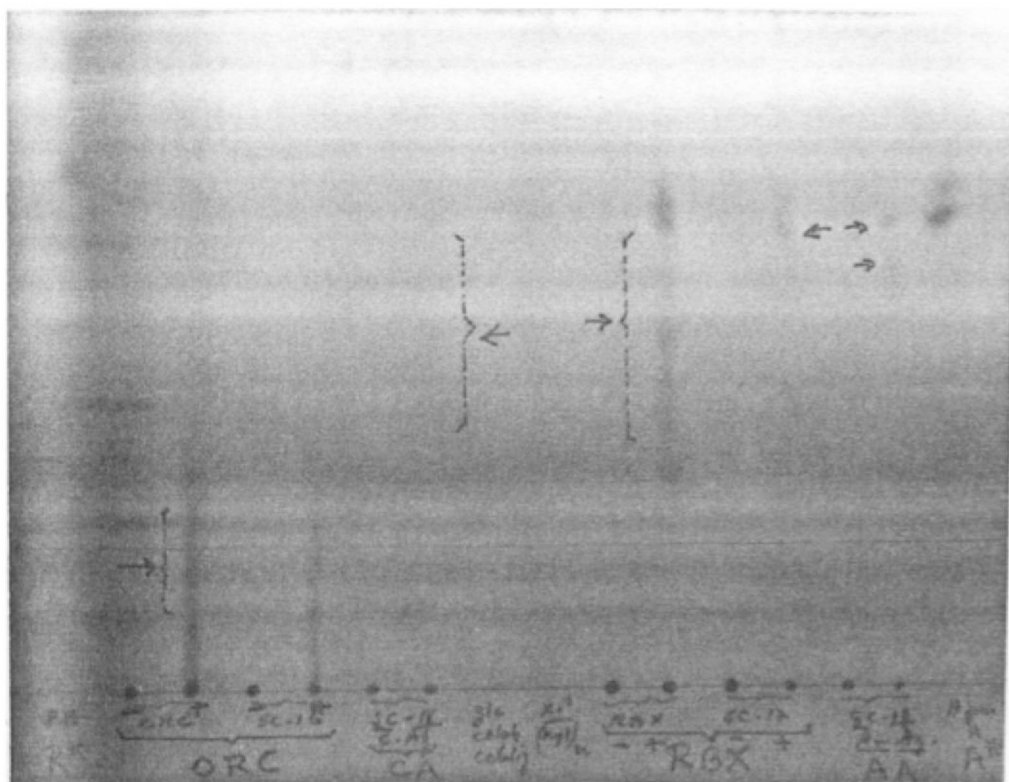
* Microgramas de poder redutor (como glucose) medido em incubações de 96 h (atmosfera de tolueno), a 28^oC, contendo polissacarídeo suspenso em tampão acetato sódico 60 mM pH 5,6. Valor calculado com base numa alíquota de incubação teoricamente contendo 100 μ g de cada substrato (glicogênio como único substrato sofrendo completa monomerização a glucose).

¹ de parede celular de *X. carlsbergensis*.

estrutural.

7.2 Glicanas poliméricas cromogênicas

A medida de atividade hidrolítica fica extremamente facilitada quando substratos naturais (cujos produtos de hidrólise requerem, para fins de visualização e quantificação, técnicas auxiliares como poder redutor, etc.) são substituídos pelos respectivos análogos cromogênicos. Assim, o material polimérico e convenientemente derivatizado com substituintes fortemente coloridos (e.g., Azure A, Remazol Blue, Ostazin Red) que são acoplados à parte dos grupamentos hidroxilas primários (C-6) e ou secundários (C-2 ou C-3; caso de amido, celulose, xilana). Como resultado, obtém-se alternativa de substrato, o qual em sua forma original, mantém propriedades úteis como insolubilidade em água (mas com bom entumescimento) ou fácil precipitabilidade em misturas de água e solventes orgânicos. Na fig. 34 mostra-se o resultado da ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10) sobre 3 diferentes glicanas poliméricas cromogênicas: celulose (esta com dois tipos de derivados: ORC = Ostazin Red Cellulose; CA = Cellulose Azure), heroxilana (Remazol Blue Xylan) e amilose (Amilose Azure). Na cromatoplaca A (sem revelado), e em relação a zona de "front" cromatográfico (onde migram os corantes livres R* = Remazol Blue e A* = Azure A) pode-se verificar que os hidrolizados enzimáticos exibem produtos de degradação coloridos de menor migração cromatográfica e portanto devendo incluir mono ou oligossacarídeos comprometidos covalentemente com os corantes de derivatização. Em outras palavras, a derivatização não impede o acesso das enzimas às ligações glicosídicas dos tipos α - ou



A - Cromatoplaça fotografada sem revelação

Fig. 34. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) da enzimólise de glicanas poliméricas cromogênicas por ação do suco gástrico de **Megalobulimus paranaguensis**.

(Cromatoplaça: SG-60 Merck; solventes = propanol:nitrometano:água:acetato de etila 10:4:8:10,5 até 3 cm de corrida; acetato de etila:ácido acético:isopropanol:ácido fórmico:água 25:10:5:1:15 recorrida total).

R* e A* = Remazol Blue e Azure A (corantes livres)

ORC = Ostazin Red Cellulose

RBX = Remazol Blue Xylan

CA = Cellulose Azure

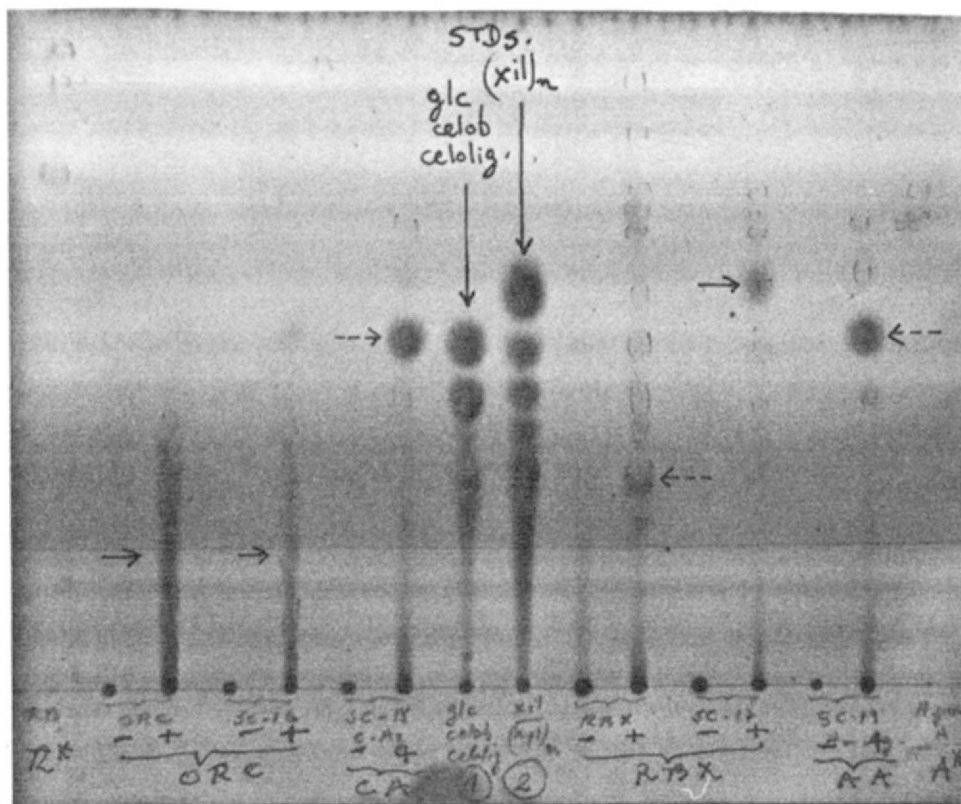
AA = Amylose Azure

(-) e (+) = alíquotas de substrato cromogênico incubadas na ausência ou presença de enzima, respectivamente.

STDs (Padrões)

1 = D-glucose, celobiose e celoligossacarídeos

2 = D-xilose e xiloligossacarídeos (série β 1,4)



B - A cromatoplaca de (A), revelada c/ orcinol-sulfúrico

Fig. 34. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) da enzimólise de glicanas poliméricas cromogênicas por ação do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

(Cromatoplaca: SG-60 Merck; solventes = propanol:nitrometano:água: acetato de etila 10:4:8:10,5 até 3 cm de corrida; acetato de etila:ácido acético:isopropanol:ácido fórmico:água 25:10:5:1:15 recorrida total).

R* e A* = Remazol Blue e Azure A (corantes livres)

ORC = Ostazin Red Cellulose

RBX = Remazol Blue Xylan

CA = Cellulose Azure

AA = Amylose Azure

(-) e (+) = alíquotas de substrato cromogênico incubadas na ausência ou presença de enzima, respectivamente.

STDs (Padrões)

1 = D-glucose, celobiose e celoligosacarídeos

2 = D-xilose e xiloligosacarídeos (série β 1,4)

β -1,4 presentes nestes substratos e, conseqüentemente, sua hidrólise. No caso de amilose Azure, algum corante livre parece resultar da ação do suco gástrico (penúltima linha da cromatoplaça A). Cabe observar que para as incubações-controle para substratos ou seja, isentas de enzima (todas linhas assinaladas com (-)), o material polimérico aplicado permanece na origem do cromatograma. Quando se confronta este primeiro resultado, carente de revelação, com o da fig. 34-B (a mesma placa, revelada com orcinol-sulfúrico mediante aquecimento enérgico), observa-se que há coincidência entre o revelado positivo para açúcares e as zonas coloridas antes apontadas para a fig. 34-A. Para celulose, glucose é detectada apenas quando a derivatização foi feita com Azure A (válido também para Amilose Azure) posto que o derivado Ostazin Red resulta numa mistura de oligossacarídeos. Secreção gástrica de caracol (FONTANA, FEIJÓ e DUARTE, 1976), bem como hepatopâncreas deste animal (DUARTE, 1968) são descritas como boas fontes de enzimas celulólicas. A xilana derivatizada com Remazol Blue Xylan parece ser o substrato cromogênico mais extensivamente degradado.

7.3 Glicosídios cromogênicos simples

O tipo de monômero (hexose, pentose) e de anel (piranosídico ou furanosídico) e a configuração anomérica em C-1 (α ou β) são dois parâmetros estruturais de importância para a especificidade de reações enzimáticas hidrolíticas. Com o objetivo de avaliar a extensão do espectro de ligações glicosídicas passíveis de hidrólise por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* uma série de substratos cromogênicos simples,

i.e., aglicona cromógena ligada + monossacarídeo, foi incubada por 12 h, a 40°C, em tampão acetato sódico pH 5,5, com suco gástrico, seguindo-se a análise cromatográfica (TLC) dos sobrenadantes metanólicos (2 vol. de solvente/vol. de incubado). Os resultados são os da fig. 35 e mostram que todos derivados da série p-nitrofenil (linhas 3, 5, 6, 7 e 13), o derivado o-nitrofenil (linha 13), os derivados umbeliferil (17 e 18) de α -L-arabinofuranose, α - ou β -D-glucopiranosose, β -D-glucopiranurônico, β -D-xilopiranosose e β -D-galactopiranosose são completamente hidrolisados por ação de suco gástrico, independentemente da anomericidade ou formato de anel. Da série testada o único substrato que apresentou maior resistência a hidrólise foi o metil- β -D-xilopiranosídeo e não se procedeu ao esclarecimento de algum papel inibitório que possa ter o metanol livre (co-produto de reação). Previamente ao revelado específico para açúcares liberados (incubações +) ou substratos intactos (incubações -), a cromatoplaça isenta de solventes foi submetida a vapores de amônia e inspecionada sob luz ultravioleta, mostrando claramente o deslocamento, para posições mais próximas do "front", das fluorescências devidas a agliconas ligadas (incubações -; substratos intactos) e agliconas livres (incubações +; co-produtos de reação).

Tomados em conjunto, os dados acima, confirmam o variado potencial hidrolítico no suco gástrico de **M. paranaguensis** no que toca à degradação biológica de carboidratos.

7.4 Oligossacarídeos naturais

Substratos naturais com complexidade estrutural intermediária entre os polímeros e glicosídeos simples antes mencio-

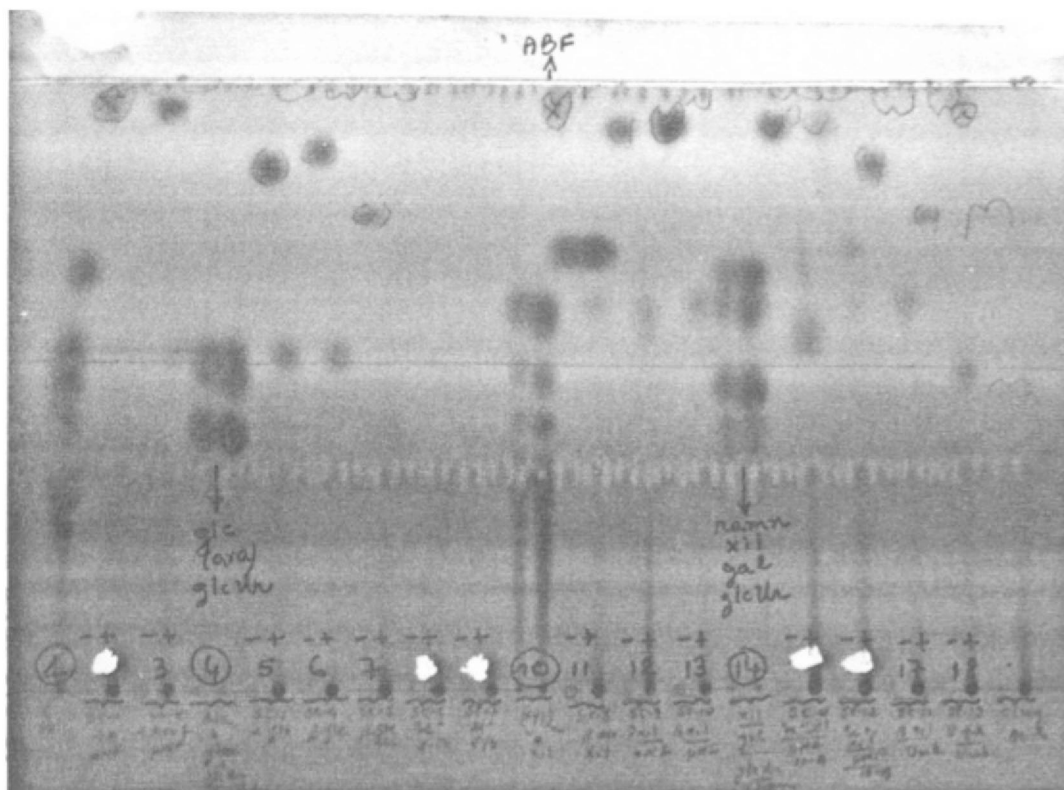


Fig. 35. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) da hidrólise de vários glicosídeos cromogênicos simples por ação do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* (S-10).

(Condições de corrida: cromatoplaça SG-60 Merck, irrigada com acetato de etila : ácido acético : isopropanol : ácido fórmico : água 25:10:5:1:15; revelação: orcinol/metanol/ácido sulfúrico).

Padrões:

- 1 = mistura de pentose, hexose e oligossacarídeos
- 4 = (glucose + arabinose) + ácido D-glucurônico
- 10 = D-xilose + xiloligossacarídeos da série β -1,4
- 14 = L-ramnose, D-xilose, D-galactose e ácido D-glucurônico

Substratos (-) e Substratos incubados com S-10 (+) :

- 3 = p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo
- 5 = p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
- 6 = p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
- 7 = p-nitrofenil- α -D-glucurônico ácido
- 11 = β -metil-D-xilopiranosídeo
- 12 = o-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
- 13 = p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
- 17 = metil-umbeliferil- β -D-xilosídeo
- 18 = metil-umbeliferil- β -D-galactosídeo

(ABF = Azul de BromoFenol, marcador de front de corrida).

(Os "spots" circulosados a lápis referem-se à fluorescência detectada na inspeção prévia ao revelado, feita em gabinete de luz ultra-violeta = UV_{365nm}).

nados também foram ensaiados com suco gástrico (S-10). Como avaliado pelo incremento de poder redutor e análise cromatográfica em papel, experimentaram, sob ação do suco, hidrólise extensiva: dissacarídeos (3-O- β -galactosil-arabinose e melibiose), trissacarídeos (melezitose e rafinose) e tetrassacarídeo (estaquiose).

7.5 Proteínas

Diferentemente da alta capacidade de hidrólise para carboidratos poliméricos e simples, a ação do suco gástrico sobre substratos proteicos de alto peso molecular revelou-se muito mais limitada. Hidrólise parcial foi verificada sobre substratos cromogênicos como Azocoll (colageno artificialmente corado) ou Azo-albumina. O mesmo resultado pode ser observado com relação à albumina sérica bovina e a limitação de hidrólise parece ser independente do pH do meio de incubação. Na fig. 36 aparece o eletroforetograma em acetato de celulose tanto para o substrato (linhas -) quanto para seus produtos de hidrólise (linhas +) em dois pHs distintos: 7 e 9. Observa-se claramente que, mesmo após incubação exaustiva (> 12 horas), a maior parte do substrato pode ser ainda recuperada (para melhor visualização da degradação do substrato proteico, nestas incubações utilizou-se menor concentração de enzimas). Esta capacidade muito mais limitada de hidrólise sobre substratos proteicos poliméricos é de interesse quando se tem em conta a utilização do suco gástrico para fins determinados como a protoplastificação, na qual a manutenção da integridade de membrana é essencial para melhor recuperação dos protoplastos e de sua funcionalidade nativa quando da regeneração até célula

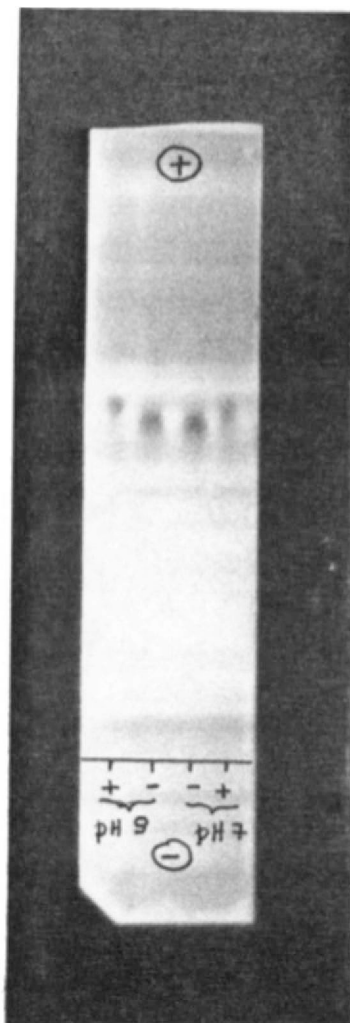


Fig. 36. Análise eletroforética da proteólise limitada de albumina bovina por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

(Suporte: tira de acetato de celulose (Celogel); tampão: Tris-HCl 50 mM pH 8,2; revelado: Coomassie Brilliant Blue)

corrida: 2mA por 35 min

(-) : incubações de substrato a pH 7 (tampão fosfato 50 mM) ou pH 9 (Tris-glicina 50 mM) na ausência de enzima.

(+) : idem na presença de enzima.

completa.

7.6 Ácidos nucleicos

Tomando-se como modelo tRNA de **T. utilis** (mistura de ácidos deoxiribonucleicos transportadores; de levedura), seguido de análise cromatográfica em camada delgada para produtos de degradação (deoxi-pentose, bases nitrogenadas livres, mono- e oligonucleosídios e nucleotídios), a degradação do ácido nucleico foi de menor significância, após incubação exaustiva a pH 7,5. Embora esta averiguação seja muito preliminar e deva ser conduzida com mais profundidade (diferentes tipos de ácidos nucleicos (DNA, RNAt, etc.), o resultado é igualmente de interesse por razões similares às mencionadas no item anterior e tendo-se em conta a conveniência de preservação da estrutura intacta deste tipo de material quando da manipulação de células, seus protoplastos e conteúdo citoplasmático para fins de hibridização ou outras técnicas de interesse genético ou biotecnológicos com leveduras, fungos e vegetais superiores.

7.7 Lipídios

Outro grupo de hidrolases de maior interesse quando da manipulação de células, esferoplastos e protoplastos, são as lipases, posto que os lipídios são integrantes importantes da membrana plasmática e outras organelas, cuja estrutura nativa é, via de regra, interessante ou mesmo compulsório em se preservar. Para avaliar a ação do suco gástrico de **M. paranaensis** sobre este tipo particular de substrato, a população fosfolipídica bruta de sementes de soja foi submetida a hidrô-

lise de longa duração (> 12 h.) na presença ou ausência de detergente (Tween-80, a 0,01 g%) e tamponamento a pH 7,5 como HEPES-NaOH 50 mM. Os resultados desta experimentação são os da fig. 69 (A = revelado genérico com anisaldeído; B = revelado com vapores de iodo, mais sensível para lipídios do que para outros componentes). No sistema cromatográfico empregado (FONTANA, 1980) a cromatoplaça pode ser, "grosso modo", dividida em 3 áreas de concentração das frações lipídicas:

- a) zona de "front" ou de lipídios neutros ou pouco polares (esteróides, tri-, di- e mono-glicerídios; ácidos graxos livres);
- b) zona intermediária entre o "front" e o meio, onde correm os glicolipídios;
- c) zona de menor migração ($R_f(s)$ entre 0,2 e 0,6) ou dos fosfolipídios.

Ao exame da fig. 69-A pode-se observar que a maioria dos componentes na zona dos glicolipídios e fosfolipídios sofre algum grau de hidrólise, a qual parece ser total apenas para um componente de $R_f = 0,32$ (assinalado com a flecha e logo acima do padrão de lecitina; comparar as linhas 2/3 com 4/5 ou 6/7). Os produtos visíveis de hidrólise (possivelmente ácidos graxos livres e ou glicerídios neutros) aparecem concentrados na zona "front" (o que mais comodamente pode ser visualizado na fig. 69-B: linhas 3 e 4). Este tipo de resultado, mesmo em sua apreciação qualitativa, pode ser de algum interesse acadêmico ou mesmo aplicado (e.g., lise intencional de células protoplastificadas, o que efetivamente pode em parte ocorrer como documentado nas figs. 13, 19 e 24-A), mas para fins de protoplastificação eficiente de células, micélios ou tecidos de ve-

getais superiores, é, em princípio, adverso, pelo menos quando se objetiva protoplastificação massiva e recuperação de protoplastos intactos. Uma maneira de se tentar superar este inconveniente seria a separação prévia das lipases e fosfolipases, o que por sua vez, poderia ser intentado por cromatografia de afinidade.

8 ESPECTROSCOPIA E ESPECTROFOTOMETRIA DE XILANAS

Hemiceluloses de gramíneas e leguminosas (heteroxilanas de gimnospermas) cuja estrutura sumária equivale à da fig. 39-A exibem interação com o iodo-iodetado que é diretamente proporcional a detalhes estruturais finos, tais como: DP (grau de polimerização), ausência de substituintes O-acetílicos e menor grau de substituintes glucuronil ou arabinofuranosil como cadeias laterais. Maior também será esta interação, se a heteroxilana apresentar maior grau de hidrossolubilidade. Um procedimento de rotina para isolamento e fracionamento de hemiceluloses é o preconizado por O'DWYER (1926), que envolvendo extração alcalina, já favorece a remoção de grupos O-Acetílicos. A atividade xilanásica de bactérias pode ser qualitativamente avaliada irrigando-se placas de agar-xilana-nutrientes (onde se desenvolveram os microrganismos) com solução de lugol (WILLIAMS, 1983). Igual técnica foi melhorada pela inclusão de cloreto de cálcio saturado no reagente iodado, a exemplo do método de quantificação de glicogênio (KRISMAN, 1962), aplicando-se a mesma à detecção de xilanasas fúngicas (FONTANA & BARBOSA, 1982, dados não publicados; BARBOSA, 1984). Originalmente, a interação de heteroxilanas

com iodo foi concebida como critério de fracionamento de xilanas "ramificadas" e "lineares" de sabugo de milho (GAILLARD, 1961). Este tipo de interação diferencial de xilanas com iodo-iodetado (também na presença de soluções concentradas de cloreto de cálcio) também foi explorado no estudo de hemiceluloses de folhas de cafeeiro (WENZEL & CORREA, 1977). Como heteroxilanas e complexos xilanolíticos eram objetivos primordiais do presente trabalho, uma metodologia foi aperfeiçoada com vistas à quantificação e diferenciação de heteroxilanas bem como para a revelação de eletroforetogramas utilizados na resolução e detecção de xilanases (zimograma). Para tanto, elegeu-se como substrato preferencial a heteroxilana de *Larix* sp. (lariço), produto comercial, e que apresenta aceitáveis características de hidrossolubilidade. Na fig. 37, mostra-se o cumprimento das leis Lambert-Beer para concentrações progressivas desta xilana (50 a 400 microgramas/0,5 ml) na reação cromogênica com o reagente iodo-iodetado em cloreto de cálcio saturado. Além de boa correlação linear entre concentração e absorvância, nota-se que o comprimento de onda máximo de absorção situa-se invariavelmente em 600 nm. Na fig. 38, pode-se constatar que tal reagente (idealizado para a quantificação de glicogênio; max. = 460 nm) presta-se à diferenciação de heteroxilanas de diferentes fontes botânicas: acícula de centeio e de bracinga (hemicelulose "A") cujos máximos são respectivamente 590 e 610 nm. Igualmente diferenciáveis são outras glicanas de fitobiomassa tais como, xiloglucana bruta de *Gossypium herbaceum* (520 nm), amilose de batata (650 nm) e amilopectina de arroz (470 nm). A re-O-Acetilação da xilana de *Larix* (JOHNSON, FONTANA & MACKENZIE, 1988) resulta na com-

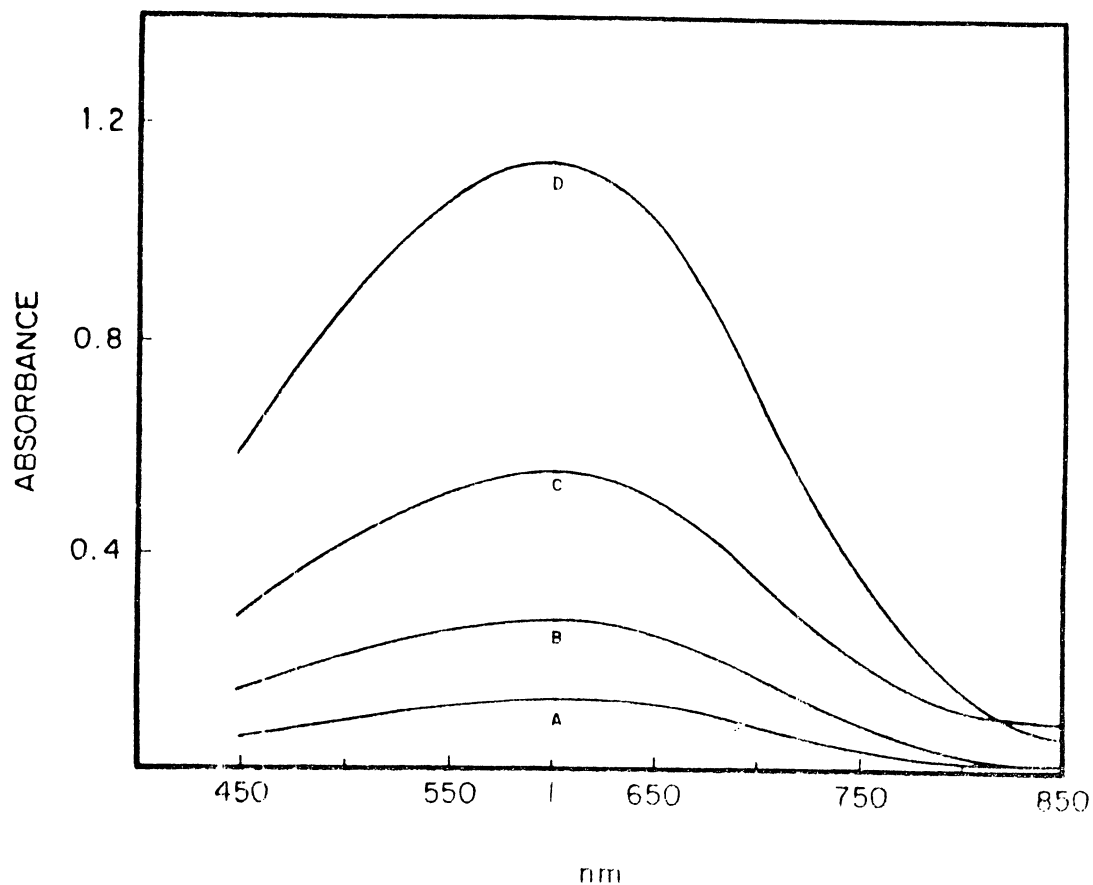


Fig. 37. Espectrofotometria de heteroxilana

Alíquotas de heteroxilana de *Larix* sp. (A e D contendo de 50 a 400 μg) num volume de 0,5 ml foram adicionadas de 2,5 ml do reagente KI/I₂:CaCl₂ saturado (2,5 /25,0 g%) 1 vol. : 249 vol., vigorosamente agitadas e submetidas às leituras de absorbância em espectrofotômetro Spectronic 2000, mediante varredura na faixa visível de 450 a 850 nm.

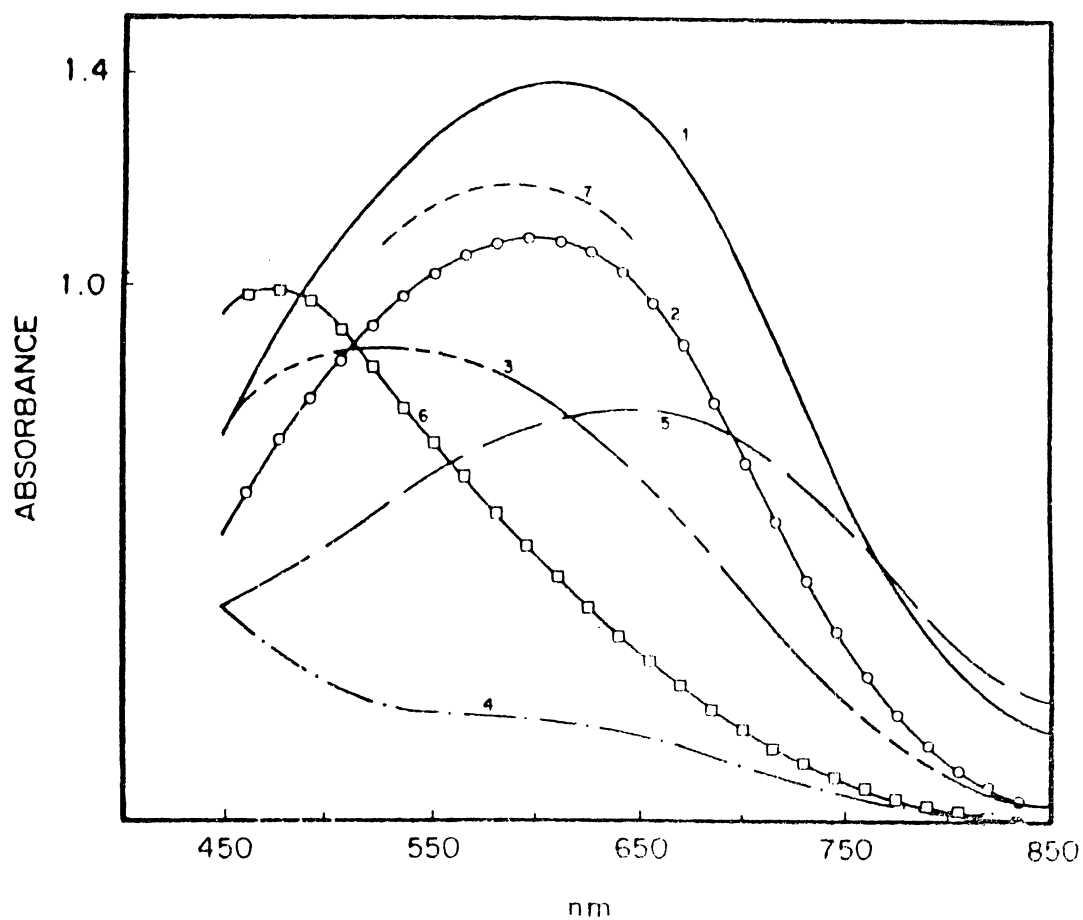


Fig. 38. Análise espectral da reação cromogênica entre xilanas de diversas fontes e o reagente iodo/iodetado em cloreto de cálcio saturado.

(Condições de reação e varredura similares às da fig. 37).

- 1 = heteroxilana de **Mimosa scabrella**
- 2 = heroxilana de **Larix** sp. (lariço)
- 3 = xiloglucana bruta de **Gossypium herbaceum**
- 4 = amostra (2), quimicamente re-O-acetilada
- 7 = heteroxilana de acícula de centeio

outras glicanas referenciais (poli-hexoses):

- 5 = amilose de batata
- 6 = amilopectina de arroz

pleta abolição da interação (curva 4, fig. 38). Mesmo em xilanas nativas, isto é, extraídas sob condições cuidadosas de preservação do conteúdo de O-acetil (e.g., com DMSO; REICHER, CORREA & GORIN, 1984) esta cromogenia anula-se ou é drasticamente reduzida. A interação xilana - iodo é igualmente dependente de um grau mínimo de polimerização da cadeia polissacáridica, visto que a cromogenia é rapidamente perdida, se a heteroxilana é previamente incubada com suco gástrico de *M. paranaquensis* ou meio de cultura (isento de células) de *Streptomyces* sp. (crescimento induzido por farelo de trigo como fonte de carbono). Deste particular, isto é, "descoramento" da reação, pode-se tirar partido para o revelado específico de enzimas do grupo das xilanases. Tal resultado é o que aparece na fig. 39, um zimograma para xilanase purificada de *Streptomyces flavogriseus*. Como detalhado no texto da figura, a banda de enzima corada para proteína (fig. 39-A) corresponde um halo de descoramento (depolimerização) do respectivo substrato (fig. 39-B).

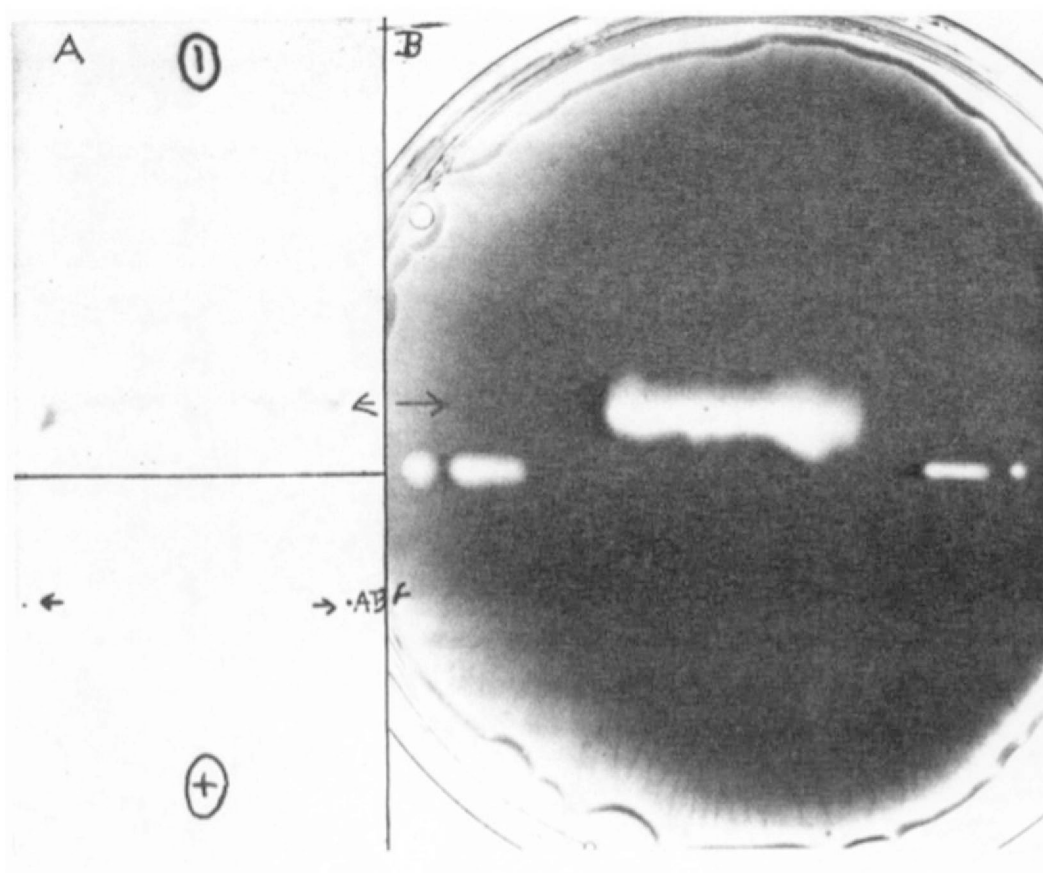


Fig. 39. Zimograma para Xilanase.

1. Amostra: endo- β -(1,4)-xilanase (isoenzima catiônica) de *Streptomyces flavogriseus* purificada por isoeletrofocalização preparativa.
2. Corrida eletroforética em acetato de celulose (tampão acetato sódico 50 mM pH 5,7; 2 mA/tira por 20 min, usando tiras gêmeas).
3. Foto A: revelado de uma das tiras com Coomassie Brilliant Blue (A.B.F. = marcador de corrida, Azul de Bromofenol).
4. Foto B: placa de Gellam Gum (polissacarídeo alternativo ao ágar) contendo xilana de *Larix* sp. a 0,5% tamponado com acetato sódico pH 5,0 250 mM, sobre a qual foi aplicada a réplica da tira de Cellogel, sem revelação. Após incubação por 30 minutos a 30°C a tira foi removida e a superfície da placa foi irrigada com o reativo KI/I₂/CaCl₂ sat. para revelar halos de xilanólise.

Nota: Os pequenos halos marginais sob forma de "ponto de exclamação" inclinado resultam da aplicação de enzima fresca (não eletroforetizada) como controle de estabilidade para a enzima dissolvida na tira de Cellogel.

9 ESTRUTURA FINA DE HETEROXILANAS

9.1 Fragmentação e análise preliminar

A estrutura fina de polissacarídios pode ser abordada tanto pela análise da estrutura intacta (e.g., ressonância nuclear magnética de ^{13}C ; FONTANA, DUARTE, GALLO, IACOMONI & GORIN, 1985), quanto por análise de fragmentação ácida ou enzimática (e.g., hemicelulose "A" de caule de **Mimosa scabrella**, por análise de metilação e degradação de Smith; (CORRÊA, GOMES & GEBARA,). Um protocolo para o último tipo de análise é o constante da fig. 40, com ênfase para o isolamento e caracterização de fragmentos acídicos (FONTANA, GEBARA, BLUMEL, SCHNEIDER, MACKENZIE & JOHNSON, 1988). Complementarmente, o desenho de um sistema solvente (acetato de etila : ácido acético : isopropanol : ácido fórmico : água; 25:10:5:1:15, por volumes) para fins de cromatografia em camada delgada (Silica Gel 60, Merck) permitiu a completa resolução para os componentes mono- e oligossacarídicos mais representativos da estrutura de heteroxilana de **Larix** e assemelhadas: D-xilose e β -D-xilobiose; L-arabinose; ácido 4-O-metil-D-glucurônico (mGlcUr ou mAU) e seu precursor ácido D-glucurônico; ácidos aldobi- e aldo-triurônicos 4-O-metilados a nível do resíduo ácido. No que toca à análise de produtos de digestão enzimática exaustiva de heteroxilanas por ação do suco gástrico de **M. paranaguensis** (fig. 41, linha 2), facilmente se comprova, ao uso de tal sistema cromatográfico, que a atividade de α -(4-O-Metil)-D-Glucuronidase é uma etapa altamente limitante para a hidrólise completa. Para tanto, basta comparar, após fracionamento do hidrolisado total (linha 2; 8 componentes) em

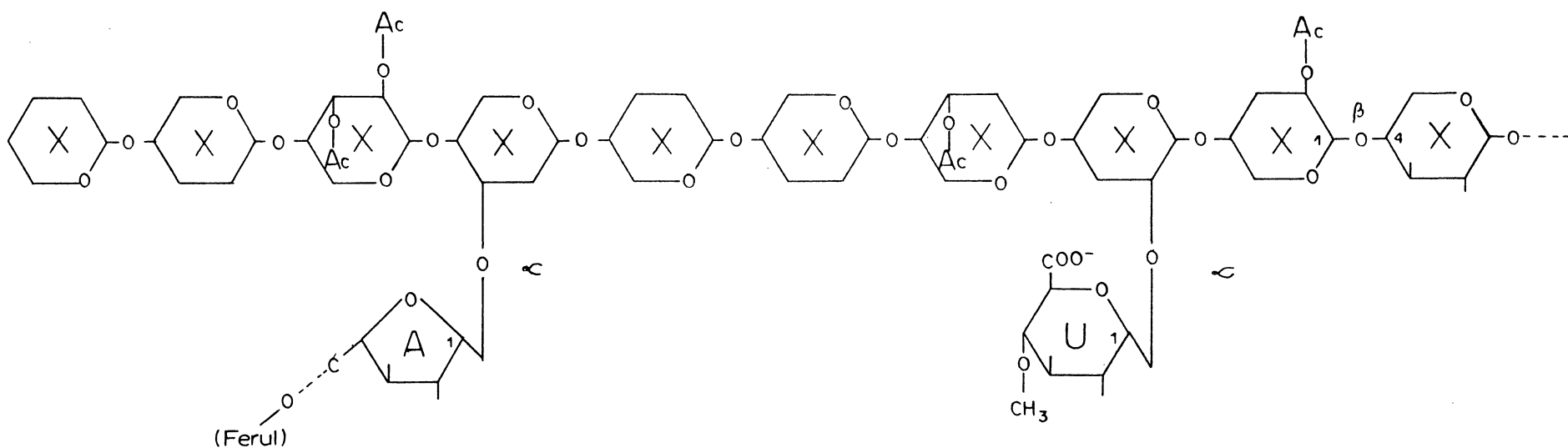


Fig. 39-A. Estrutura parcial esquematizada para hetero-xilana acídica de angiosperma.

X = resíduo xilopiranosil (interconectado no "core" por ligações do tipo β -1,4).

U = resíduo singular de 4-O-metil-D-glucopiranosiluronil (ramificação do "core" por lig. α -1,2) (eventualmente, também na forma 4-O-demetilada).

A = resíduo de L-arabinofuranosil (ramificação do "core" por ligação do tipo α -1,3) (eventualmente, substituído com éster de ácido ferúlico em O-5).

Dowex-2-(forma Ac-) (Segundo uma das opções do esquema da fig. 40), a natureza das sub-frações neutra (linha 3; apenas xilose) e ácida (linha 4; ácido 4-O-metil-glucurônico e ácidos aldo-(n)-urônicos da série homóloga. O poder de resolução do mesmo sistema cromatográfico fica reforçado ao exame da fig. 41-A (linha 2) onde se vê a separação de 12 componentes da série homóloga dos 1,4-xiloligossacarídeos. Uma separação mais nítida e convincente das frações ácida e neutra da digestão de heteroxilanas pode ser vista na fig. 42-A, que corresponde a um eletroforetograma em papel, após corrida em tampão pH 6,5. Toda população neutra de produtos permanece na origem da aplicação (salvo mínimo deslocamento determinado pela eletroendosse ou imprecisão quando previamente se umecta o suporte com tampão). A resolução entre ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-D-glucurônico (linha 7, fig. 42-A) é estreita, mas altamente reprodutível e é determinada pela diferença de pK_a . Membros da série homóloga (e.g., linha 1; ácido 4-O-metil-glucurônico (mGlcUr), aldo-bi (mABU) e aldo-triurônico (mATU) metilados) são facilmente separados e o método obviamente se constitui numa maneira convincente, simples e rápida, de comprovar a ação da α -(4-O-metil)-D-glucuronidase, um dos componentes da família de hidrolases integrantes do complexo xilanolítico do suco gástrico de *M. paranaguensis* (fig. 42-A; linhas 2, 3 e 4). Em sendo de interesse uma análise conjunta de fragmentos tanto ácidos quanto neutros da fragmentação hidrolítica de xilanas (ácida ou enzimática), a eletroforese pode ser conduzida por complexação dos carboidratos com tampão borato sódico. Na fig. 42-B a resolução entre ácido glucurônico (linha 6) e seu

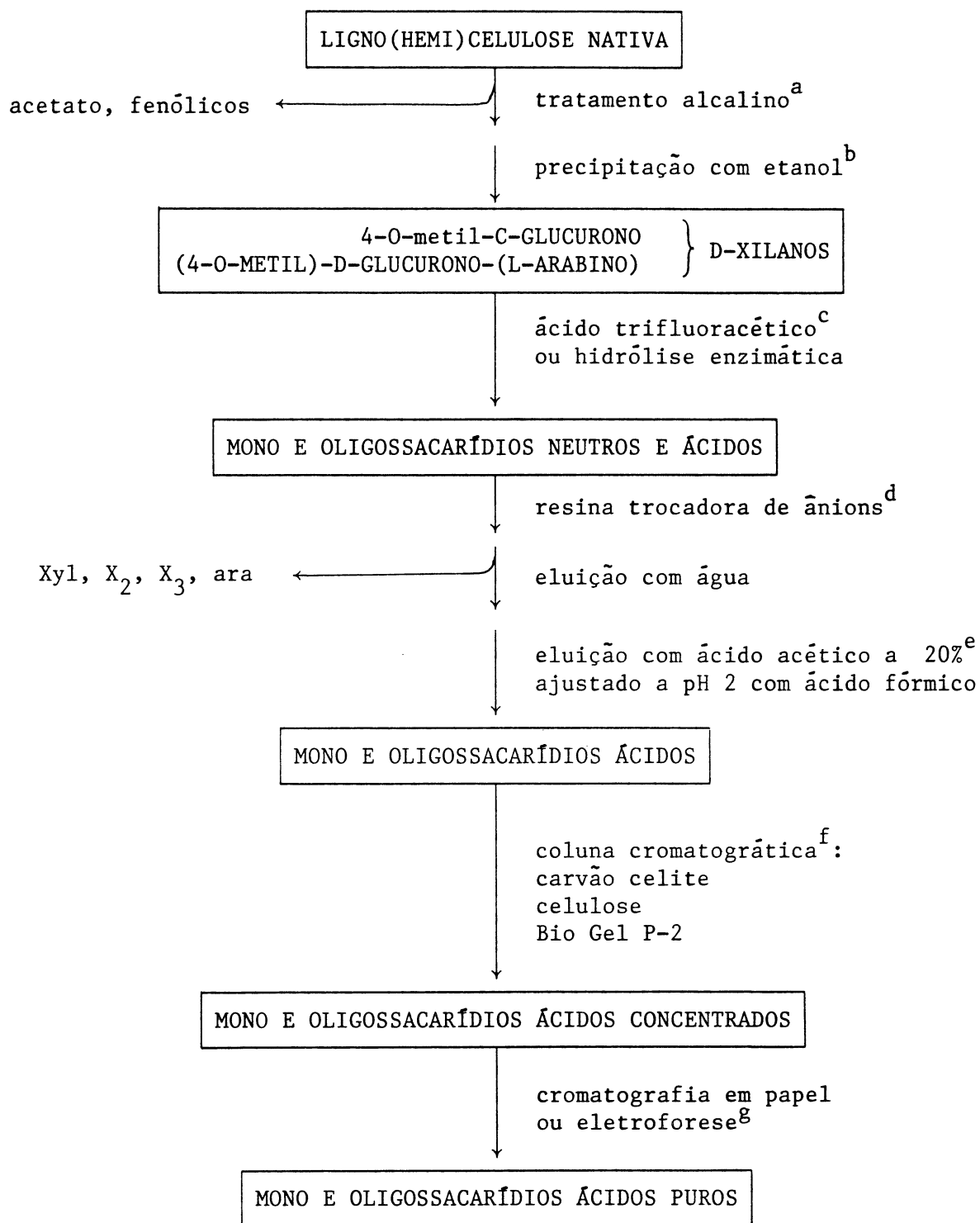


Fig. 40. Etapas seqüenciais na preparação de hêtero-xilanas ácidas e seus derivados acídicos mono- e oligossacarídicos.

(as observações assinaladas de (a) até (f) foram incorporadas em Resultados e Discussão).

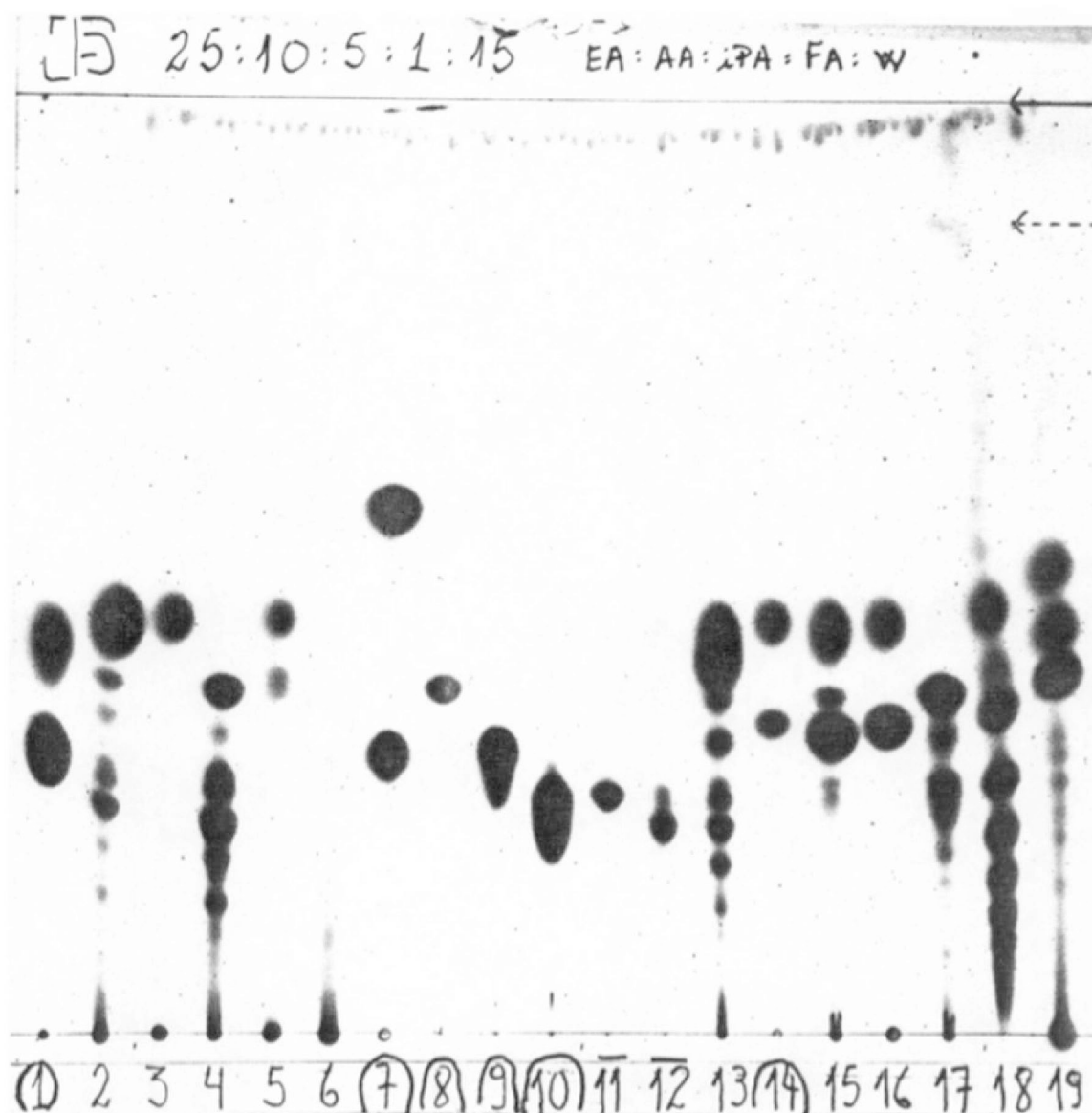


Fig. 41. Análise cromatográfica em camada delgada (TLC) para os mono- e oligossacarídeos componentes da glicofitobiomassa do tipo (ligno)-hemicelulósica: Desenho de uma mistura solvente de alta resolução.

(Cromatoplaça = SG-60 Merck; solvente = acetato de etila : ácido acético : isopropanol : ácido fórmico : água 25:10:5:1:15 em v/v/v/v/v; revelado: orcinol metanólico-sulfúrico a 105°C).

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

- 1 = L-arabinose + celobiose
- 7 = D-glucurono-lactona + ácido D-glucurônico
- 8 = Ácido (4-O-metil)-D-glucurônico (mGlcUr; mAU)
- 9 = Ácido Aldobiurônico metilado (mABU, de xilana de *Larix* sp.)
- 10 = Ácido Aldotriurônico metilado (mATU, de xilana de *Larix* sp.)
- 11 e 12 = Xiloligossacarídeos ácidos de bagaço de cana (hidrólise trifluoracética)
- 14 = D-xilose + xilobiose (X₂)

Amostras:

- 2, 3 e 4 = digerido total, fração neutra e ácida, da ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* sobre xilana de *Larix* sp.
- 5 e 6 = frações neutra e ácida da digestão de farelo de trigo com a enzima de caracol.
- 15 e 16 = frações total e ácida da digestão de xilana de *Larix* com xilanase bruta de estreptomiceto.
- 18 = xiloligossacarídeos neutros de *Mimosa scabrella* (hidrólise trifluoracética) (notar pequena contaminação com arabinose).

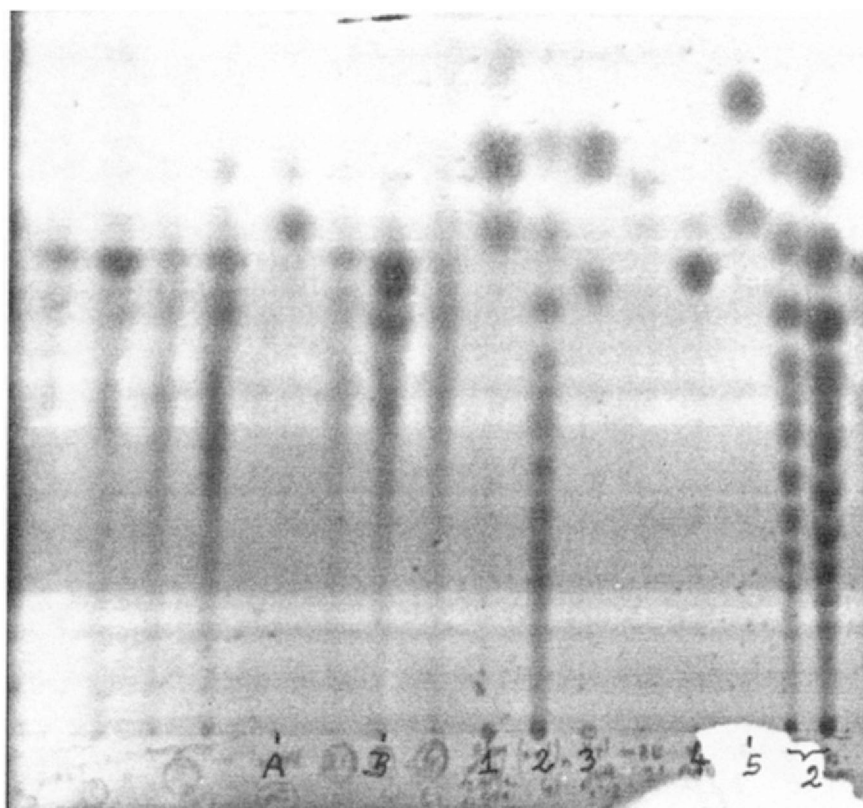


Fig. 41-A. Cromatograma em camada delgada (TLC) para mono- e oligossacarídeos neutros e ácidos de hidrólise de heteroxilana.

corrida: similar à da fig. anterior, com pré-desenvolvimento de meia distância antes da corrida final completa.

Amostras:

- A = ácido (4-O-metil)-D-glucurônico (obtido a partir de eletroforese preparativa da digestão exaustiva de hemicelulose "A" de caule de *M. scabrella* ou bracatinga).
 B = fração ácida da digestão acima (obtida por retenção em Dowex-2, forma Acetato, seguida de eluição com ácido acético 20% pH 2 por adição de ácido fórmico).

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

- 1 = 4-O-metil-D-glucose + glucose
 2 = D-xilose + D-xiloligossacarídeos da série β - 1,4
 3 = D-xilose + ácido D-glucurônico
 4 = ácido (4-O-metil)-aldobiurônico
 5 = L-rhamnose + L-arabinose

(Notar a resolução para 11 componentes da série homóloga de xiloligossacarídeos e a clara diferenciação entre contrapartes 4-O-metiladas de D-glucose (1) e ácido glucurônico (A e 3) por migração e reação colorida ao reagente revelador: orcinol/sulfúrico).

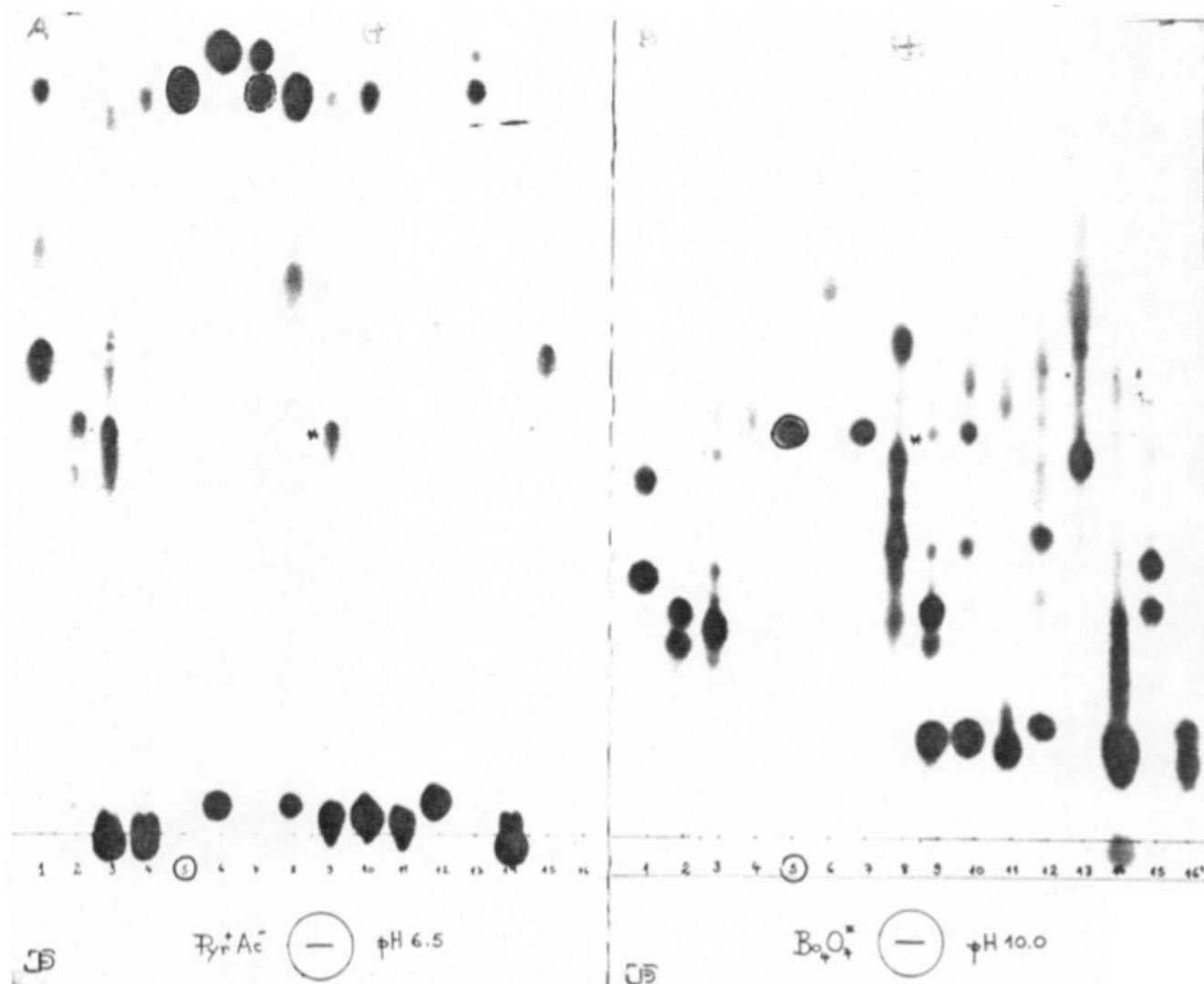


Fig. 42. Resolução eletroforética de alta voltagem em papel para os principais mono- e oligossacarídeos neutros e ácidos resultantes da hidrólise ácida ou enzimática de fibriomassa ligno-hemicelulósica.

papel: Whatman nº 1, tampões de corrida: (A) acetato (0,4%) de piridina (10%) pH 6,5 e (B) tetraborato de sódio 50 mM com pH ajustado para 10 com NaOH.

corridas: (A) 1,8 kV / 20 mA por 60 min.
(B) 0,9 kV / 35 mA por 50 min.

revelação: nitrato de prata / hidróxido de sódio.

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

- 1 = ácidos mGlcUr, mABU e mATU
- 5 = ácido mGlcUr (4-O-metil-D-glucurônico)
- 6 = ácido D-glucurônico + xilose
- 7 = mistura dos ácidos glucurônico e 4-O-metil-glucurônico

Amostras:

- 8 = fração ácida bruta da hidrólise trifluoracética da hemicelulose A de caule de *Mimosa scabrella* (bracatinga)
- 13 = idem para hemicelulose total de farelo de trigo
- 15 = fração ácida da hidrólise fosfórica (pH 2) de bagaço de cana a 10 atm. (-185°C) por 5 min
- 2, 3 e 4 = cinética de tempo (1 a 12 h) na hidrólise enzimática de xilana de *Larix* (amostras 2 e 3) ou hemicelulose total de farelo de trigo (amostra 4), usando enzima de caracol (*M. paranaguensis*).
- 16 = serragem de vidoeiro ("birchwood") submetida a "steam explosion".

análogo 4-O-metilado (linha 5) amplia-se muito, pois o bloqueio da hidroxila em C-4 limita a complexação com borato, diminuindo portanto o caráter aniônico do derivado metilado e finalmente sua movimentação pró-anódica.

9.2 Metodologia para a caracterização das enzimas complementares do complexo xilanolítico: α -(4-O-Metil)-D-GLUCURONIDASE e β -D-XILOBIASE (β -D-XILOSIDASE)

A detecção de xilobiose (ou este dissacarídeo acompanhado de membros superiores da série homóloga dos β -1,4-xilossacarídeos) bem como do dissacarídeo ácido aldobiurônico (ou este acompanhado de membros superiores da série metilglucurônico-(xilose)_n) se combinada à ausência de D-xilose e ácido (4-O-metil)-glucurônicos livres, quando da análise de digestões enzimáticas de heteroxilanas, seria um indicativo claro da ausência das atividades complementares de β -xilobiase (β -xilosidase) e α -(4-O-metil)-glucuronidase no complexo xilanolítico. Em outras palavras, a ação enzimática básica das endo- β -1,4-xilanases estaria limitada por um lado pela impossibilidade de monomerização do "core" neutro (xilose)_n ---X--->"n" xilose) e por outro pelo acúmulo dos resíduos xilosil comprometidos com o substituinte ácido (o que alcança, em parte, também alguns resíduos vizinhos mBlcUr-(xilose)_n ---X--> metil-glucurônico + "n" xilose). Na situação diametralmente oposta, i.é., atividade plena para todos os componentes, encontrar-se-ia, como produtos finais de hidrólise, apenas D-xilose e ácido (4-O-metil)-glucurônico livres (eventualmente também L-arabinose, ácido acético e ácido ferúlico, se o substrato correspondesse a uma heteroxilana nativa como a

retratada na fig. 39-A). O usual para sistemas xilanolíticos é encontrarem-se situações intermediárias com a co-produção de monômero e dímeros (e ou oligômeros) tanto de natureza ácida, quanto neutra. Para a detecção e quantificação dos componentes principais (neutros = D-xilose, β -D-xilobiose; L-arabinose; ácidos = glucurônico e 4-O-metil-glucurônico, aldobiturônico e oligossacarídeos superiores) a cromatografia em fase gasosa (GLC) dos derivados de mono- e dissacarídeos do tipo oxima-persililados (KNAPP, 1979) oferece excelente resolução tanto quando operada em coluna convencional SE-30 (tabela 6 e fig. 43), quanto em coluna capilar OV-17 (tabela 6 e fig. 43-A). Uma corrida de 13 minutos (mesmo em condições isotérmicas) oferece ótima resolução para os componentes ácidos e neutros principais (monômeros e dímeros; fig. 43). Um procedimento elegante para a caracterização do derivado 4-O-metilado do ácido D-glucurônico (que ocorre quase que como substituinte ácido exclusivo na xilana (hemicelulose A) de caule de *Mimosa scabrella* ou bracinga; (CORREIA, 1985) é sua prévia conversão a 4-O-metil-D-glucose para posterior análise como alditol-peracetilado em coluna de OV-225. O procedimento envolve as seguintes etapas:

- a) esterificação do grupo carboxila com metanol (refluxo do suposto ácido 4-O-metil-D-glucurônico com metanol-ácido clorídrico (1%, seco);
- b) carboxi-redução do éster metílico com boridreto sódico, mantendo-se o pH em torno da neutralidade com o auxílio de tampão;
- c) hidrólise clorídrica suave (HCl 1 M aquoso, 80 C, 1 hora) do grupo 1-O-metil adicional (resultante da etapa a);

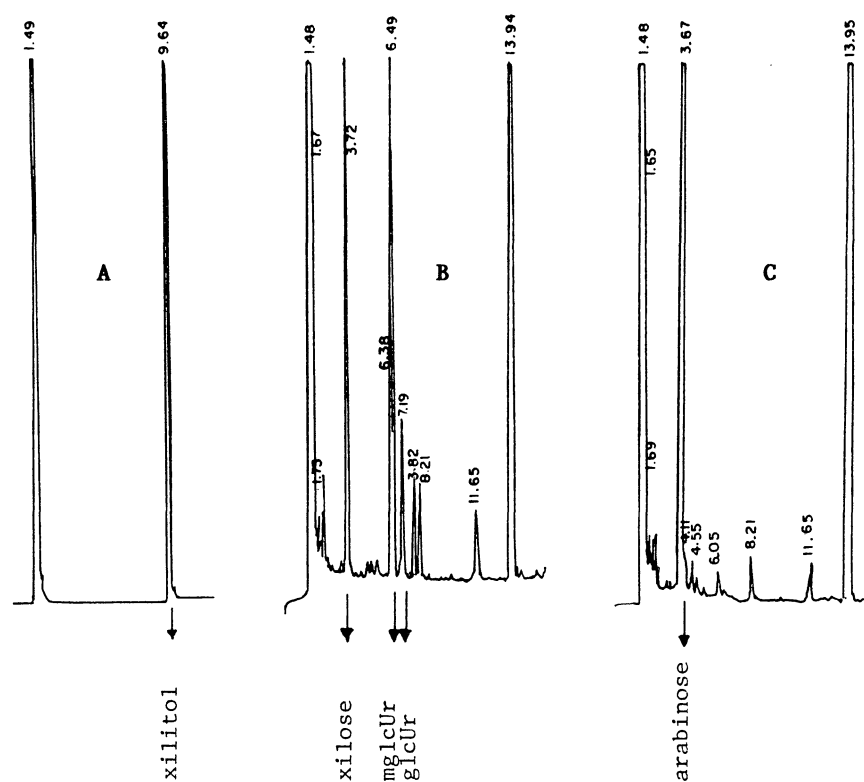


Fig. 43-A. Resolução cromatográfica em fase gasosa (GLC) para diferentes derivados de D-xilose e outros monossacarídeos constituintes de hetero-xilanas.

Coluna : OV-17 (capilar em sílica fundida)

Programação : 180°C (2') ---: 4°C/min ---: 240°C

Derivados e tempos de retenção (R_t)

- (A) xilitol-penta-acetato (9.64)
- (B) oximas per-sililadas de D-xilose (3,72), ácido 4-O-metil-D-glucurônico (6,49), ácido glucurônico (7,19)
- (D) oxima per-sililada de L-arabionose (3,67)

(Notar nas corridas (B) e (C) a alta reprodutibilidade do padrão interno de oxima per-sililada de fenil-beta-D-galactopiranosídeo)

($R_t(s)$ = 13,94 e 13,95).

TABELA 6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM FASE GASOSA (GLC) PARA MONO- E DISSACARÍDIOS NEUTROS E ÁCIDOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis*) OU ÁCIDO TRIFLUORACÉTICA DE HETEROXILANAS.

TIPO DE COLUNA	R _T (min)					
	Ø-β-gal _p	xil	mglcUr	glcUr	X ₂	mABU
OV-17 (capilar)	13,9	3,7	6,5	7,2	15,0	18,2
SE-30 (convencional)	6,5	1,7	2,6	3,5	9,2	11,6

Condições térmicas de corrida:

OV-17 : isotérmica por 2 min a 180°C, seguindo-se programação a 4°C / min até 240°C.

SE-30 : isotérmica por 4 min a 180°C, seguindo-se programação a 32°C / min até 252°C.

(demais condições, veja-se em Materiais e Métodos).

Ø-β-gal_p = fenil-beta-D-galactopiranosídeo (padrão interno)

xil = D-xilose

mglcUr = ácido 4-O-metil-D-glucurônico

glcUr = ácido D-glucurônico

X₂ = xilobiose

mABU = ácido (4-O-metil)-aldobiourônico

Forma dos derivados de açúcares:

oximas per-sililadas com N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida.

- d) redução do grupamento redutor gerado em C-1 mediante nova etapa redutiva com boridreto sódico;
- e) per-acetilação com a mistura anidrido acético-piridina a quente.

O resultado da cromatografia em fase gasosa (GLC) é o da fig. 44-A e o produto da conversão (4-O-metil-glucitol peracetato) apresenta um tempo de retenção intermediário entre aqueles dos padrões de manitol- e galactitol-peracetato. A caracterização cabal do açúcar ácido monomérico liberado a partir de heteroxilana de *Larix* sp. por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* também pode ser obtida por técnica mais sofisticada: a cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS). O resultado da fig. 45 é ilustrativo deste procedimento como aplicado a derivado do tipo oxima-persililado. Os fragmentos 568 (M-15) e 584 (M+1) resultantes da técnica de ionização química na presença de metano comprovam que a fragmentação resulta do produto inicial: a oxima persililada do ácido (4-O-metil-D-glucurônico).

Um instrumento analítico de uso contemporâneo que se caracteriza pela rapidez e que dispensa a prévia de derivatização da amostra é a HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão. A fig. 46 ilustra este tipo de análise, quando aplicado à depolimerização parcial de xilana acídica de caule de bracinga por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* dois monômeros representativos da estrutura são caracterizáveis: D-xilose ($R_t = 9.94$ e 9.98) e ácido 4-O-metil-D-glucurônico ($R_t = 8.11$ e 8.06). Embora a coluna HPX-87-H₊ permita clara resolução entre oligossacarídeos (R_t na faixa de 6 a 7 minutos) e os monômeros antes referidos, a mesma padece da limita-

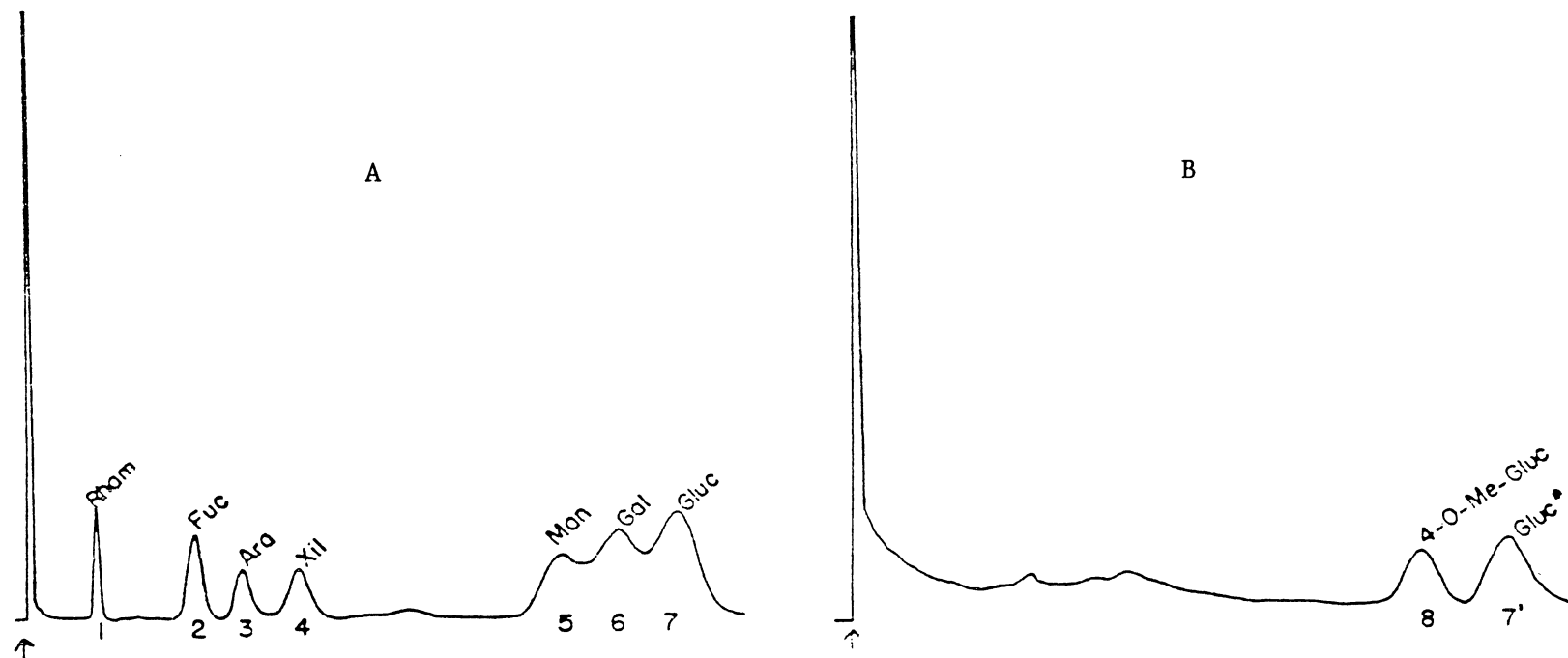


Fig. 44. Análise cromatográfica em fase gasosa (GLC) para caracterização do componente ácido da heteroxilana de caule de *Larix* sp. (laríço), liberado por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(Coluna: Ov-225, isotérmica a 195°C).

(A) = mistura de padrões de ramnitol, fucitol, arabinitol, xilitol, manitol, galactitol e glucitol per-acetilados.

(B) = mistura do padrão de ácido D-glucurônico (7') e monossacarídeo ácido de *M. scabrella* (8) previamente tratados com metanol-clorídrico, carboxi-reduzidos, hidrolizados, reduzidos e per-acetilados.

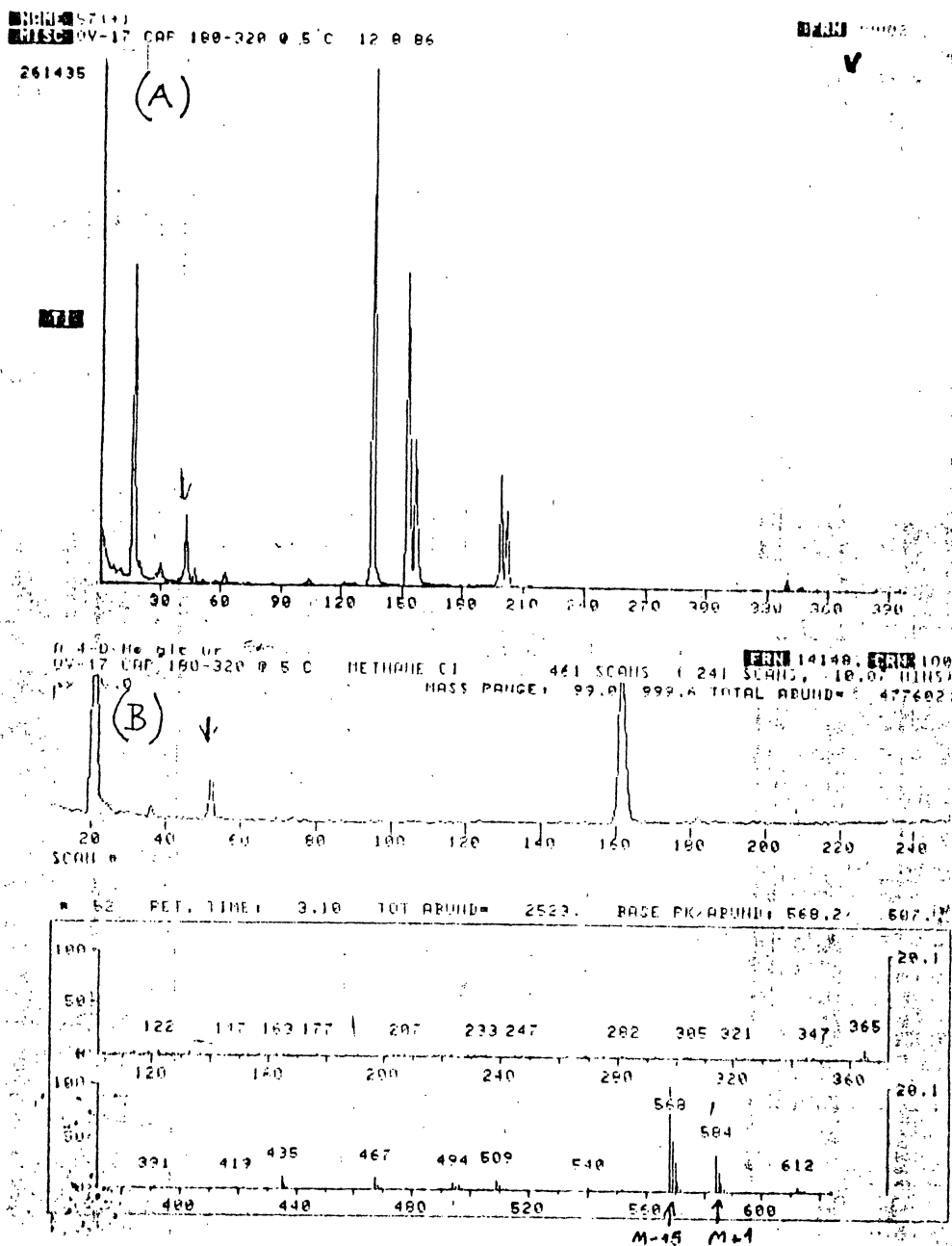


Fig. 45. Cromatografia gás-líquido (GLC) (A) e caracterização por espectrometria de massa (GLC-MS) do ácido 4-O-metil-D-glucurônico liberado de heteroxilana de *Larix* sp. por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (B).

coluna: capilar (sílica fundida) OV-17 (180 a 320°C, 5°C/min).
 espectro de massa: por ionização química com metano.
 derivado: oxima per-sililada com BSTFA.

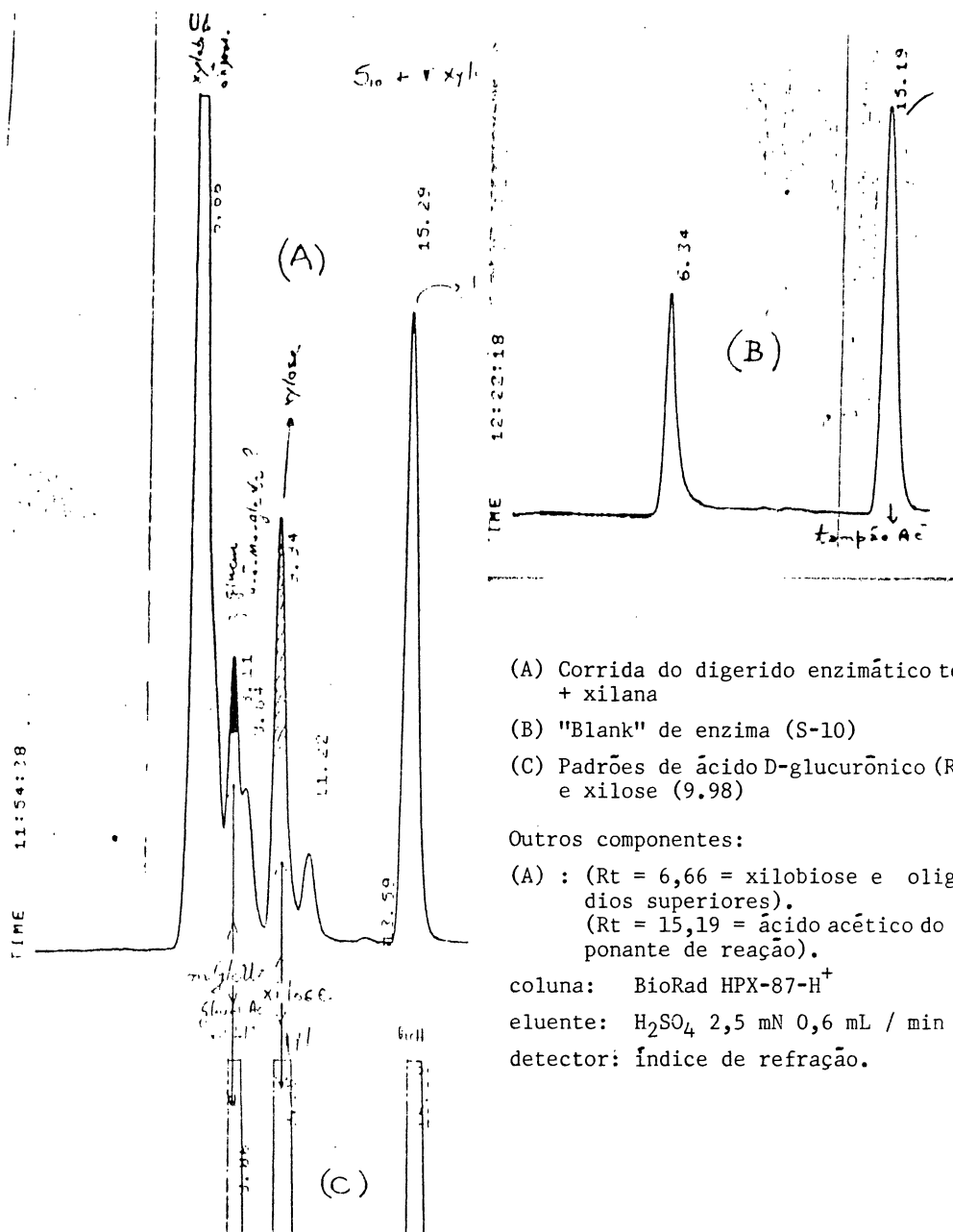


Fig. 46. Identificação dos monossacarídeos ácido e neutro da hidrólise enzimática de xilana de *Mimosa scabrella* com suco gástrico de *M. paranaguensis* mediante cromatografia líquida de alta pressão (H.P.L.C).

ção de não diferenciar o ácido glucurônico de seu derivado 4-0-metilado. No exemplo da fig. 47, tem-se a vantagem da eluição utilizando-se água como solvente (coluna HPX-87-P) e melhor resolução entre dissacarídeos e vários monossacarídeos (e.g., proporção apurada para os componentes neutros de farelo de trigo, tratados com suco de caracol na ordem celobiose : glucose : xilose : arabionose = 2,8:16,3:43,7:11,3%), mas a mesma limita-se à análise de sacarídeos neutros (resina, envolvendo "counter ion" do tipo metal pesado e, portanto, com retenção de componentes ácidos devido à troca iônica).

Na comparação do desempenho hidrolítico do suco gástrico de **M. paranaguensis** (fig. 48, lado esquerdo) e das hidrolases brutas de meio de cultivo de **Streptomyces olivochromogenes** (mesma figura, lado direito), ambos atuando separadamente sobre xilana ácida de lariço, quando o exame do curso da reação é avaliado cromatograficamente em tempos curtos de incubação (no caso, 2 horas), pode-se verificar claramente duas indicações diferenciais: ao suco corresponde uma maior formação de monômero (D-xilose), enquanto ao estreptomiceto corresponde um acúmulo de dissacarídeo (xilobiose). Esta situação parece independe da faixa de pH testada (3,5 até 7,5) e claramente mostra que os sistemas xilanolíticos comparados diferenciam-se pelo conteúdo de uma enzima complementar: a β -D-xilobiase (xilosidase), menor no caso do estreptomiceto. Mesmo quando se estende o tempo de incubação (comprovável na fig. 48-A pela completa ausência de oligossacarídeos com DP acima da xilotriose), permanece a situação de ser a xilobiose o produto principal da ação das enzimas de **Streptomyces** sp. Na fig. 48-A (resolução cromatográfica melhorada por corridas parciais

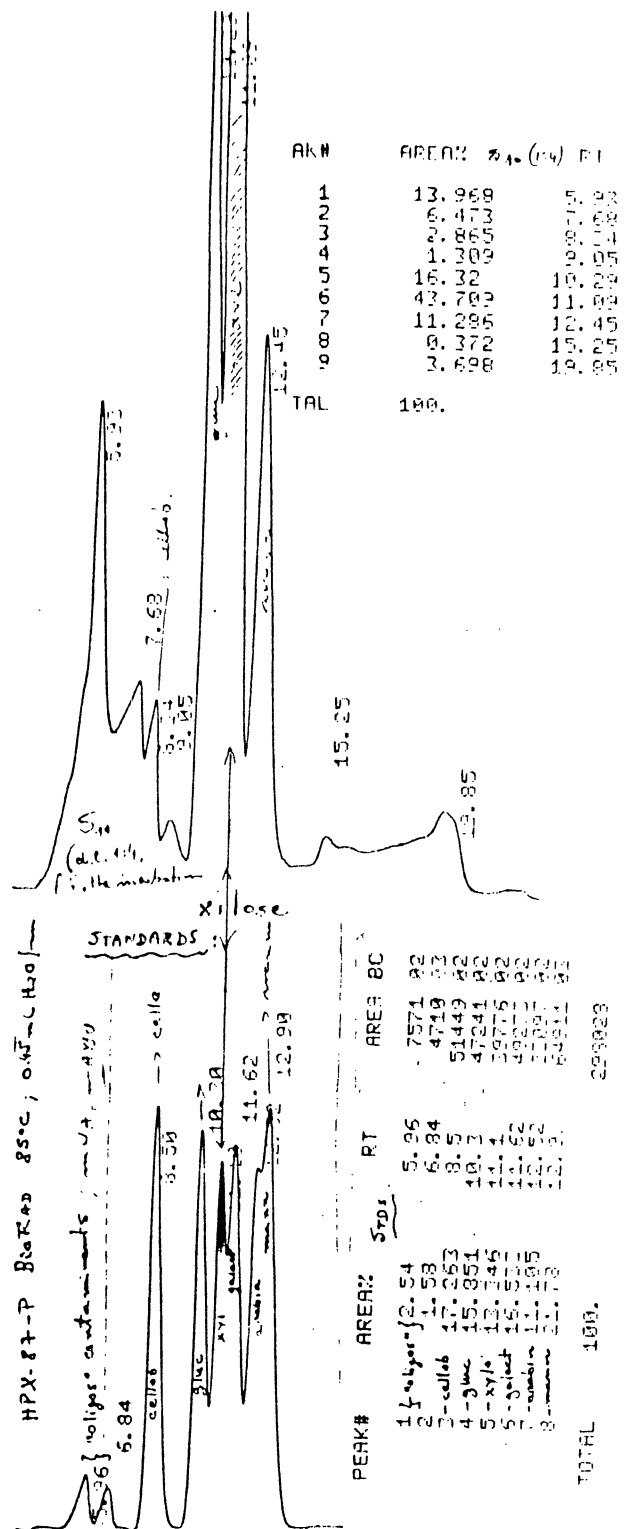


Fig. 47. Resolução dos componentes da digestão de farelo de trigo com enzimas do suco gástrico de *M. paranaguensis* por cromatografia líquida de alta pressão.

- (A) incubado total de suco gástrico (S-10) com farelo de trigo (isento de amido).
 (B) mistura monossacarídica padrão (glucose, xilose, galactose, arabinose e manose) + celobiose.

coluna : BioRad HPLC HPX-87-P (metais pesados), eluída em H₂O a 85°C e fluxo de 0,45 ml/min.
 detector : índice de refração.

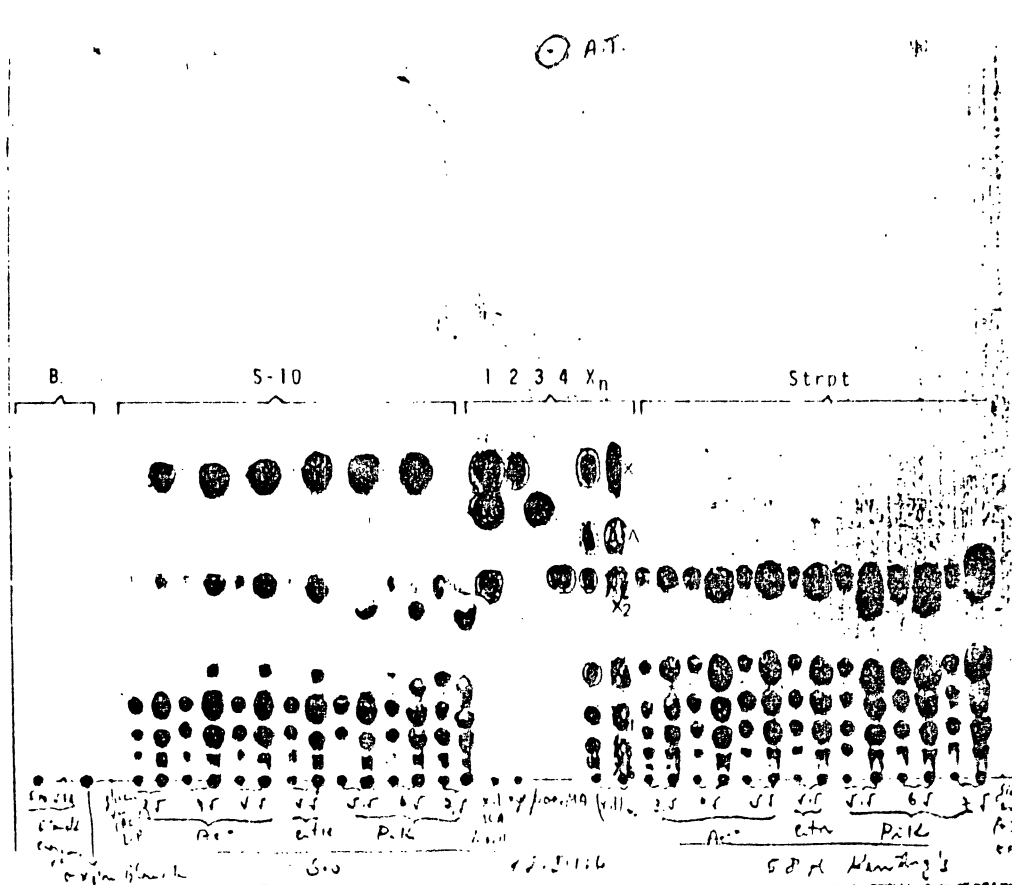


Fig. 48. Cromatograma de camada delgada (TLC): diferenciação entre os sistemas xilanolíticos do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10) e dos meios de cultivo de *Streptomyces* sp.* induzido por substratos ligno-hemicelulósicos (Strpt).

substrato: α -4-O-metil-D-glucuro- β -D-xilana de *Larix* sp.

(incubação de 2 hs)

Cromatoplaca: Sílica-Gel microparticulada CanLab

Solvente : Acetato de Etila:Acético Acético:Ácido Fórmico:Água

Revelador : Orcinol metanólico-sulfúrico

Amostras:

B = "Blanks" de enzimas ou substrato

S-10 = incubações do substrato com suco gástrico de *M. paranaguensis* em tampões de acetato, citrato e fosfato de pH 3,5 até 7,5.

Strpt = idem, mas com meio de cultivo (isento de células) de *S. olivochromogenes* (*) após indução de xilanas por farelo de trigo como fonte de carbono.

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

1 = D-xilose, ác. (4-O-metil)-D-Glucurônico (mAU), ác. D-glucurônico; 2 = D-xilose; 3 = mAU; 4 = ác. D-glucurônico (UA)

X_n = β -1,4-D-xiloligosacarídeos (contaminados com L-arabinose (A))

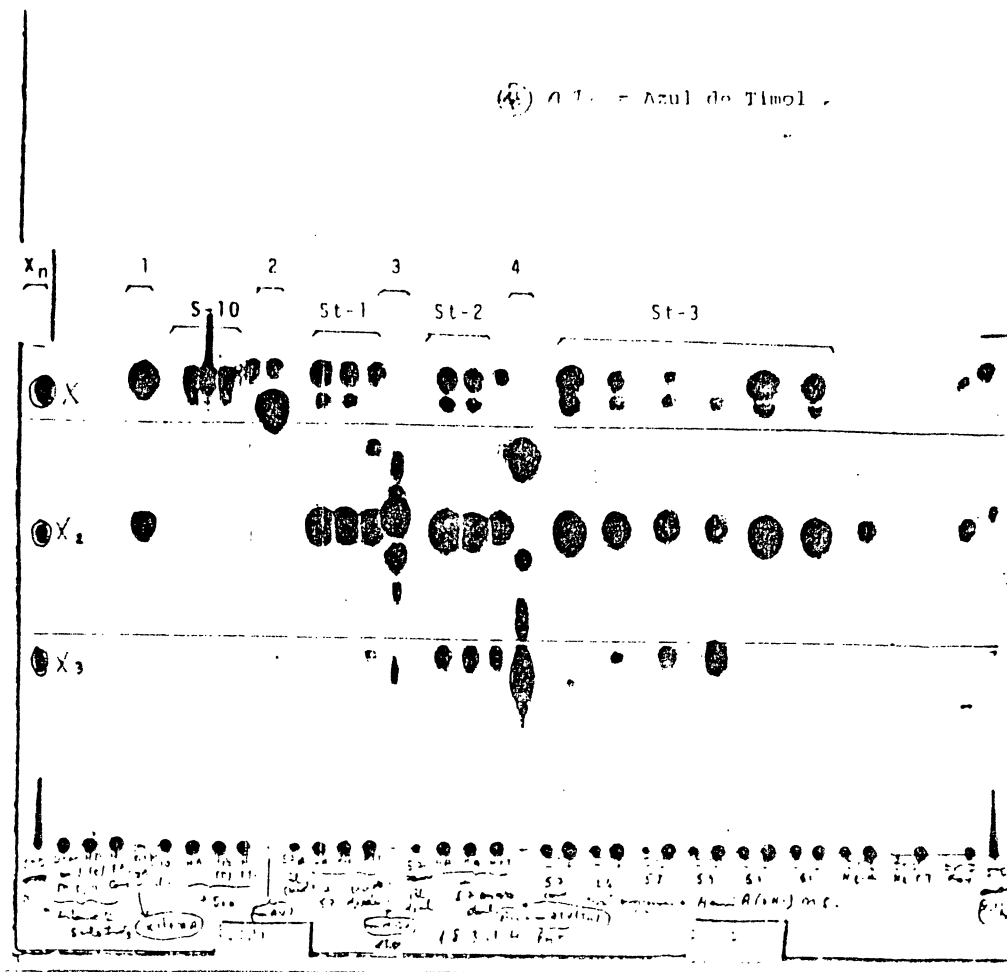


Fig. 48-A. TLC: diferenciação dos complexos xilanolíticos do suco gástrico de *M. paranaensis* e *Streptomyces* spp.; detecção do componente α -(4-O-metil)-D-glucuronidase e atividade de β -D-xilosidase (S-10).

(condições: as da fig. 48, mas incubação de 24 h.)

Amostras:

S-10 = incubações do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* com hemice-lulosos de caule de *M. scabrella* (bracatinga) (A, B e Total).

St-1 = incubações do complexo xilanolítico de *S. olivochromogenes* (induzido em hétéro-xilana de acícula de centeio) com os mesmos substratos (enzimas brutas do meio de cultivo).

St-2 = idem, idem, com enzimas dializadas (notar acúmulo de xilotriose).

St-3 = idem, idem; enzimas de *S. flavogriseus* e cepa 45-CD.

Padrões: (em ordem decrescente de migração):

Xn = D-xilose, β -D-xilobiase e β -D-xilotriose

1 = D-xilose + ác. D-glucurônico

2 = ác. (4-O-Me)-D-glucurônico

3 = ác. (4-O-Me)-Aldobiurônico

4 = L-arabinose + ác. (4-O-Me)-Aldotriurônico

Notar:

a) maior atividade de β -D-xilosidase (β -D-xilobiase) no complexo xilanolítico dos estreptomicetos.

b) maior atividade de α -(4-O-Me)-D-glucuronidase no complexo xilanolítico dos estreptomicetos.

TABELA 7. ESTABILIDADE DO COMPLEXO XILANÁSICO DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis* EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO DE ARMAZENAMENTO.

	G			CD			L		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1. HA-cMs (Hemicelulose "A" - caule de <i>M. scabrella</i>)	75	95%	77%	79	100%	81%	67	85%	69%
2. HN-BG (Hemicelulose nativa - bagaço de cana)	96	99%	99%	97	100%	100%	92	95%	95%
3. LWX-O-Ac (Xilana de <i>Larix</i> ; re-O-Acetilada)	56	96%	58%	58	100%	60%	53	91%	55%

G = suco gástrico fresco (S-10, sobrenadante de 10.000 rpm (7.800 g)) mantido em banho de gelo por 24 horas.

CD = suco gástrico congelado (banho de gelo + NaCl + acetona) e descongelado (operação repetida 3 X).

L = suco gástrico congelado, liofilizado e ressuspenso em água destilada perfazendo o volume original.

a = μg do poder redutor liberado/ensaio

b = atividade relativa entre as três preparações frente ao mesmo substrato.

c = atividade relativa entre todos os tratamentos de enzima e todos os substratos (reportado àquele de maior valor).

Ensaio padrão:

I) concentração de enzima, de substrato (saturante dentro do limite de solubilidade) e pH (tampão acetato sódico 50 mM pH 5,5) dentro das respectivas condições ótimas.

II) tempo de incubação: exatamente 10 min a 40°C; parada de reação pela adição direta do reagente alcalino de Somogyi.

e sucessivas) é que ambos os sistemas xilanolíticos resultam na co-produção de teores semelhantes de ácido metil-glucurônico livre ("spot" logo aquém da D-xilose) e que, portanto, não é a 4-O-metil- α -D-glucuronidase a enzima limitante ao sistema hidrolítico de quaisquer dos dois modelos (notar, p.ex., a completa ausência do dissacarídeo aldobiurônico na linha S-10).

Em termos de enzimologia aplicada, a utilização do suco gástrico de **M. paranaguensis** ficaria condicionada a que procedimentos padrões de preservação fossem alternativas válidas ao material fresco mantido em geladeira (G). Duas destas alternativas seriam o congelamento (CD) e a liofilização (L). Na tabela 7, pode-se observar o desempenho xilanolítico destas três alternativas de preservação da preparação enzimática quando ensaiadas (em tempos muito curtos de incubação frente a três distintos substratos: hemicelulose A de caule de bracatinga (HA-cMs), hemicelulose nativa de bagaço de cana (HN-BC) e heteroxilana re-O-acetilada de lariço (LWX-O-Ac). Na medida comparativa entre todos os nove ensaios os dois melhores resultados de preservação de atividade correspondem às preparações G e CD quando ensaiadas contra o substrato hemicelulósico de cana, enquanto o pior (mesmo assim correspondendo a uma preservação de 64%) corresponde à preparação L ensaiada contra xilana de bracatinga. Na comparação individualizada das três preparações frente a cada substrato separadamente (valores de atividade xilanásica expressos em cada linha horizontal), o melhor desempenho ocorreu sempre para a preparação congelada (mesmo se descongelada por 3 vezes), mas o desempenho das outras duas variantes de conservação (gelada ou liofilizada) ex-

cedem também os 90%, exceção única à preparação liofilizada (L) ensaiada contra xilana de bracinga, como antes já foi comentado. Resumidamente, pode-se concluir que quaisquer das alternativas de preservação do suco gástrico são válidas, a adoção a ser determinada pela conveniência (e.g., necessidade de transporte a longa distância).

Conforme antecipado nas tabelas 2 e 3 e fig. 6 (picos I e II), o suco gástrico de **M. paranaguensis** se caracteriza por elevado conteúdo proteico e forte pigmentação marrom-escuro de natureza francamente aniônica (tab. 8). Dois tipos de tratamentos foram levados a cabo com o objetivo inicial de se tentar promover uma eliminação da pigmentação nativa: a precipitação fracionada com sulfato de amônio saturado (SA) ou com acetona (AC), ambas a frio (banho de gelo) (tabela 9). Já com 0,5 volume de qualquer dos dois agentes precipitantes, a maior parte do conteúdo proteico é recuperada no precipitado e representa de 65 a 79% da atividade xilanásica inicialmente presente (medidas contra dois diferentes substratos e comparadas à enzima-controle, simplesmente diluída). Esta satisfatória recuperação inclui, além da xilanase, também a atividade de β -xilobiase (β -xilosidase), visto que o ensaio cromatográfico dos incubados (fig. 54) mostra claramente tanto para a fração de sulfato de amônio, quanto para a de acetona (ambas com meio volume de agente precipitante) a presença de xiloligossacarídeos (portanto, atividade de endo-xilanase) quanto à ausência de xilobiase (portanto, atividade de xilobiase), além, é claro, de maior quantidade de xilose livre. Ademais, no eletroforetograma para produtos ácidos da fig. 53, os incubados destas mesmas frações com heteroxilana acídica de **Larix** (linhas

TABELA 8. ATIVIDADE XILANÁSICA DE SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis*: COMPARATIVO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

MÉTODO DE FRACIONAMENTO / FRAÇÕES	PROTEÍNA (mg / ml)	ATIVIDADE XILANÁSICA RELATIVA*		
		σ LWX	(substratos)	HA-cMs
1. Troca aniônica				
1.1 DEAE - BioGel A : eluato aquoso	1,36	0,64		0,21
1.2 DEAE - BioGel A : eluato c/ AC.NH_4^+ 1 M	3,10	0,16		0,02
2. Enzima-controle				
(não cromatografada; dil. 20 X c/ Acetato de Amônio 1 M)	4,80	0,13		0,04
3. Troca catiônica				
3.1 CM - BioGel A : eluato aquoso	4,00	0,36		0,11
3.2 CM - BioGel A : eluato c/ Ac. NH_4^+	1,08	0,19		0,01

Volumes idênticos de cada fração (diluição teórica de 20 x; V_t de cada coluna = 10 ml e cada eluição feita com exatamente 2 x V_t) após prévia e repetida diálise, foram submetidos ao ensaio-padrão para atividade xilanásica separadamente com os dois substratos (σ LWX = xilana de *Larix* sp.; HA-Ms = hemicelulose "A" de (caule de) *Mimosa scabrella*).

* Os valores de "Atividade Xilanásica Relativa" correspondem aos valores de poder redutor liberado (= $A_{535\text{nm}}$; todos dentro da faixa linear do método) divididos pelo respectivo valor de conteúdo proteico de cada fração.

(Outros detalhes, ver em Materiais e Métodos)

A-7 e A-9, respectivamente) mostram a liberação de ácido 4-O-metil-glucurônico livre), comprovando-se a co-precipitação de uma segunda hidrolase complementar de interesse: a respectiva glucuronidase. Quando os sobrenadantes da primeira precipitação fracionada são seqüencialmente tratados com mais meio volume de agente precipitante, recupera-se obviamente um conteúdo proteico (e enzimático) muito menor. Isto explica porque nos ensaios subseqüentes, usando-se alíquotas iguais de cada fração enzimática (cujos volumes foram normalizados para um mesmo valor), a atividade xilanásica relativa ("atividade específica") aparece com resultado superior sempre no primeiro precipitado com sulfato de amônio ou acetona (tabela 9; itens 1.1 e 3.1). Contudo, o exame cromatográfico (fig. 54; linhas 1,0-SA e 1,0-AC) e eletroforético (fig. 53; linha A-8) dos respectivos incubados claramente mostra diminuição da atividade de xilobiase (notar a relação xilobiase > xilose, na linha 1,0-SA, fig. 54) ou sua ausência (xiloligossacarídeos >>> xilose, xilobiase; linha 1,0-AC, da mesma figura). O mesmo é válido para a atividade de glucuronidase (notar acúmulo de tetra e pentassacarídeos ácidos na linha A-8, fig. 53).

Com relação ao objetivo inicial do experimento, pode-se adiantar que nenhum dos tratamentos adotados resulta na desejada obtenção de uma fração isenta de pigmentos, apesar de que estes supostamente tenham peso molecular em faixa muito menor que aquela própria do material proteico). Esta situação, pode-se antecipar, repetiu-se quando da filtração molecular do suco nativo em colunas cromatográficas de diferentes géis para faixas crescentes de peso molecular (poliacrilamida P-160, dextrana Sephacryl S-200 ou agarose 2B), nas quais uma parcela

TABELA 9. RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis* APÓS FRACIONAMENTO PROTEICO COM SAL OU SOLVENTE ORGÂNICO.

MÉTODO DE FRACIONAMENTO / FRAÇÕES	PROTEÍNA (mg / ml)	ATIVIDADE XILANÁSICA RELATIVA*		
		σ LWX	(substratos)	HA-Ms
1. Precipitação com Sulfato de amônio sat.				
1.1 Precipitado com 0,5 vol.	39,9	4,44		2,18
1.2 Precipitado com 1,0 vol.	5,9	8,13		6,02
1.3 Sobrenadante final	4,4	1,14		0,79
2. Enzima-controle (não tratada; dil. ~ 1 : 3)	37,0	5,89		3,05
3. Precipitada com Acetona gelada				
3.1 Precipitado com 0,5 vol.	45,8	4,65		2,00
3.2 Precipitado com 1,0 vol.	3,2	5,63		5,36
3.3 Sobrenadante final	0,9	0,27		1,66

Volumes idênticos de cada fração (diluições diferentes em função dos tratamentos; sobrenadantes finais dos tratamentos 1. e 3. recuperados após diálise) foram submetidos ao ensaio padrão para atividade xilanásica separadamente com os dois substratos: xilana de *Larix* e de caule de *M. scabrella* (hemicelulose A).

* Os valores de "Atividade Xilanásica Relativa" correspondem a cada poder redutor liberado (A_{535nm}) dividido pelo respectivo valor de conteúdo proteico de cada fração. Valor final: $\times 10^2$.

(Outros detalhes, ver Materiais e Métodos).

significativa da pigmentação sempre co-cromatografava com as frações proteicas de maior peso molecular (e.g., tubo 50 da fig. 61). Em verdade, o único expediente que resultou em separação um pouco mais satisfatória dos pigmentos (mediante retenção por carga) foi o fracionamento proteico em resina do tipo DEAE, o que também está de acordo com a distribuição de cargas e absorbâncias ($A_{280\text{nm}}$) da fig. 6.

A isoeletrofocalização analítica do suco gástrico de *M. paranaguensis* (fig. 5) indica que a população proteica global cobre uma ampla faixa de pontos isoelétricos, e uma questão pertinente seria o esclarecimento da co-ocorrência dos dois tipos de uma mesma hidrolase: acídicas e básicas, como reportado para alguns poucos fungos (DEKKER & RICHARDS, 1976). Os dados da tabela 8 são os resultados do fracionamento "cruzado" do suco gástrico, tanto em resinas de intercambio aniônico (DEAE), quanto de catiônico (CM), resgatando-se em cada caso duas frações: a eluída com água e com acetato de amônio 1 M. Normalizados os volumes de todas frações (inclusive o da enzima-controle, não cromatografada, mas também diluída com o sal e dializada), confirma-se o perfil da isoeletrofocalização (figs. 5 e 6) ou seja predominância de teor proteico na fração ácida, mas atividade xilanásica é detectada tanto nas frações ácidas, quanto básicas dos dois tipos de fracionamento cromatográfico. Há uma discrepância, quando se analisa a atividade xilanásica "específica" (atividade do ensaio padrão relacionada com conteúdo proteico), de vez que na troca aniônica, esta é maior para a fração "básica" (eluída com água) enquanto na troca catiônica, a maior recuperação se encontra na fração "ácida" (também eluída com água). Em comum, por outro lado, es-

tas frações mais enriquecidas têm justamente o eluente inicial: água, sugerindo que, em ambos os casos, a eluição com um sal relativamente concentrado (no caso, acetato de amônio 1 M) tenha resultado em algum grau de inativação. Coincidentemente, a melhor purificação corresponde ao eluato aquoso de DEAE-BioGel, ou seja, a fração mais isenta de pigmentação (helicorubina e citocromo h (KEILIN, 1957); polifenóis) e daí uma indicação de que os pigmentos possam ter algum papel inibitório. A análise cromatográfica dos incubados das quatro frações de intercambio iônico com heteroxilana de *Larix* (parte mais à esquerda, fig. 54) mostra um perfil muito semelhante para todas elas, exceto uma diminuição para a atividade de β -xilobiase (comparar com a linha S-10 = enzima-controle; maior teor de xilose livre). Com referência a atividade de α -(4-O-metil)-D-glucuronidase (eletroforese da fig. 53), a mesma aparece mais satisfatoriamente recuperada apenas nas frações também eluídas com água de ambas as resinas (linha A-3, eluato aquoso da DEAE, fração básica e linha A-5, eluato aquoso, fração ácida de CM), repetindo pois, a mesma situação já comentada para a xilanase. Uma reavaliação da atividade de glucuronidase (agora ao uso das frações de isoeletrofocalização preparativa; fig. 50), mostra que o melhor desempenho para esta hidrolase é encontrado nas frações IEF-III e IEF-V (pI médios de 4,0 e 7,0, respectivamente), logo os conceitos de "ácida" ou "básica" aplicados às frações derivadas de DEAE- ou CM-BioGel A teriam que ser re-examinados (por exemplo, através de nova isoeletrofocalização analítica). Como comentário adicional, cabe ressaltar que, mesmo nas frações mais ativas para o componente metil-D-glucuronidase (pI 4 ou 7, fig. 50), a

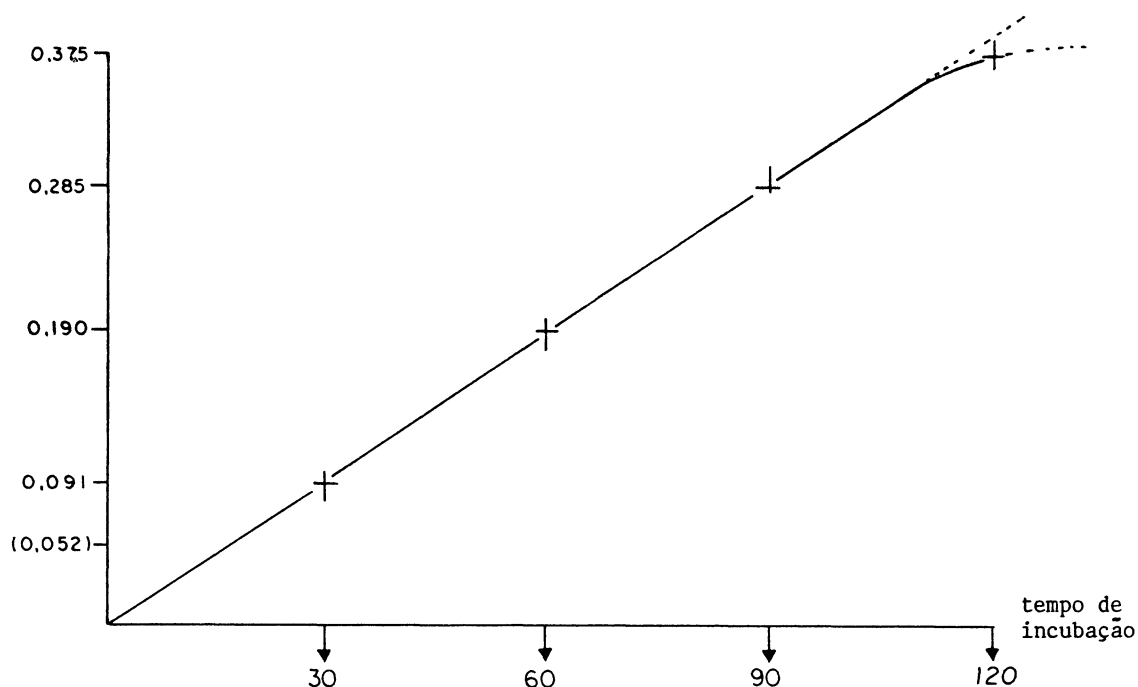


Fig. 49. Comprovação da linearidade da reação hidrolítica de xilana pelo componente α -(4-O-metil)-D-glucuronidase presente no suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

1. 4-O-metil-D-glucurono-xilana de *Larix* sp. suspensa em tampão acetato sódico pH 5,0 mM foi tratada com enzima de caracol (S-10) e alíquotas foram removidas aos tempos de 30, 60, 90 e 120 min para rápida inativação com excesso de metanol fervente.
2. Cada sobrenadante metanólico foi evaporado a vácuo em centrífuga Savant.
3. Cada resíduo foi derivatizado com um volume exato de reagentes: (a) hidroxilamina em piridina, contendo fenil-beta-D-galactopiranosídeo (padrão interno); (b) agente sililante (BSTFA), também em volume exato. A derivatização foi conduzida em vials especiais (Pierce Co.), permanente obturados com borracha especial.
4. A GLC dos derivados oxima-sililados foi efetuada nas condições padrões da fig. 43.
5. As áreas relativas para os picos de ácido 4-O-metil-D-glucurônico e padrão interno foram relacionadas para cada um dos tempos da cinética de hidrólise e estas razões estão no eixo das ordenadas da figura.

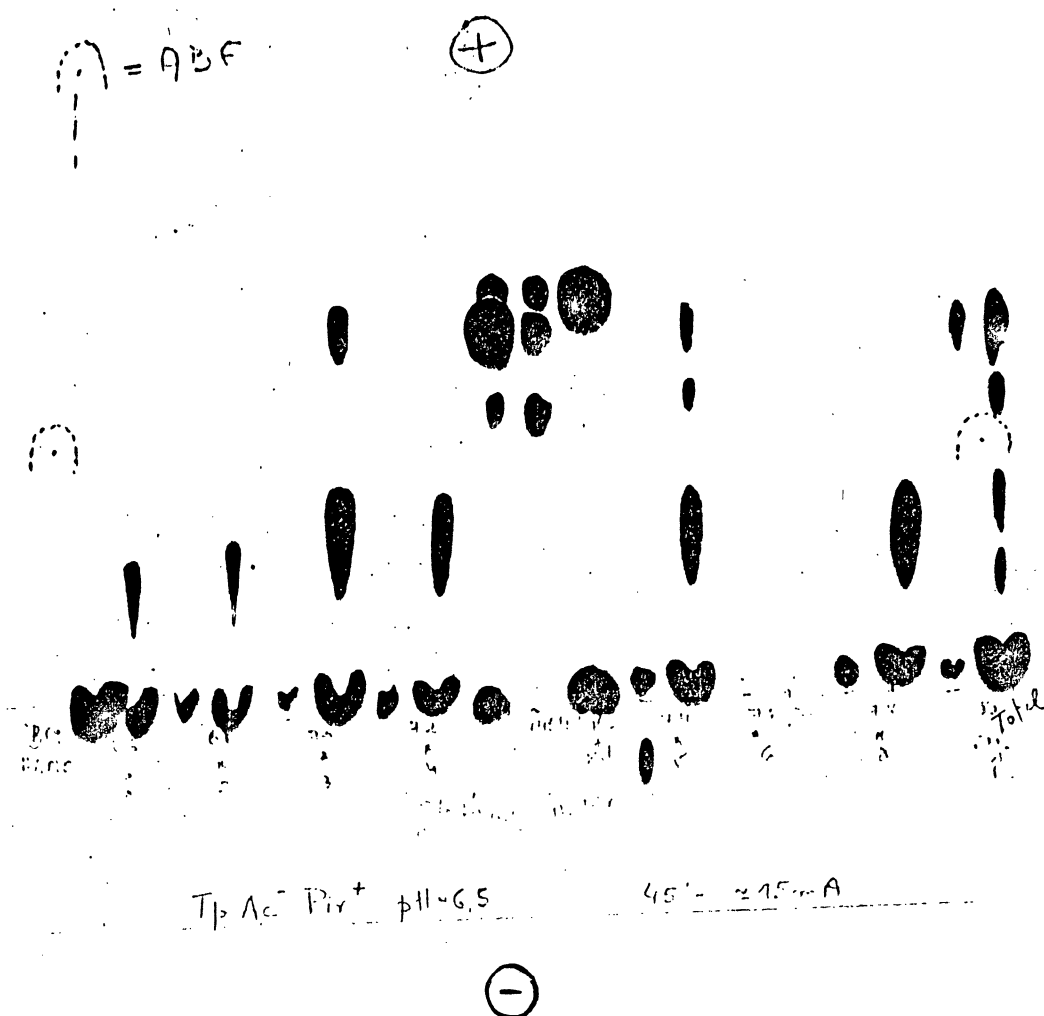


Figura 50. Detecção de isoenzimas para a atividade (4-O-metil)- α -D-glucuronidase do complexo xilanolítico do suco gástrico de *M. paranaguensis* através de eletroforetograma em papel.

As frações de isoeletrofocalização preparativa (fig. 6) de nº IEF 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 foram utilizadas para a hidrólise de heteroxilana ácida de *Larix* sp. e os incubados exaustivos submetidos à eletroforese de alta voltagem em papel em condições similares à da fig. 42-A.

concentração de ácido aldotriurônico é notável, indicando claramente o grau de restrição à xilanólise completa quando o nível de glucuronidase é limitante, pois este trissacarídeo ácido compromete 2 resíduos de xilose bloqueados à ação da endoxilanase e ou β -xilosidase.

Outros substratos aniônicos correlacionados (amostras A a D, E, F, K e L) ou não (G, P; fig. 51) à heteroxilana de *Larix* ou *Mimosa scabrella*, também experimentam extensiva depolimerização sob a ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*, incluída a monomerização, pelo menos parcial, dos segmentos ácidos. O mais expressivo resultado é, sem dúvida, o obtido com pectina cítrica (linha H, fig. 51) correspondendo a uma conversão praticamente total ao monômero de ácido D-glacturônico e ou seu derivado insaturado. Uma outra visão do padrão de fragmentação de substratos acídicos é exibido na cromatografia da fig. 52, onde se inclui também uma glicana "neutra", a arabinogalactana de *Larix*. Tanto (linha A) esta, quanto a CM (CarboxiMetil) Celulose (linha E), além dos respectivos monômeros neutros, uma série de oligossacarídeos representativos da estrutura básica acídica (comparar no caso da arabinogalactana, o perfil vizinho - amostra B - do ácido arábico).

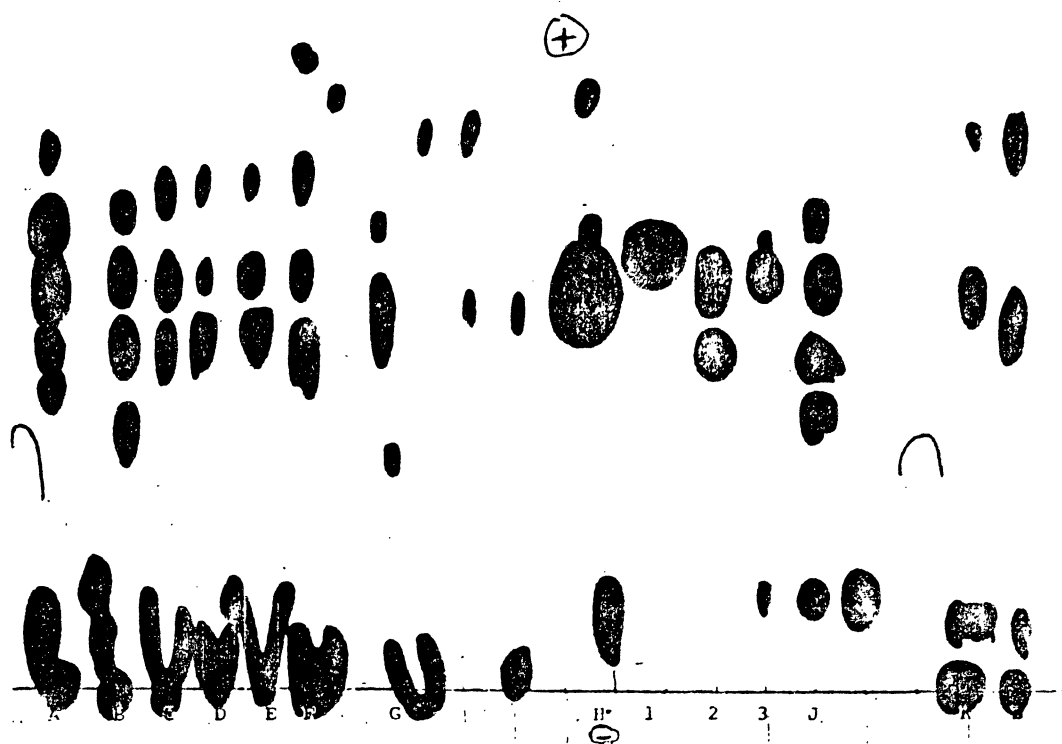


Fig. 51. Eletroforetograma de alta voltagem em papel: produtos de hidrólise de glicanas ácidas por ação do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

- A, B, C e D = Hemiceluloses "A", Total, "B" e "C" de cana de açúcar;
 E = Hemicelulose "A" de sabugo de milho;
 F = Farelo de trigo, isento de amido;
 G = Carragenana;
 H = Pectina de *Citrus* sp.;
 J = Heteroxilana de *Larix* sp.;
 K = Hemicelulose total de *Populus* sp. (álamo);
 L = Hemicelulose nativa de *Populus* sp. (extraída com DMSO, a quente).

Padrões:

- 1 = ácido D-glucurônico
 2 = ácido aldobiurônico
 3 = ácido (4-O-Me)-D-glucurônico.

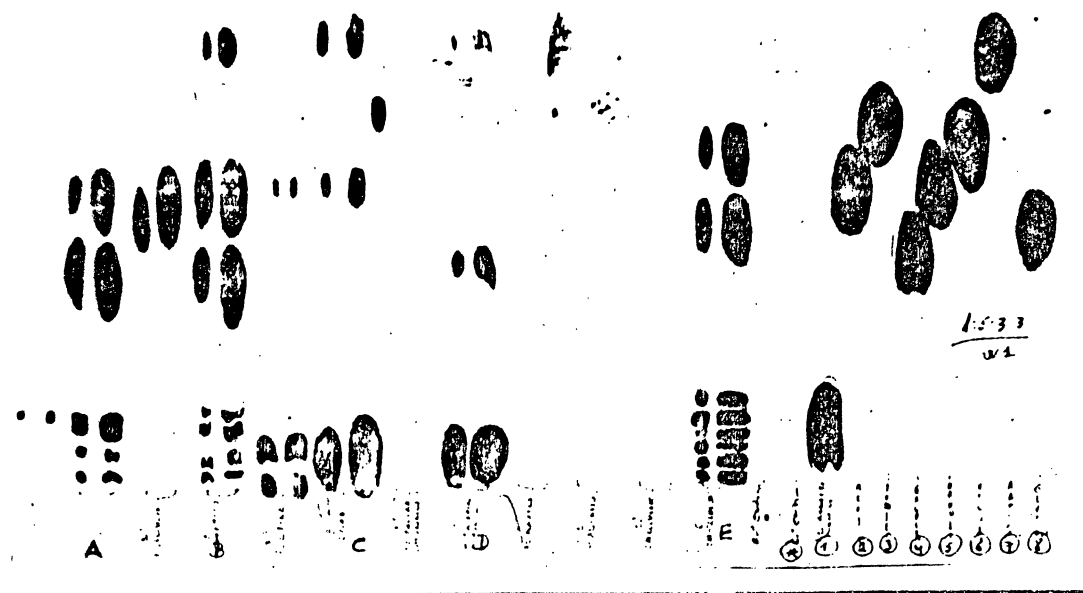


Fig. 52. Cromatograma em papel: produtos de hidrólise de glicanas ácidas por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

papel : Whatman nº 1.

solvente : fase superior da mistura Benzeno:Butanol:Piridina:Água
1:5:3:3 em v/.

revelador : nitrato de prata /hidróxido de sódio.

Amostras:

A = arabinogalactana de *Larix* sp.

B = ácido arábico

C = pectina cítrica

D = ácido poligalacturônico

E = CM-(Carboximetil)-celulose

Padrões:

1 = ác. galacturônico

2 = arabinose

3 = fucose

4 = galactose

5 = manose

6 = xilose

7 = ramnose

8 = glucose.

(*) "blank" de enzima.

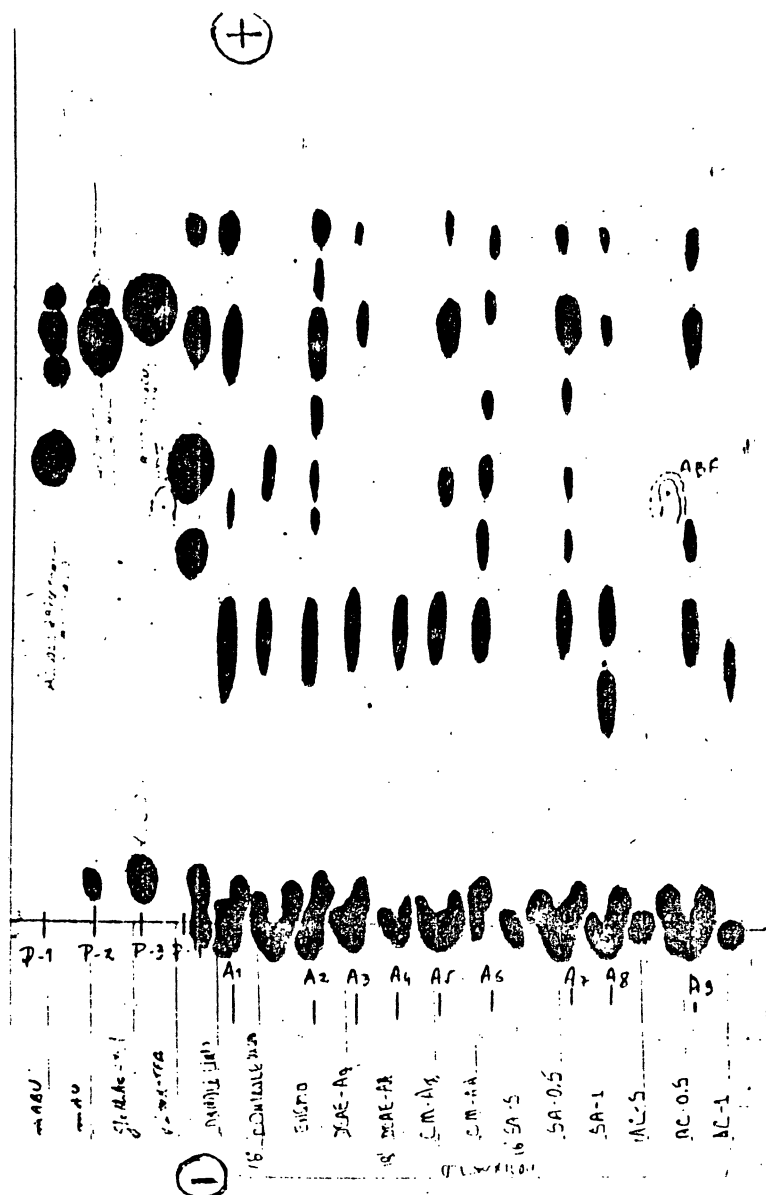


Fig. 53. Eletroforetograma de alta voltagem em papel: análise da atividade de α -(4-O-metil)-D-glucuronidase após fracionamento do suco gástrico de *M. paranaguensis* por troca iônica e sais.

(papel: Whatman nº 1 - tampão acetato de piridina (0,4-10%) pH 6,5; revelado: nitrato de prata / hidróxido de sódio).

Padrões:

- P-1 = ác. aldobiurônico metilado
- P-2 = ác. 4-O-metil-glucurônico
- P-3 = ác. glucurônico + xilose
- P-4 = fração ácida de hidrolisado trifluoracético de xilana de *Larix*

Amostras: incubações de 4-O-metil-D-glucurono-xilana de *Larix* sp. com enzima total (S-10) ou frações da troca iônica.

- A-1 e A-2 = enzima clarificada por BioGel P-2 e enzima fresca.
- A-3 e A-4 = eluatos aquosos e c/ acetato de amônio de DEAE-BioGel
- A-5 e A-6 = idem CM-BioGel
- A-7 e A-8 = enzima precipitada c/ 0,5 e 1 vol. sulfato amônio sat.
- A-9 = enzima precipitada c/ 0,5 vol. de acetona.

ABF = Azul de Bromofenol (marcador de corrida).

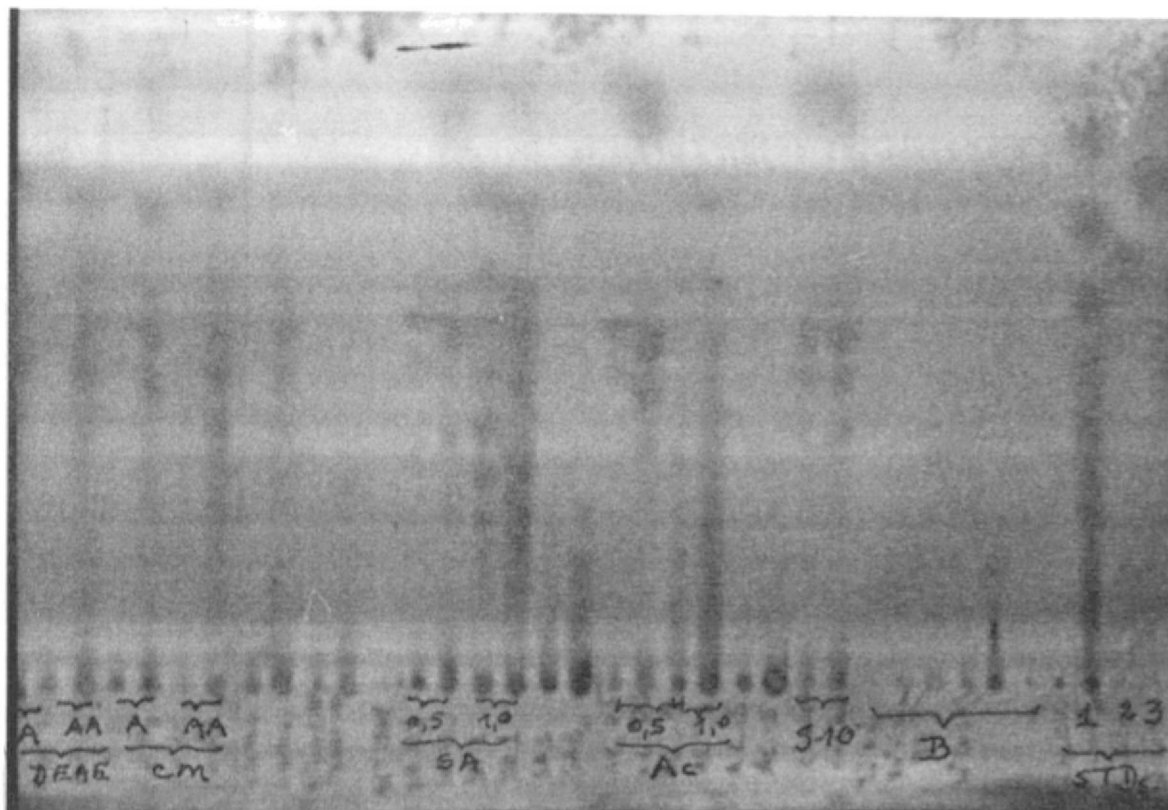


Fig. 54. Cromatograma em camada delgada: atividade xilanásica após fracionamento de suco gástrico de *M. paranaguensis* por cromatografia de troca iônica (DEAE-, CM-), precipitação com sulfato de amônio (SA ou acetona (Ac)).

(corrida: condições equivalentes à da fig. 41-A).

Amostras: incubações das frações com hetero-xilana de *Larix* sp.

DEAE = frações da cromatografia de troca aniônica em DEAE-BioGel A

A = eluato aquoso (fração neutra e ou básica)

AA = eluato com acetato de amônio 1 M (fração ácida)

CM = frações da cromatografia de troca catiônica em CM-BioGel A

A = eluato aquoso (fração ácida)

AA = eluato com acetato de amônio 1 M (fração neutra ou básica)

SA = frações da precipitação com sulfato de amônio saturado

0,5 = precipitado com 0,5 volume de sal

1,0 = idem 1,0 volume de sal

Ac = frações da precipitação com acetona

0,5 = precipitado com 0,5 volume de acetona gelada

1,0 = idem 1,0 volume de acetona gelada

S-10 = enzima fresca de caracol (incubação por 24 h)

B = "blanks" de enzima fresca e frações

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

1 = D-xilose + xiloligossacarídeos da série beta-1,4 (fração neutra da hidrólise trifluoracética de hemicelulose A de *M. scabrella*)

3 = ác. 4-O-metil-glucurônico

2 = ácido D-glucurônico

9.3 Enzimas complementares do complexo xilanolítico: O-Acetil-XILANA ESTERASE

É muito recente a descrição da atividade hidrolítica para grupos O-Acetil de carboidratos (BIELY, 1988) e no caso particular de heteroxilanas, nas quais a ocorrência de grupos O-acetil nativos está bem documentada (REICHER, CORREA & GORIN, 1984), um substrato mais confiável que aqueles sintéticos cromogênicos foi especialmente preparado para a medida de O-acetil-xilana esterase: a heteroxilana de *Larix* quimicamente re-O-acetilada (JOHNSON, FONTANA & MACKENZIE, 1988). Na fig. 55, pode-se apreciar através de cromatografia gasosa a cinética de tempo da ação deste tipo de esterase presente no suco gástrico de *M. paranaguensis* atuando sobre o mencionado substrato. A liberação de ácido acético guarda boa linearidade com a faixa de tempo de incubação de 15 a 60 minutos. No cromatograma da fig. 56, pode-se observar que a atividade esterásica do suco atua igualmente bem sobre um substrato muito mais simples: mistura de mono-, di-, tri- e tetra-acetatos de D-xilose, gerando como produtos finais a D-xilose livre > xilose-mono ou di-acetato (linha 6; fig. 56). A referida mistura foi preparada por tratamento de D-xilose anidra com uma mistura de iguais volumes de piridina e ácido acético (100°C, 30 min). O per-acetato uma vez parcialmente desesterificado com metóxido de sódio (aproximadamente meio equivalente do requerido para a desesterificação total em meio metanólico) corresponde ao substrato (linha 3, fig. 56).

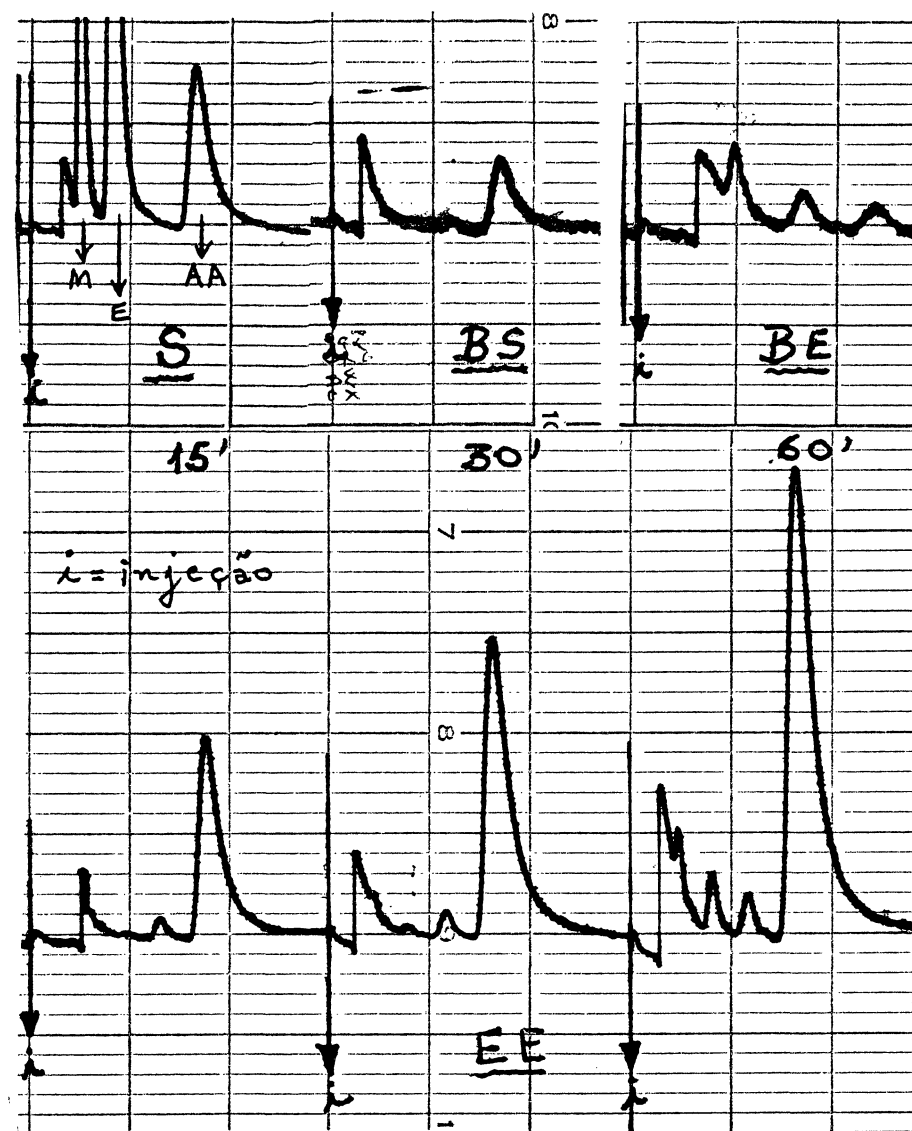


Fig. 55. Cromatograma em fase gasosa (GLC) dos produtos (sem derivatização) da cinética de tempo de hidrólise (desesterificação) da xilana de *Larix* sp. (quimicamente re-O-acetilada) por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

Aparelho: Cromatógrafo CG mod. 37.

Coluna : (convencional) Porapak Q, operada isotermicamente a 183°C; gás de arraste N₂ (fluxo = 3, em rotâmetro).

S = mistura de padrões : Metanol (M) + Etanol (E)
Ácido Acético 0,1% (AA)

BS = "blank" de substrato (incubação de 60 min)

BE = "blank" enzima (S-10, fresca), idem

EE = ensaios da enzima (incubações completas de S-10 com hetero-xilana de *Larix* re-O-acetilada: 15', 30' e 60' : cinética de tempo (min).

(Parada de reação: imersão em banho de congelamento; adição de HCl até pH 2 - viragem do azul de timol, transferência a banho de gelo (0 a +2°C) até o momento da injeção).

(Outros detalhes, ver Materiais e Métodos).

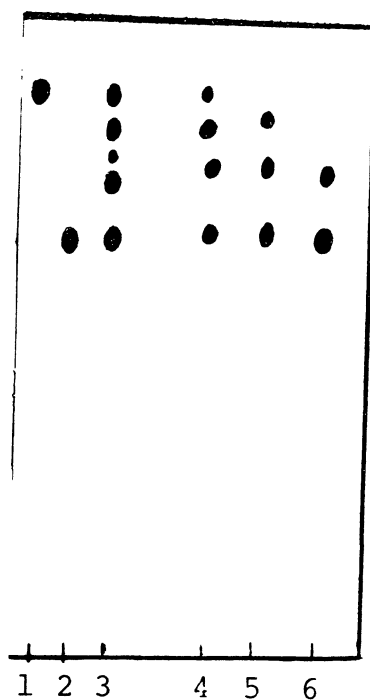


Fig. 56. Reprodução de cromatograma em camada delgada (TLC) da desesterificação do padrão sintético de D-xilose-(1,2,3,4)-tetra-O-acetato por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

Cromatoplaca: Sílica Ge-60, Merck

Solvente : Propanol:Nitrometano : Água : Ácet. Etila
10 : 6 : 8 : 10,5

Revelado : Orcinol - Metanol - H₂SO₄

1 = Padrão (substrato): D-xilose-tetra-O-acetato

2 = D-xilose

3 = Padrão (1) parcialmente titulado com metóxido de sódio

4, 5 e 6 = incubações do padrão (3) com atividade hidrolásica (O-acetil-D-xilana esterase) de suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*, nos tempos de 10, 30 e 60 minutos.

(Outros detalhes, ver Materiais e Métodos).

9.4 Enzimas complementares do complexo xilanolítico: ÁCIDO FERÚLICO (ÁCIDO p-COUMARICO) - ESTERASES

O conceito de estrutura fina de polissacarídeos acídicos tem experimentado ratificações importantes em função da comprovação inequívoca da ligação covalente de ácidos fenólicos monoméricos à estrutura polissacarídica. Exemplos desta comprovação são a ocorrência de ácido ferúlico esterificado a resíduos L-arabinosil tanto de pectinas (FRY, 1983), quanto de xilanas. Nas últimas já se deu o isolamento de fragmentos di ou trissacarídicos, informacionais da estrutura fina, e envolvendo xilose-arabinose ou xilobiose-arabinose feruloilados e respectivamente designados de FAX OU FAX₂ (SMITH & HARTLEY, 1983). A estrutura corresponde à da fig. 57 e identifica-se como uma "xilodextrina-limite de terminal não redutor" de arabinoglucuronoxilana ou seja hemicelulose do tipo encontrada em bagaço de cana. Em fungos dos gêneros *Schizophyllum* (MACKENZIE & BILOUS, 1988) e *Aspergillus* (JOHNSON, SILVBA, MACKENZIE & FONTANA, 1989), estão descritas atividades esterásicas capazes de promover a liberação deste tipo de substituintes feruloil-éster. Obviamente, se o material hemicelulósico é extraído nas condições alcalinas clássicas, o substrato resultante perde esta informação de estrutura fina dada à labilidade da ligação éster em meio alcalino. Por esta razão, substratos feruloilados mais definidos (em função do reduzido DP do "core" (xilossil)_n) só podem ser preparados a partir de complexos ligno-hemicelulósicos nativos quando se utilizam insumos enzimáticos que satisfazem duas condições conjuntas:

- a) alta eficiência celulolítica/hemicelulolítica, e
- b) ausência deste tipo de esterases.

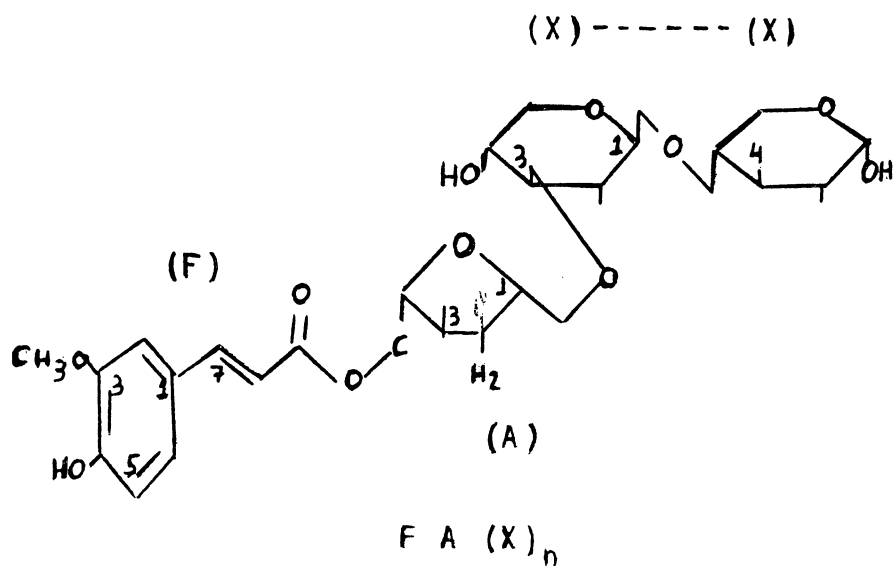
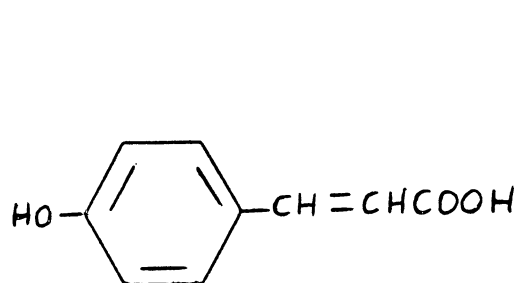


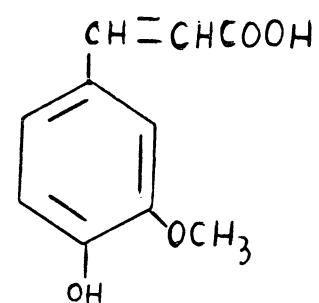
Fig. 57. Estrutura do FA(X)_n: um oligossacarídeo limitada (hemi)celulólise exaustiva de heteroxilana de bagaço de cana por ação de celulase fúngica (Celluclast®).*

- (X) = β-D-xilopiranosose
 (X)---(X) = D-xilobiose
 β-O-4-(D-xilopiranosil)-D-xilopiranosose
 (A) = α-L-arabinofuranose
 (F) = ácido ferúlico (feruloil éster)

(*) obtenção de FA(X)_n : Materiais e Métodos.



ÁCIDO p-COUMÁRICO



ÁCIDO FERÚLICO

Fig. 58. Estrutura de alguns ácidos fenol-carboxílicos que esterificam a cadeia polissacarídica de glicanas pécnicas e hemicelulósicas.

O caminho de fragmentação hidrolítica por ácido mineral também não se aplica, visto que ligações glicosídicas do tipo (comum tanto à celulose quanto à hemicelulose) são mais resistentes à hidrólise que o éster feruloil-arabinose. Alternativa, ou cumulativamente ao ácido ferúlico (fig. 58), o análogo 2-demetoxilado, ácido p-coumárico também ocorre como substituinte nos polímeros antes mencionados. Na tabela 10, aparecem os dados de cromatografia gasosa para monitoramento e quantificação das atividades de ácido ferúlico- e ácido p-coumárico-esterases ("ferulicase" e "p-coumaricase") presentes no suco gástrico de **M. paranaguensis**, atuando sobre substratos da série FAX e sobre bagaço de cana nativo.

O suco gástrico de **Megalobulimus** contém atividade(s) esterásica(s) para liberação de ambos os ácidos fenol-carboxílicos (em adição ao teor pré-existente em forma livre), permanecendo aberta a questão se é uma mesma enzima ou enzimas diferentes o(s) agente(s) catalítico(s). No bagaço de cana nativo (apenas pré-tratado com vapor fluente para entumescimento do complexo ligno-hemi-celulósico), a ação do tipo "ferulicase" é mais claramente visível, em função de o substrato-controle estar completamente isento de ácido ferúlico livre. Esta condição também é lograda utilizando-se como enzima o suco gástrico previamente filtrado por Bio Gel P-2 ou Sephadex G-25 (fig. 59-A). As demais figuras (59, -B, -C e -D) documentam as corridas cromatográficas em fase gasosa sobre fase estacionária do tipo metil-silicona (derivados da incubação na forma de silil-derivados).

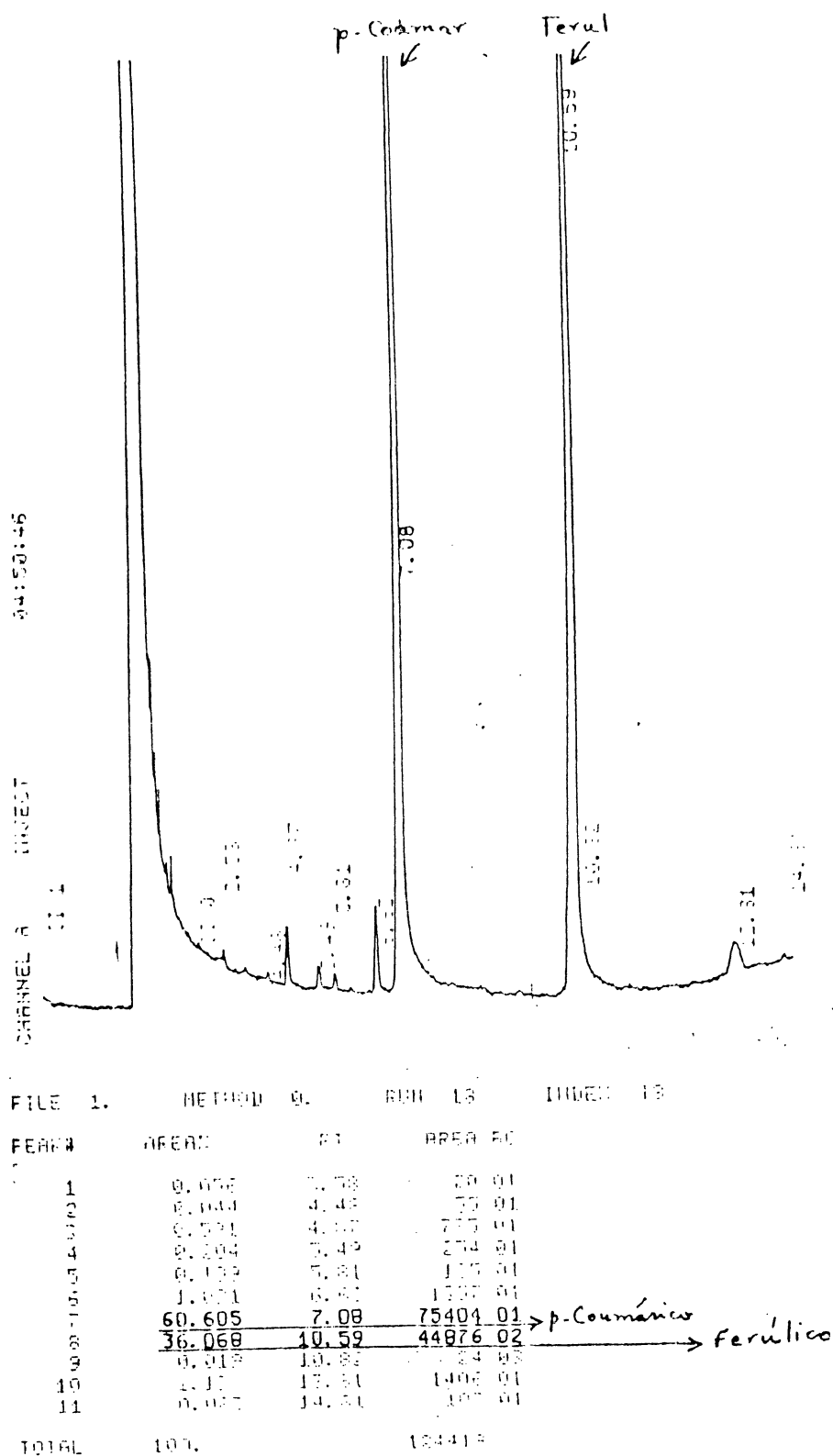


Fig. 59. Cromatograma em fase gasosa (GLC) de silil-derivados dos padrões de ácidos fenol-carboxílicos p-Coumárico e Ferúlico.

(Condições de derivatização e corrida: tabela 11).

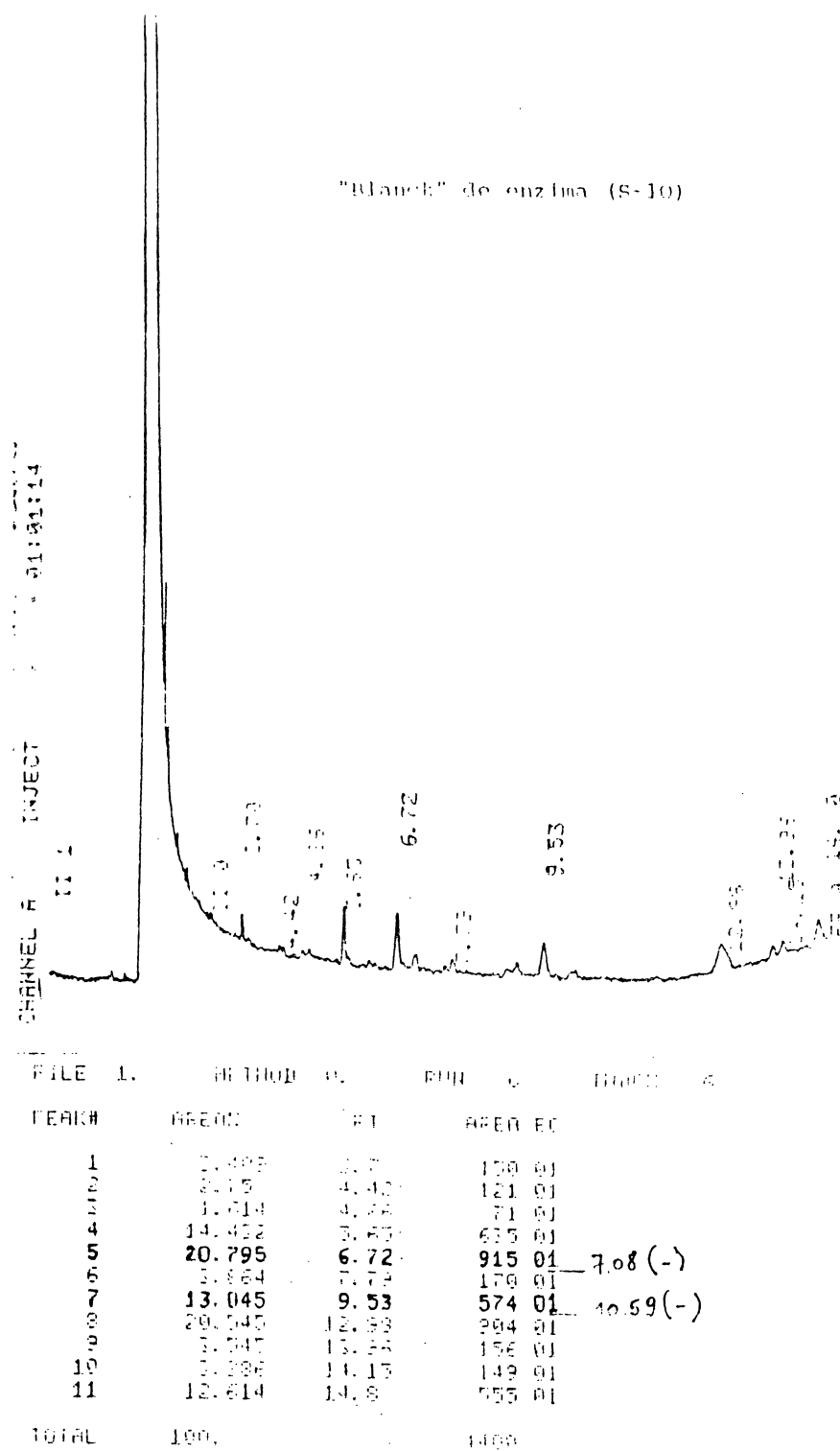


Fig. 59-A. GLC de silil-derivados.

Amostra:"blank" de enzima de *M. paranaguensis* (S-10)

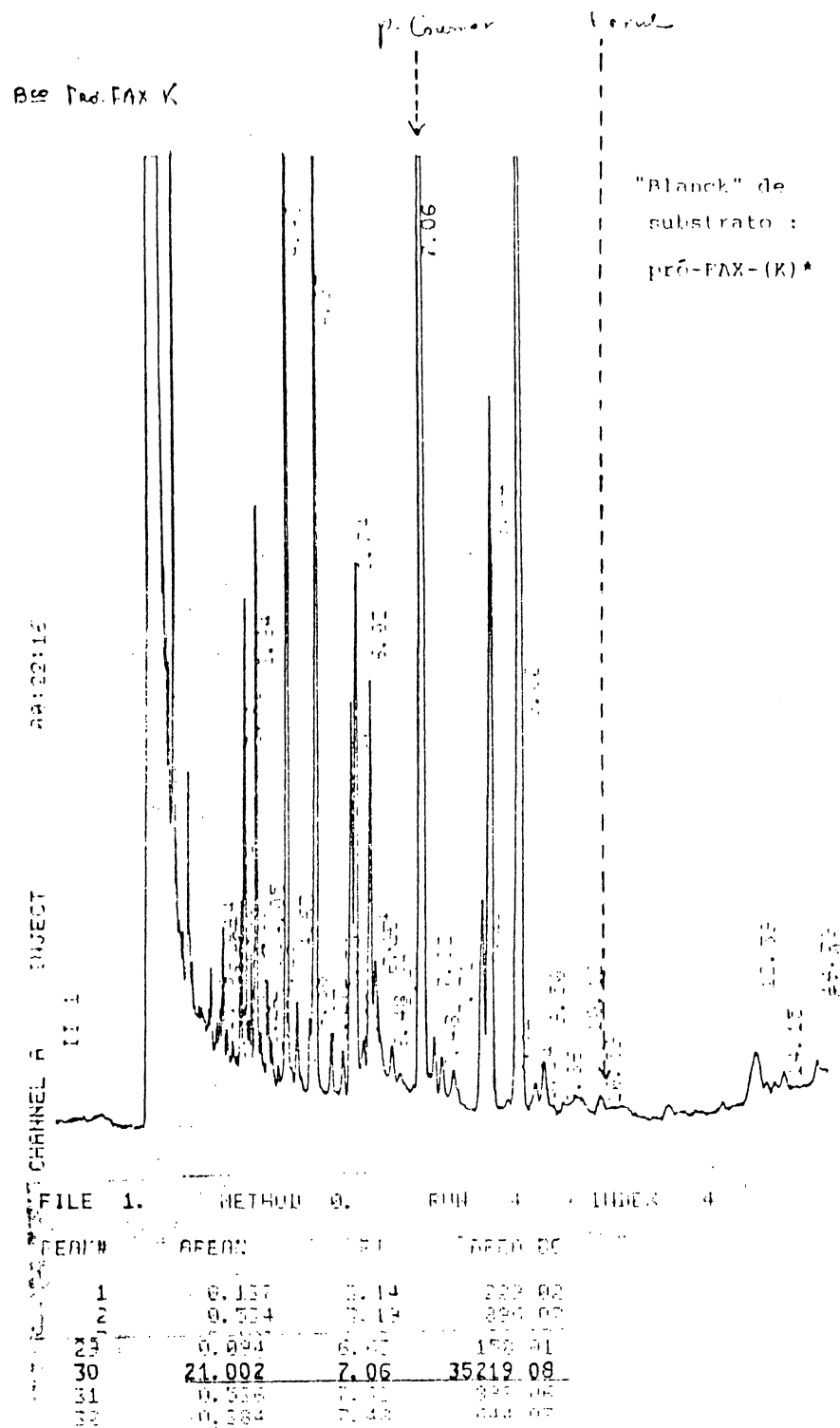


Fig. 59-B. GLC de silil-derivados da fração solúvel em metanol anidro após digestão exaustiva de bagaço de cana com celulase fúngica (Celluclast®) = pró-FAX.

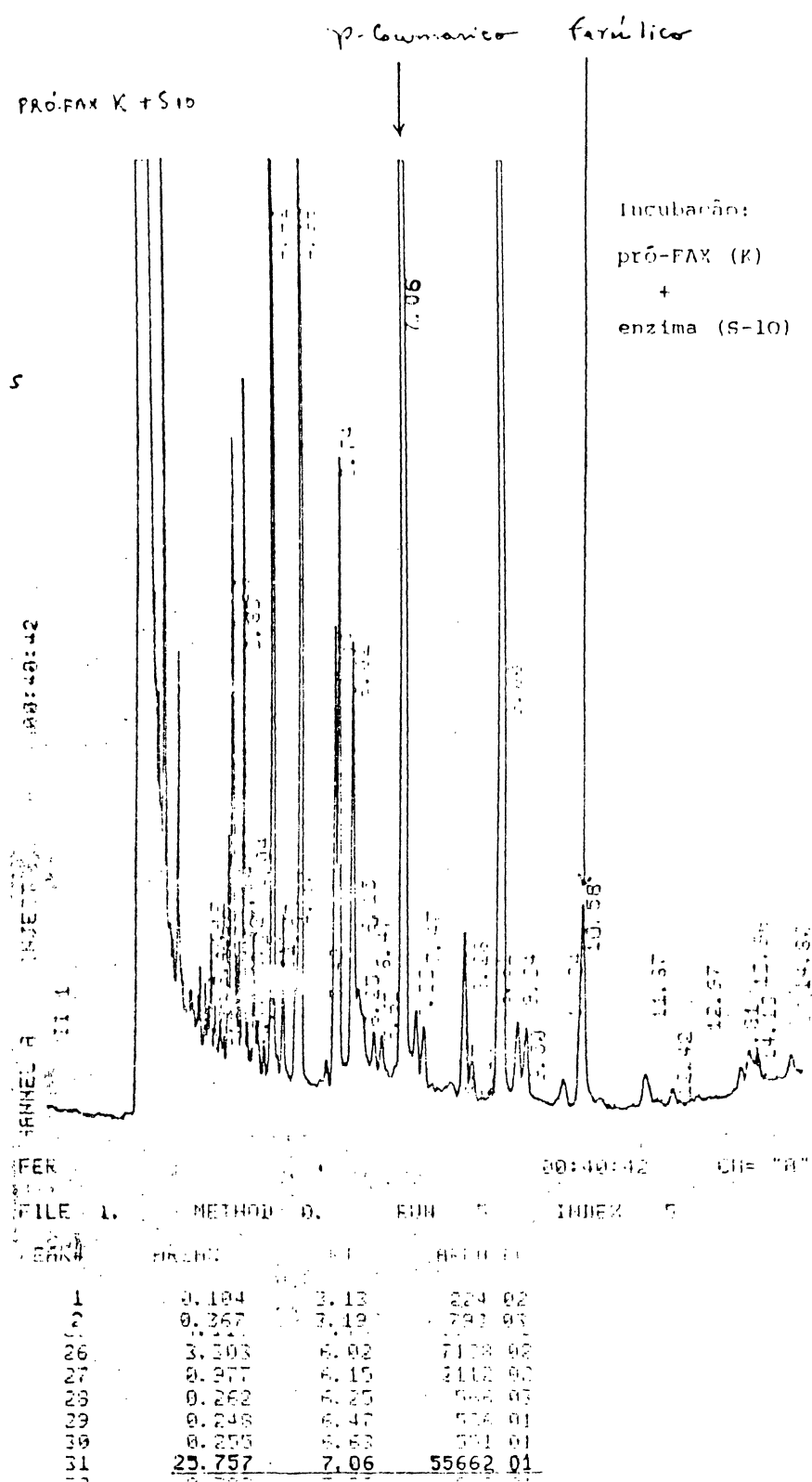


Fig. 59-C. GLC de silil-derivados da reação de pró-FAX com suco gástrico de *M. paranaguensis*: atividades de p-Coumaroil e Feruloil-esterases.

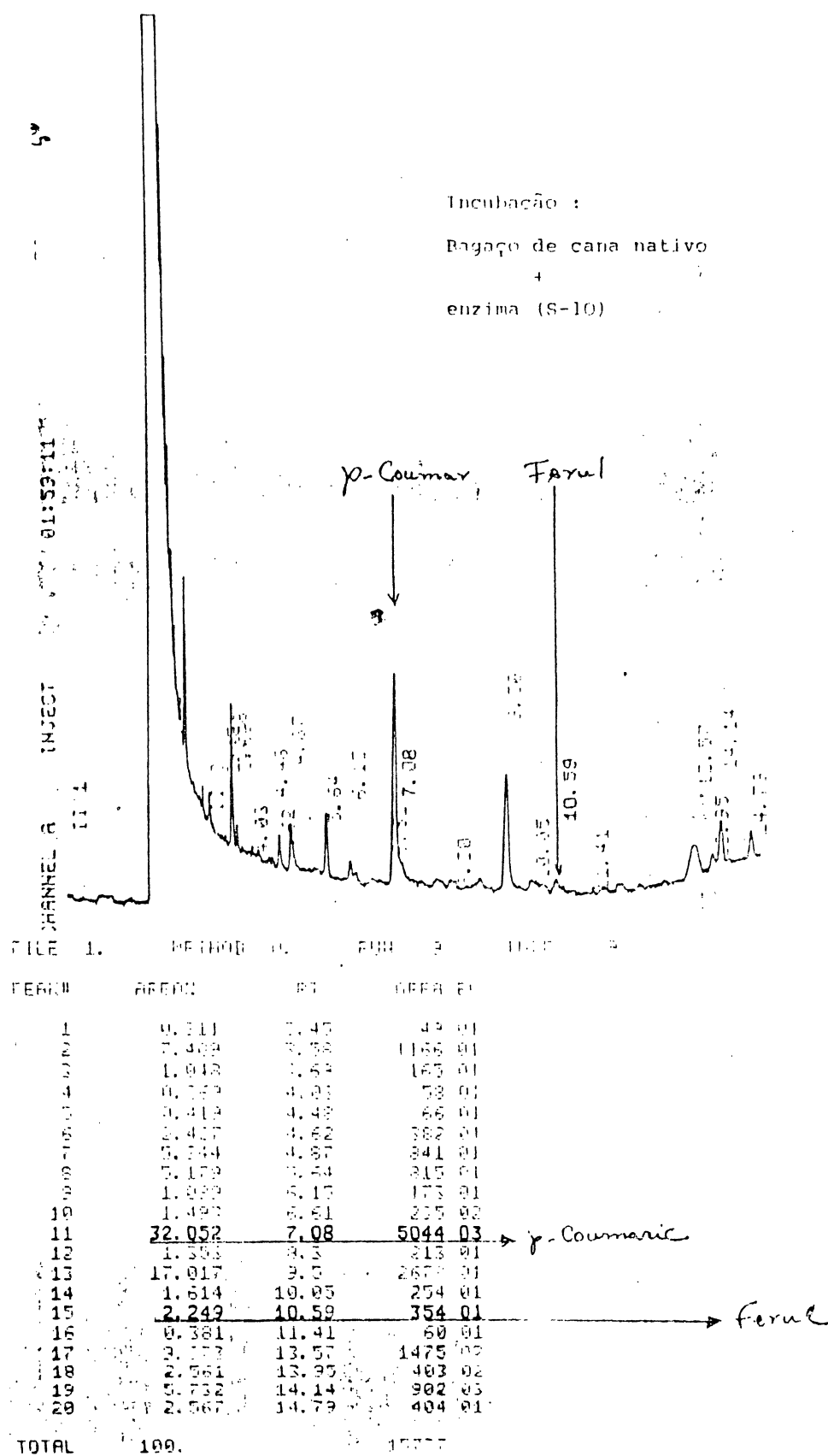


Fig. 59-D. GLC de silil-derivados da reação de bagaço de cana nativo com suco gástrico de *M. paranaguensis*: ação moderada de p-Coumaroil e Feruloil-esterases.

TABELA 10. MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO EM FASE GASOSA (GLC) DE DERIVADOS SILILADOS DE ÁCIDOS FENOL-CARBOXÍLICOS LIBERADOS PELA AÇÃO DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis* SOBRE MATERIAIS LIGNO-HEMI-CELULÓSICOS.

PADRÕES / AMOSTRAS		R_T		$A_i (x10^{-3})$		Dif. A_i p-C/F
P-1	Ácido p-coumárico	7,09	-	75,4	-	-
P-2	Ácido ferúlico	-	10,59	-	44,9	-
A-1	pró-FA(X) _n -F (-)	7,10	10,61	44,1	1,2	31,8 / 5,2
	idem (+)	7,09	10,60	75,9	6,4	
A-2	pró-FA(X) _n -K (-)	7,06	10,59	35,2	2,9	20,4 / 2,6
	idem (+)	7,06	10,58	55,6	5,5	
A-3	CB-SW (-)	7,08	-	3,4	-	2,6 / 0,4
	CB-SW (+)	7,08	10,59	5,0	0,4	

Alvo:

Determinação comparativa da ação de ácido p-coumárico e de ácido ferúlico-esterases ("p-coumaricase" e "ferulicase").

Condições de GLC:

- amostras anidras diretamente sililadas com BSTFA, após solubilização c/ piridina;
- coluna capilar de SE-30 (250C2; on WCOT), de sílica vítrea, 25 m, D.I. = 0,22mm, operada isotermicamente a 205°C (11 min), seguindo programação a 8°C/min até 15 min.

R_T = tempo de retenção (minutos, 1/100s min)

A_i = área integrada

Dif. A_i = diferença de área integrada entre amostras-controle incubadas sem enzima (-) e amostras incubadas com suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* (+).

pró-FA(X)_n = fração solúvel em metanol anidro, de bagaço de cana exaustivamente incubado com Celluclast® (celulase fúngica da Novo Industri) (relação substrato (g) : enzima (ml) = 10 : 1); 45°C, 36 h.

CB-SW = (Cane Bagasse - Steam Swollen) Bagaço de cana intumescido em autoclave a vapor fluente.

Obs.: Previamente à derivatização, cada amostra de incubado foi colhida da fase superior de uma partição c/ 1 vol. de MeOH + 4 vol. de Acetato de Etila + 1 vol. de Éter + 1 vol. de Água.

9.5 Sinopse de algumas atividades hidrolásicas do suco gástrico de *M. paranaguensis* para substratos hemicelulósicos e correlacionados.

Na tabela 11, as enzimas do complexo β -xilanolítico, além de CarboxiMetilCelulase (CMCase) e α -manosidase, aparecem expressas por suas atividades específicas. Os valores são supostos ser mais elevados, em função desta preparação ter sido objeto de manipulação excessiva e de transporte sem garantia de efetiva refrigeração.

10 α -XILO-D-GLUCANASE

As xiloglucanas são polissacarídeos neutros associados à parede celular de diversas espécies botânicas (ALBERSHEIM, 1976) e sua estrutura básica corresponde à da fig. 60. Apresentam, pois, três aspectos de estrutura completamente opostos em relação às hemiceluloses:

- a) D-xilose é um substituinte singular do "core" celulósico principal;
- b) a pentose se une por ligação do tipo 1,6;
- c) a configuração anomérica é do tipo α .

A xiloglucana de soja ou ervilha são modelos intensamente estudados (p.e., pelo grupo de HAYASHI & MATSUDA, 1981), mas a maior parte destes estudos se concentra em biossíntese em cultura celular, interações com celulose e estrutura molecular fina (e.g., presença de resíduos adicionais de D-galactose de L-fucose). Quanto a enzimas de metabolização deste tipo de glicana, as hidrolases investigadas se restringem à β -glucanases inerentes às próprias plantas (HAYASHI, WONG &

TABELA 11. PERFIL ENZIMÁTICO DO COMPLEXO HIDROLÁSICO DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis**

ATIVIDADE HIDROLÁSICA	U / ml	U / mg PROTEÍNA (AE) ¹
1. Complexo xilanolítico		
1.1 endo- β -(1,4)-xilanase	3,65	1,06
1.2 L- α -arabinofuranosidase	1,08	0,31
1.3 α -(4-O-Me)-glucuronidase	0,11	0,03
1.4 O-Acetil-xilana esterase	0,08	0,02
2. Complexo celulolítico		
2.1 carboximetilcelulase	19,97	5,80
3. Complexo mananolítico		
3.1 α -manosidase	0,21	0,06

(determinações por K.G. Johnson, dbS-NRC, Canadá).

* Suco clarificado por centrifugação foi filtrado por BioGel P-2 (exclusão p/ 2×10^3 Kdaltons) para remoção de catabólitos de baixo peso molecular, liofilizado e ressuspensão em tampão fosfato 10 mM pH 6, até uma concentração de sólidos totais do original = (conteúdo proteico de 3,44 mg/ml medido pelo método da BioRad, usando Coomassie B. Blue).

¹ Atividade específica: μ moles de poder redutor ou produto de reação / mg de proteína / minuto de incubação a 50°C a pH 6.

Substratos:

- 1.1 Xilana de *Larix* sp.
- 1.2 p-nitro-fenil-arabinofuranosídeo
- 1.3 Oligossacarídeos ácidos de baixo \overline{DP} obtidos por incubação xilana de lariço com endo-xilanase purificada de *Schizophyllum commune*
- 1.4 Xilana de *Larix* sp. quimicamente re-O-acetilada
- 2.1 CMCelulose de alta viscosidade (Sigma)
- 3.1 Manana de parede celular de *S. cerevisiae*

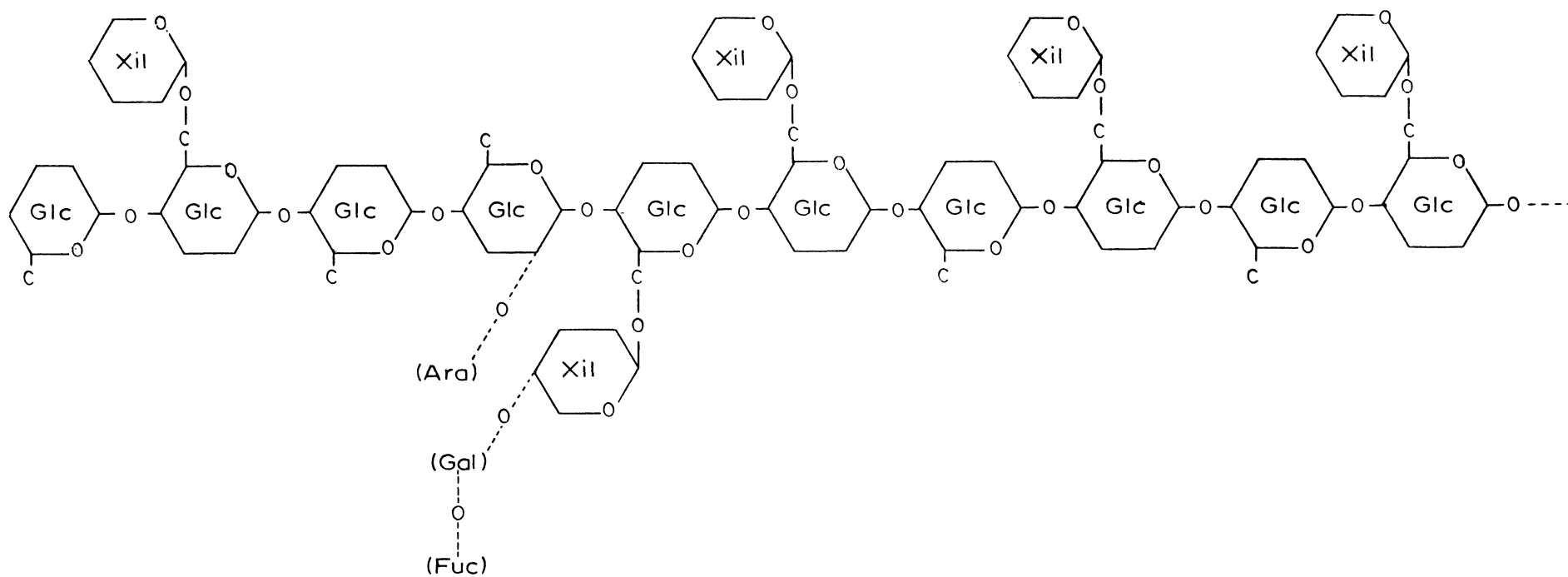
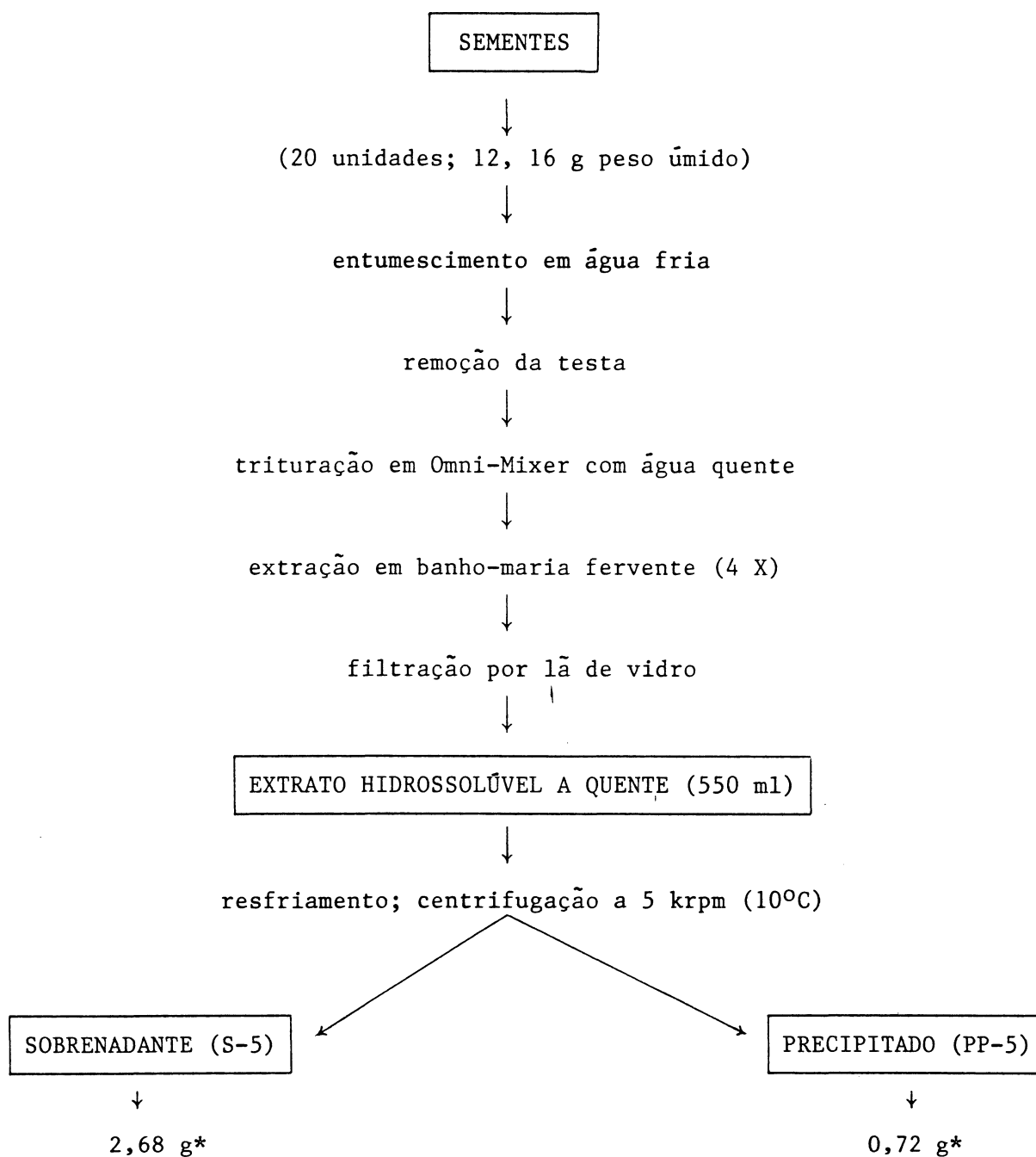


Figura 60. Estrutura parcial de Xiloglucana*

(*) Notar os resíduos singulares de α -(1,6)-D-xilopiranosose inseridos no "core" tipo celulósico.

MACLACLHAN, 1984). Mesmo quando se utiliza enzimas de microrganismos (HAYASHI & MACLACLHAN, 1984) o objeto é a depolimerização do "core" celulósico. Um único trabalho que se refere à atividade de α -xylosidase trata de enzima isolada de meio de cultivo de *A. niger* induzido com "Glyloid" (xiloglucana de sementes de *T. indica*, parcialmente modificada por "Sanzyme 1000", também obtida de *Aspergillus*, mas da sp. *oryzae*) (JUNICHI, KATO & MATSUDA, 1985). A observação preliminar de que xilose podia ser liberada a partir da matéria gomosa de semente de tamarindo, prévia eliminação da mucilagem envolvente da semente (FONTANA, dados não publicados), aconselhou uma investigação mais profunda. Conseguindo novo suprimento de fonte de substrato, a xiloglucana foi preparada (tabela 12) e parcialmente caracterizada. Tanto o extrato original (Tot) quanto sua fração hidrossolúvel a 5 krpm (S-5), após hidrólise exaustiva com suco gástrico de *M. paranaguensis*, rendem ambos monossacarídeos representativos da estrutura: D-xilose e D-glucose (fig. 62 e tab. 13). O peso molecular (curva mediana, fig. 61) da fração completamente hidrossolúvel deste preparado exibiu um peso molecular bem inferior em comparação com aquele reportado para a xiloglucana de ervilha (p.m. = $3,3 \times 10^5$). Na mesma coluna de Sepharose CL-48, o perfil de "xiloglucanase" de suco gástrico de *M. paranaguensis* (curva inferior, fig. 61) acompanha exatamente o perfil proteico ($A_{280\text{nm}}$; curva superior) fortemente incluído na coluna, quando se mede a atividade hidrolítica em termos de poder redutor liberado. Esta imprecisão técnica foi então corrigida mediante o monitoramento cromatográfico em camada delgada para os produtos de reação (fig. 63) para discriminar se havia uma liberação simultânea

TABELA 12. PREPARAÇÃO DE XILOGLUCANA BRUTA DE SEMENTES DE *Tamarindus indica*



* peso seco, após precipitação com 4 volumes de etanol e gravimetria do pó cetônico final.

TABELA 13. PROPRIEDADES DA XILOGLUCANA BRUTA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE T. indica

PROPRIEDADES	FRAÇÕES		
	Total	P-5	S-5
Composição monossacarídica principal	glc,xil	(glc)	glc:xil (-2:1)*
Rotação ótica específica	-	-	+ 89 ^o **
% de hidrólise com suco gástrico Mp	51%	27%	62% ***

* composição glucose : xilose = 10 : 6 para xiloglucana de ervilha, além de menor teor de galactose e fucose.

** fração filtrada por Sepharose CL-4B; ensaio paralelo para xilana de *Larix* sp. = -80^o (determinação p/ P.A.J. Gorin, UFRJ).

*** ensaio com enzima de *M. paranaguensis* filtrada por BioGel P-2/P-4 (1:1) e % de hidrólise expressa como poder redutor (A_{535nm}) observado para ensaio teórico contendo 100 microgramas de carboidrato total como substrato. A natureza dos produtos de reação por T.L.C. : glucose e xilose, juntamente com 5 a 6 oligossacarídeos de mobilidade cromatográfica visível

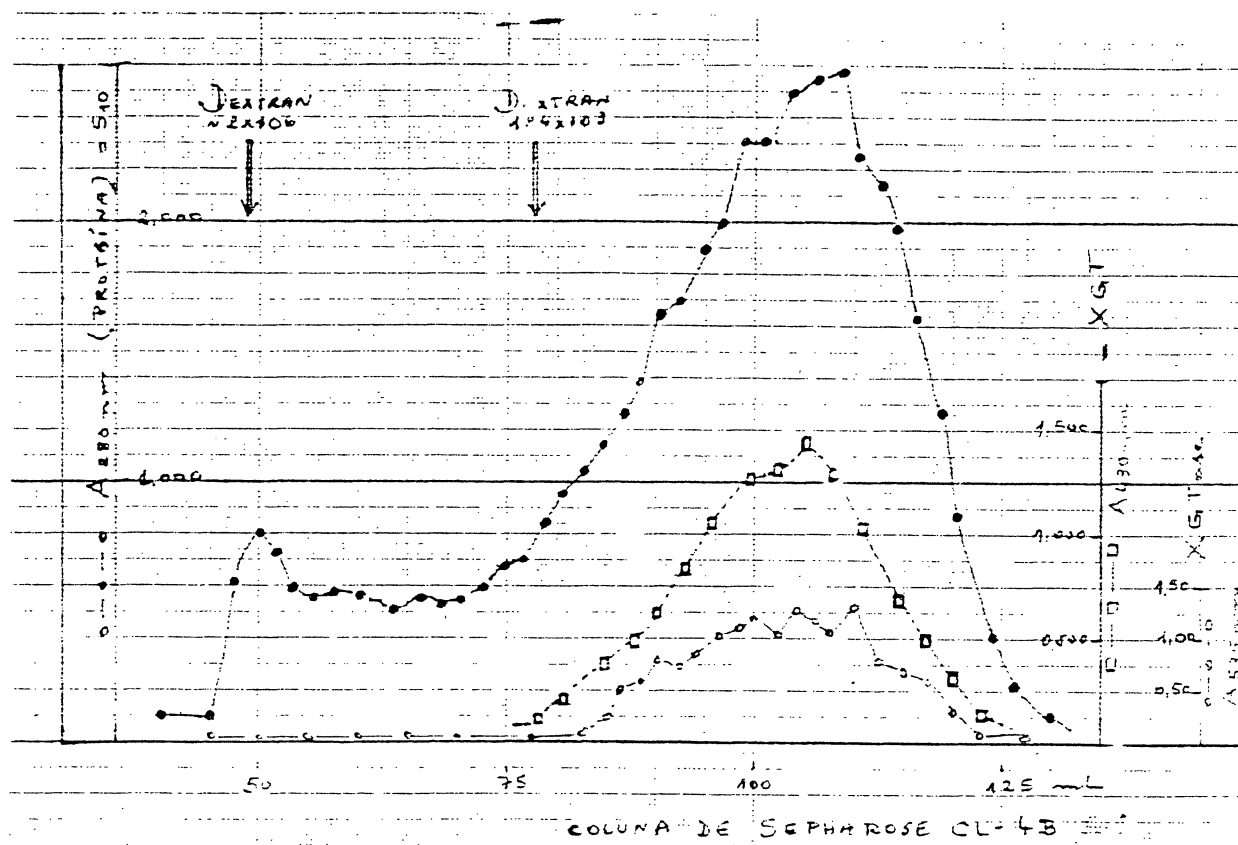


Fig. 61. Filtração molecular em gel do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10) e monitoramento da atividade de α -D-xilo- β -D-glucanase (XGTase).

Coluna: Sepharose CL-4B; 1,6 x 50 cm; Vt ~ 100 ml; equilibrada e eluída com tampão acetato sódico 50 mm pH 5,5; amostra aplicada: 1 ml de S-10.

$A_{280 \text{ nm}}$ = ●—● = proteína

$A_{535 \text{ nm}}$ = ○—○ = atividade de xiloglucanase (ou glucanase)

No mesmo gel, após lavagem e re-equilíbrio com LiCl 50 mm foram aplicados 3 ml de xiloglucana S-5 de *T. indica* =

$A_{490 \text{ nm}}$ = □---□ .

As dextranas de calibração foram corridas com o mesmo eluente.

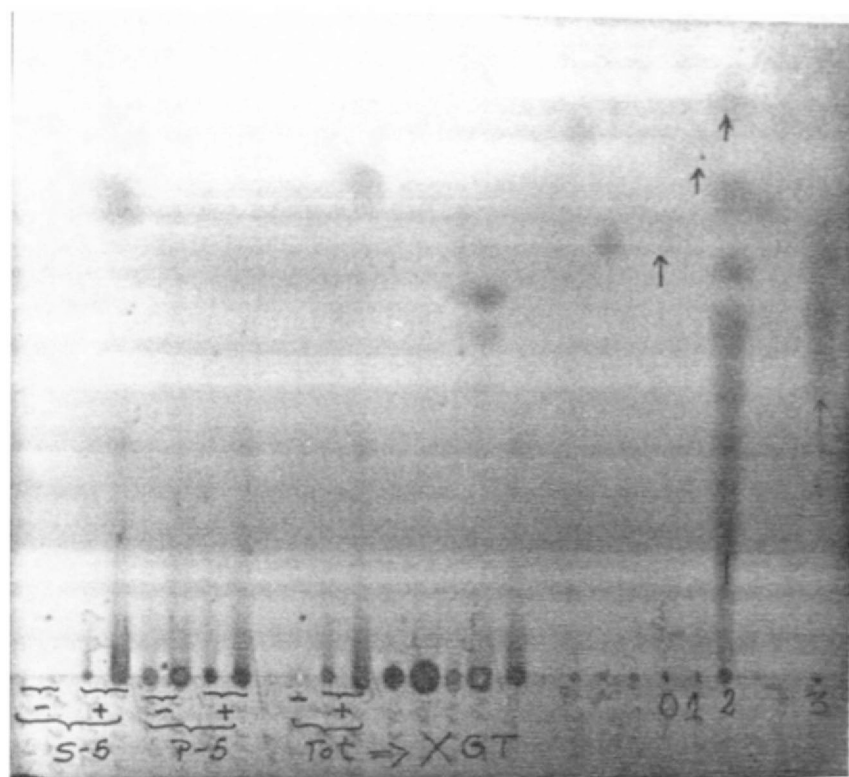


Fig. 62. Cromatograma em camada delgada (TLC): Produtos da hidrólise exaustiva de xiloglucana de tamarindo pelo componente α -xilo- β -glucanase do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

(Condições de corrida: similares às da fig. 41).

Amostras:

incubações de xiloglucana (XGT) Total (Tot), Solúvel (S-5) e Insolúvel a 5 krpm (P-5) na ausência (-) ou na presença (+) de suco gástrico de caracol (S-10), em tampão acetato 50 mM pH 5,5 por 24 h a 40°C.

Aplicados na cromatoplaça o sobrenadante da inativação de cada ensaio com 3 vol. de metanol.

Padrões:

- 0 = celobiose
- 1 = D-glucose
- 2 = D-xilose + β -D-xiloligossacarídeos
- 3 = β -D-laminari- biose, -triose e -tetraose.

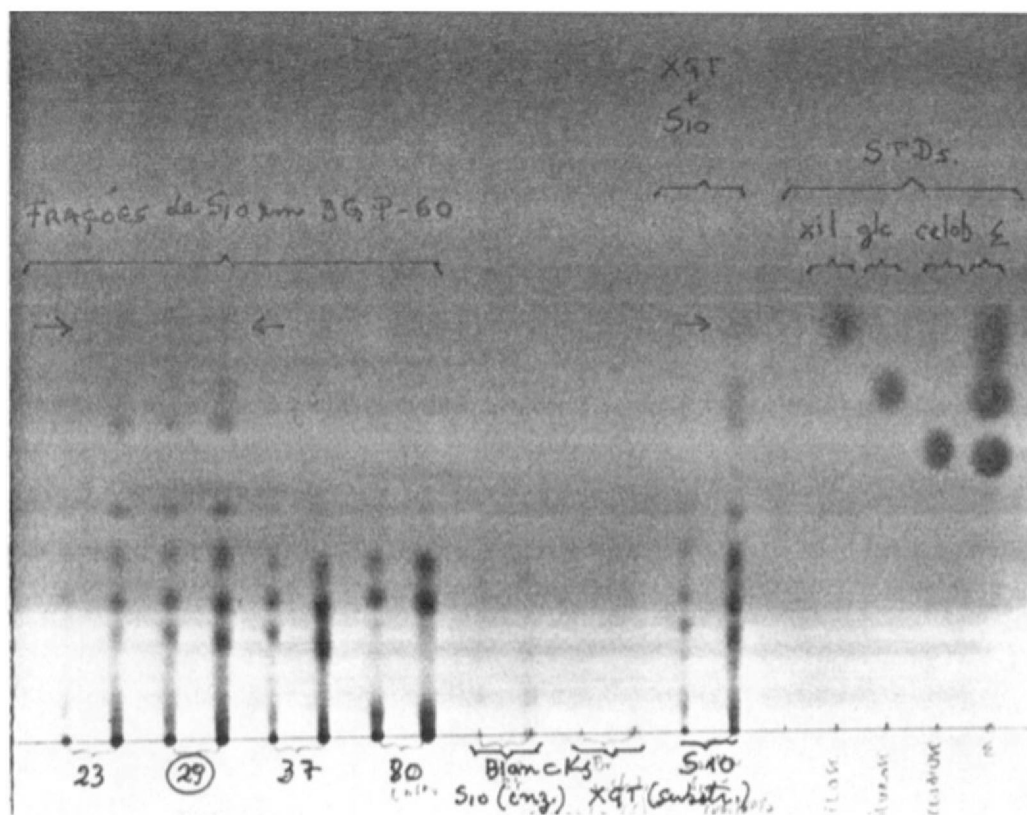


Fig. 63. Cromatograma (TLC) do perfil de atividades de α -xilo- β -glucanase ou β -glucanase no suco gástrico de *M. paranaguensis* e suas frações de filtração em Biogel P-60.

(Cromatoplaça = Sílica Gel 60, Merck; solvente = acetato de etila : ácido acético : isopropanol : ácido fórmico : água 25:10:5:1:15 revelador = orcinol 0,25g% em metanol:H₂SO₄ (95:5) aquecimento brando - 90° - 3 min).

Amostras: (do ensaio com xiloglucana S-5 de *T. indica*)

37 e 80 = frações da coluna de BioGel enriquecidas na atividade β -glucanásica.

23 e 29 = idem enriquecidas na atividade de α -xilo- β -glucanase ou α -xilosidase + β -glucanase

S-10 = suco gástrico de *M. paranaguensis* (da mesma partida aplicada à coluna), contendo as mesmas atividades das frações 23 e 29.

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

xil = D-xilose

glc = D-glucose

celob = celobiose

Σ = mistura dos padrões

Blanks: para enzima (S-10) e substrato (XGT).

dos dois monossacarídeos em todas frações que compõe o perfil amplo de eluição. No caso, frações "ativas" em xiloglucanase (critério de liberação de poder redutor), obtidas em uma coluna de menor faixa de fracionamento (Bio Gel P-60). Comprovou-se que uma atividade geradora de oligossacarídeos (com DP > celobiose) está disseminada por todo "arco" de eluição, mas que a atividade geradora de xilose + glucose + dissacarídeo com R_f intermediário entre glucose e celobiose (provavelmente isoprimerose) estava mais restrito às frações do centro do "arco" de eluição (linhas 29 e vizinhas a menor). Em nenhuma circunstância de fracionamento do suco gástrico de **Megalobulimus paranaguensis** (fig. 64) pode-se encontrar uma situação em que qualquer preparação liberasse exclusivamente D-xilose ou, em outras palavras, não se pode detectar uma separação ou purificação da atividade de α -xilosidase, a qual persistiu, em todos os casos, acompanhada da atividade de β -glucanase. Este é um ponto que permanece pois, em aberto, para futuras investigações com o suco gástrico de **M. paranaguensis**: separação das duas hidrolases (xilosidase e glucanase) cujas ações se dão sobre os dois tipos diferentes de configuração anomérica: e respectivamente ou, alternativamente, comprovação de que tão diferente trabalho hidrolítico (ligações 1,4 e 1,6, além da distinta configuração) seja cumprido por uma mesma entidade enzimática (proteica).

11 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS CONTENDO D-APIOSE

Apiose é uma pentofuranose ramificada (BELL, 1962) que integra alguns glicosídeos como a apiina e algumas galacturo-

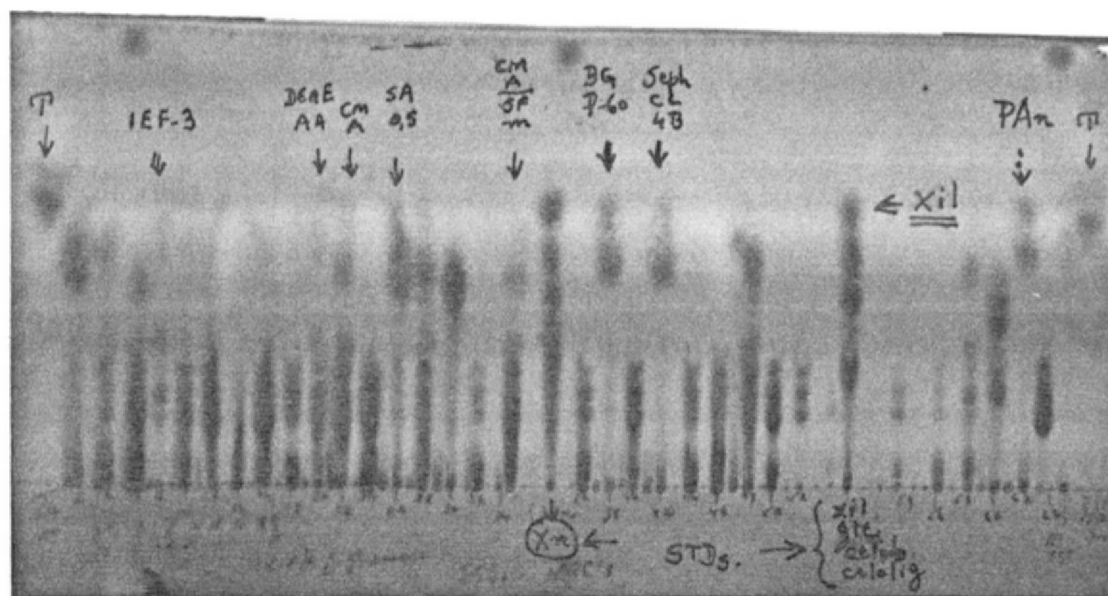


Fig. 64. Cromatograma em camada delgada (TLC): monitoramento da atividade de α -xilo- β -glucanase em diferentes frações derivadas de suco gástrico de *M. paranaguensis*.

(Condições de corrida: similares às da fig. anterior)

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

X_n = D-xilose + β -1,4-D-xiloligossacarídeos
 xil = D-xilose
 glc = D-glucose
 celob β -celobiose
 celoli = β -celoligossacarídeos

Amostras: (+) para a atividade α -xilo- β -glucanásica

IEF-3 = fração 3 da esoeletrofocalização preparativa (pI ~ 4; fig. 6).
 DEAE-AA = fração ácida da coluna de DEAE-BioGel A (eluato com acetato de amônio 1 M)
 CM-A = fração ácida da coluna de CM-BioGel A (eluato aquoso inicial = V_0)
 CM-A/SF-m = a fração anterior, em eluição de afinidade em microcoluna de SolkaFloc (eluato na faixa de $\sim 2 \times V_0$).
 BG/P-60 = fração de S-10 excluída em coluna de BioGel P-60.
 SphCL-4B = fração de S-10 incluída (zona de V_t) na coluna de Sepharose CL-4B.
 PAn = Pectinase (bruta) de *A. niger*

. . .

T = hidrolizado trifluoracético de xiloglucana (2 M; 100°C; 18 h)

nanas (figs. 65-A e 65B). Faz parte do grupo dos "açúcares raros" encontrados na natureza e sua inserção, como resíduo terminal, em glicosídeos e polissacarídios gerou uma teoria de que a mesma conferia resistência frente à degradação microbiana (BACON & CHESCHIRE, 1971). A presença de apiina em determinada planta não é por si só indicativa de que a planta contenha polissacarídios apiosilados (WATSON & ORESTEIN, 1975). Com referência ao metabolismo de apiose, os trabalhos se concentram na atividade das transferases envolvidas na biossíntese de substratos apiosilados (PAN & KINDEL, 1977; MASCARO & KINDEL, 1977). Não parece haver na literatura nenhum trabalho dirigindo especial atenção ao processo inverso: hidrolases que sejam específicas para a hidrólise de apiose a partir de substratos naturais apiosilados. Uma comunicação prévia em que se observou desdobramento de apiina por ação de suco de caracol (FONTANA, FEIJO & DUARTE, 1976) foi então retomada com o objetivo de uma investigação mais sistematizada pois à época o suco gástrico usado era uma preparação totalmente bruta em que não se adotou nenhum procedimento de eliminação de possíveis contaminações microbianas. Uma dificuldade para avaliar a liberação de apiose é a conhecida confusão deste açúcar ramificado com pentoses ou deoxi-hexoses em ensaios cromatográficos. Na fig. 66 (linha 2) pode-se ver a satisfatória resolução cromatográfica para 4 monossacarídios de interesse nesta questão, quando se usa um solvente especialmente desenhado (FONTANA, GEBARA, BLUMEL, SCHNEIDER, MACKENZIE & JOHNSON, 1988): L-ramnose, D-xilose, L-arabinose e ácido D-glucurônico. Mesmo assim, D-apiose (apontada com uma seta horizontal) pode ser confundida com L-arabinose, embora a resolução para o

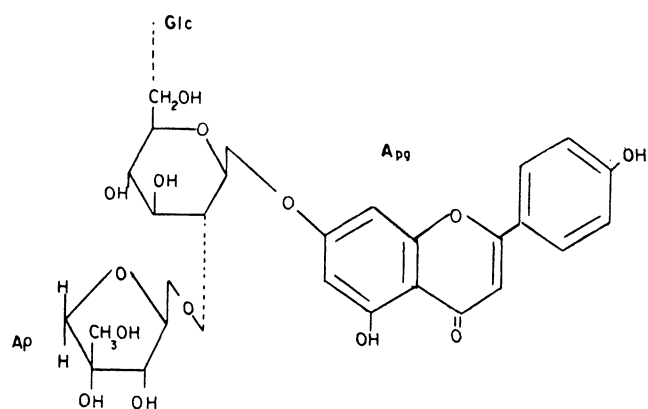


Fig. 65-A. Estrutura da Apiina

Apiosídeo; apigenina-7-glucosil-apiose; 4', 5, 7-tri-hidroxi-flavona-7-glucosil-apiosídeo (2-O-β-D-apiofuranosil-β-D-glucopiranosil)oxi)-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona.

Apg = Apigenina

Glc = Glucose

Ap = Apiose

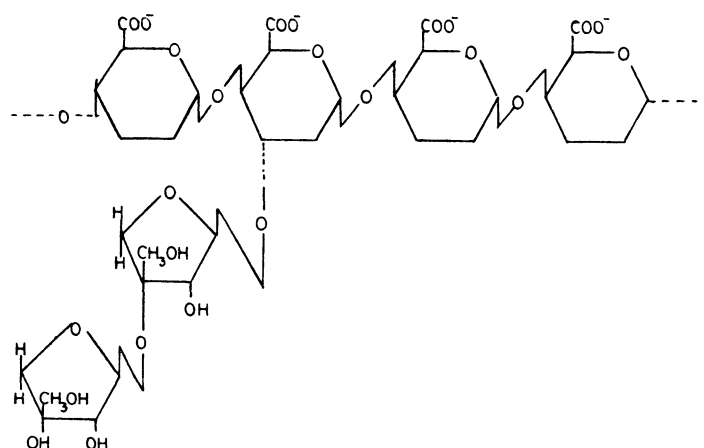


Fig. 65-B. Segmento de estrutura da Apio-galacturanana de **Lemma minor** ("erva-daninha-de-pato").

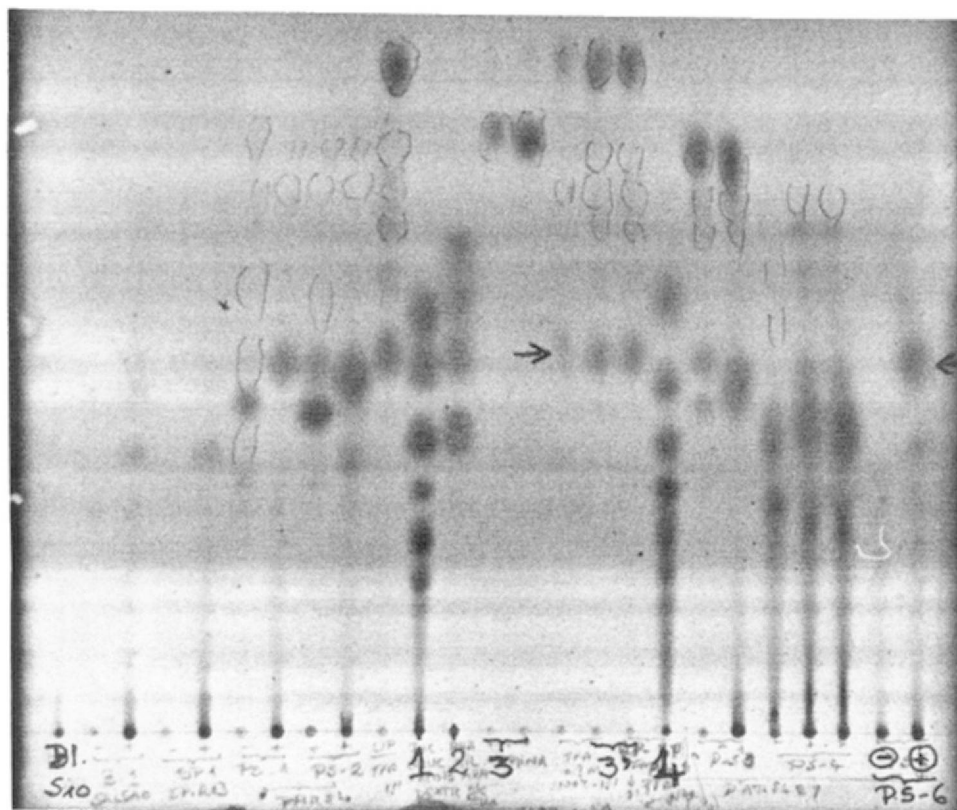


Fig. 66. Cromatograma em camada delgada (TLC) da hidrólise ácida (TFA) ou enzimática (S-10) de substratos naturais D-apiosilados.

(Corrida: similar à da fig. 63).

Bl. S-10: "blank" de enzima de caracol (S-10).

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

1 = L-fucose, D-glucose, celobiose, celodextrinas

2 = L-rhamnose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucur

3 = Apiina (apigenin-7-glucosil-apiosídeo)

3' = hidrolizado trifluoracético (TFA 0,3 M - 100°C - 15 min) da apiina.

4 = D-xilose + xiloligossacarídeos (série β -1,4)

Amostra: incubada na ausência (-) ou na presença (+) de suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*

PS-6 = "apiopectina" (= apio-galacturanana) de *Petroselinum* sp. (extrato com oxalato de amônio a partir de massa umbelal previamente extraída com solventes orgânicos e água).

. . .

Notar: a evidência para uma putativa atividade de D-apiose hidrolase ("apiase") no suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

substrato original (apiina = apiosil-glucosil-apigenina; linha 3, fig. 66) e seu derivado parcial de deapiosilação (apigenina-glucosídeo; mancha de maior migração na linha 3') sejam excelentes. Na mesma figura, analisou-se uma amostra de apiogalacturonana (apiopectina) extraída de *Petroselinum* sp. (linha PS-6 (-)) ou a mesma após tratamento com suco gástrico de *M. paranaguensis* (linha PS-6 (+)) (ambas as amostras são sobrenadantes metanólicos das incubações exaustivas na ausência e presença de enzima, respectivamente). O problema foi então re-examinado com um novo solvente (propanol : nitrometano : água : acetato de etila; 10:4:8:10,5) na mesma fase estacionária (sílica gel microgranulada), de modo a resultar numa migração para apiose em posição intermediária entre ramnose e xilose. Nestas condições, não se logra resolução entre glucose e arabionose, mas ambas migram aquém dos demais monossacarídeos antes mencionados. Mantém-se, por outro lado, ótima resolução para apiina e apigenina-glucose (as quais também são facilmente localizáveis pela fluorescência à luz UV de comprimento longo). Ademais, paciente revelação com orcinol-sulfúrico permite uma clara diferenciação através das cores resultantes para os distintos açúcares livres: D-apiose resulta uma cor entre marrom-claro e marrom-escuro (dependendo do tempo de aquecimento), possivelmente por ser uma pentose ramificada que, por desidratação, não forma furfural (VONGERICHTEN, 1906). Observando agora o comportamento do hidrolizado de apiopectina por ação do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* (linhas ApPec) surge um claro indício de uma atividade de "apiase" (D-apiose hidrolase).

A técnica de análise de GLC de monossacarídeos na forma

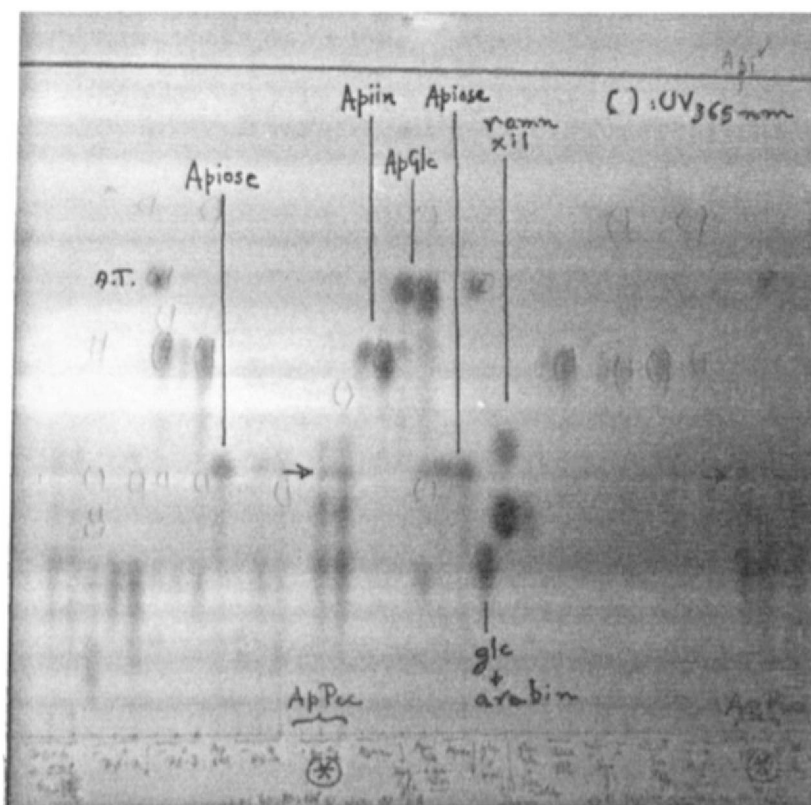


Fig. 67. Cromatograma em camada delgada (TLC): reforço à evidência de uma atividade do tipo D-âpio-hidrolase no suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

Cromatoplaca: SílicaGel 60, Merck

Solvente : Propanol:Nitrometano:Água:Acet. Etila 10:4:8:10,5

Revelador : Orcinol metanólico em H₂SO₄

Padrões: (como assinalado na foto)

D-Apiose

Apiina

Apigenina-glicosídeo

D-glucose

L-ramnose + D-xilose

Amostra:

ApPec = (PS-6) = Apio-Pectina de *Petroselinum* sp. (extrato com oxalato de amônio) incubada com suco gástrico de *M. paranaguensis*.

. . .

(A.T. = Azul de Timol, marcador de corrida).

(Os contornos em "spots" denotam fluorescência sob iluminação de ultravioleta de comprimento de onda longo (UV_{365nm}) em inspeção prévia à nebulização com o reagente de orcinol).

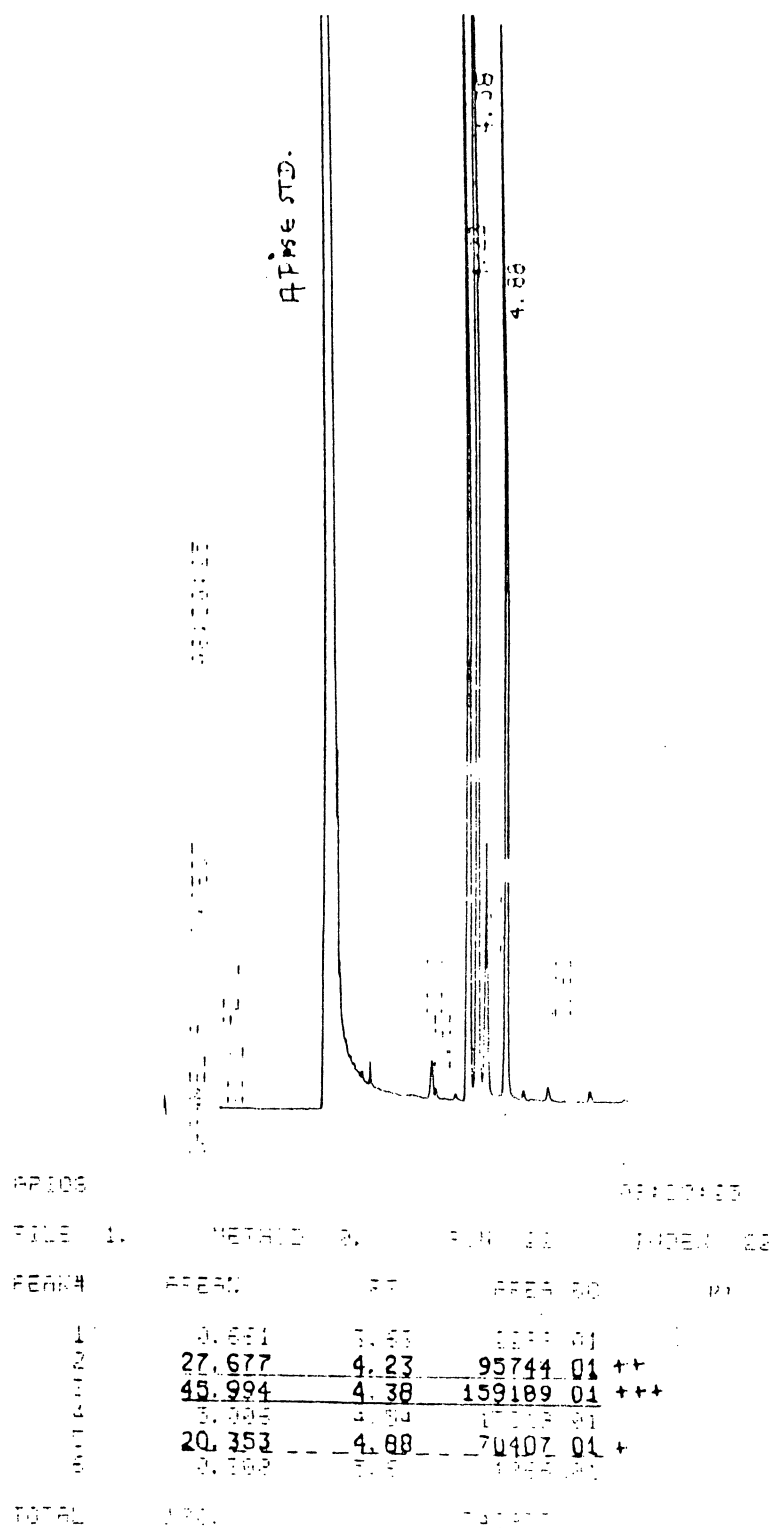


Fig. 68. Cromatograma em fase gasosa (GLC) de silil-derivado do padrão de D-apiose.

(Condições de derivatização e corrida: v. tabela 14).

de derivados per-sililados (sem prévia redução com derivados per-sililados (sem prévia redução com boridreto sódico, ou seja, sem eliminação dos anômeros e conseqüentemente sem abertura do anel, e, portanto, preservando-se o equilíbrio de formas pirano ou furano) resulta na obtenção, para cada monossacarídeo, de 2 a 4 picos. A vantagem (descontada a simplificação obtida no método de redução prévia em que o alditol resulta em um único pico) é que a variedade de picos reforça o grau de segurança na identificação por comparação com o respectivo padrão. Isto combinado ao emprego de coluna capilar, melhora todavia a análise e interpretação. Na tabela 14, resgataram-se os dados individuais das corridas cromatográficas constantes das figs. 68-A até D. Os resultados claramente confirmam a existência de uma atividade de "apiase" (apiose-hidrolase) no suco gástrico de **M. paranaguensis**, mais ativa para apiopectinas (amostras PS-6 e PS-4) do que para glicosídeos apiosilados (amostra PS-3). Os últimos oferecem a dificuldade de gerarem géis rígidos ou extremamente viscosos, portanto, a possibilidade de restrição à ação da enzima por problema de solubilidade. O emprego de temperaturas mais elevadas nas incubações (para melhorar a solubilidade) há que ser tomado com cautela, pois a ligação apiose-glucose é muito lábil. A referida atividade de "apiase" pode igualmente ser detectada, quando se empregou a combinação de Celluclast® + pectinase fúngica (amostra PS-6 + C/P).

12 ATIVIDADE LIPÁSICA DE SUCO GÁSTRICO DE **M. paranaguensis**

Este grupo de hidrolases foi investigado utilizando-se

TABELA 14. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM FASE GASOSA (GLC) DE DERIVADOS SILILADOS DE D-APIOSE E OUTROS MONOSSACARÍDIOS LIBERADOS DE SUBSTRATOS APIOSILADOS NATURAIS POR AÇÃO DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis*.

PADRÕES AMOSTRAS	R _T intensidade dos picos										
	D-Apiose	4,23 ++		4,38 +++			4,88 +				
D-Xilose		4,33 ++		4,57 +			5,39 +++				
L-Arabinose			4,48 +++			5,30 +		5,46 +++			
L-Ramnose				4,61 ++			5,42 +				
D-Glucose							6,34 ++++	6,92 +	7,14 ++	7,89 +++	
D-GalactUr									7,49 ++	8,56 +	8,86 +++
PS-6 + S-10		4,39 +++		4,50 ++		5,31 +				7,88 +++	
PS-6 + C/P	4,23 +	4,38 +++		4,49 ++					7,41 +++		8,85 +++++
PS-4 + S-10		4,39 +			4,69 ++					7,89 +++	
D-Apiose	4,28 ++	4,43 +++				4,94 +					
PS-3 + C/P	4,28 (tr.)	4,43 +				4,94 ++				(7,96) +++	8,85 ++++
PS-3 + S-10		4,42 (tr.)								(7,98) +	

TABELA 14. (Conclusão)

Condições para GLC:

Amostras de padrões, controles (substratos incubados sem enzima) e substratos incubados com suco gástrico (S-10) ou mistura de celulase: pectinase (Celluclast® + Pectinase de *A. niger* P-5146, Sigma, 1:1) foram liofilizadas, redissolvidas num volume mínimo de piridina e sililadas diretamente com BSTFA a 65°C por 30 minutos.

A coluna de SE-30 (25QC2, on WCOT), 25 m, D.I. 0,22 mm foi operada isotermicamente a 190°C (2 min), seguindo-se programação a 5°C/min até 230°C, temperatura final mantida isotermicamente por 2 min. A integração foi anulada na zona de R_T inicial (picos de solventes e reagente).

R_T = Tempo de Retenção (minutos, 1/100 de minuto).

+ = Intensidade de picos principais, deduzidas as áreas respectivas registradas nos controles. Em acordo à área integrada, (+++) ou (++++) corresponde ao pico principal de cada corrida e (+) corresponde ao pico de menor área; (tr.) = traços.

Obs.: No segundo conjunto de corridas, o componente de maior tempo de retenção apontado (R_t = 7,96 ou 7,98) está tentativamente apontado como D-glucose.

Substratos:

PS = frações obtidas a partir de massa umbelal de *Petroselinum* sp.

PS-3 = material de consistência cerosa que precipita por resfriamento de extratos hidro-alcoólicos a quente.

PS-4 = "apio-pectina" hidrossolúvel e precipitável por etanol a 75%.

PS-6 = "apiopectina" extraída com oxalato de amônio 0,5% a 60°C.

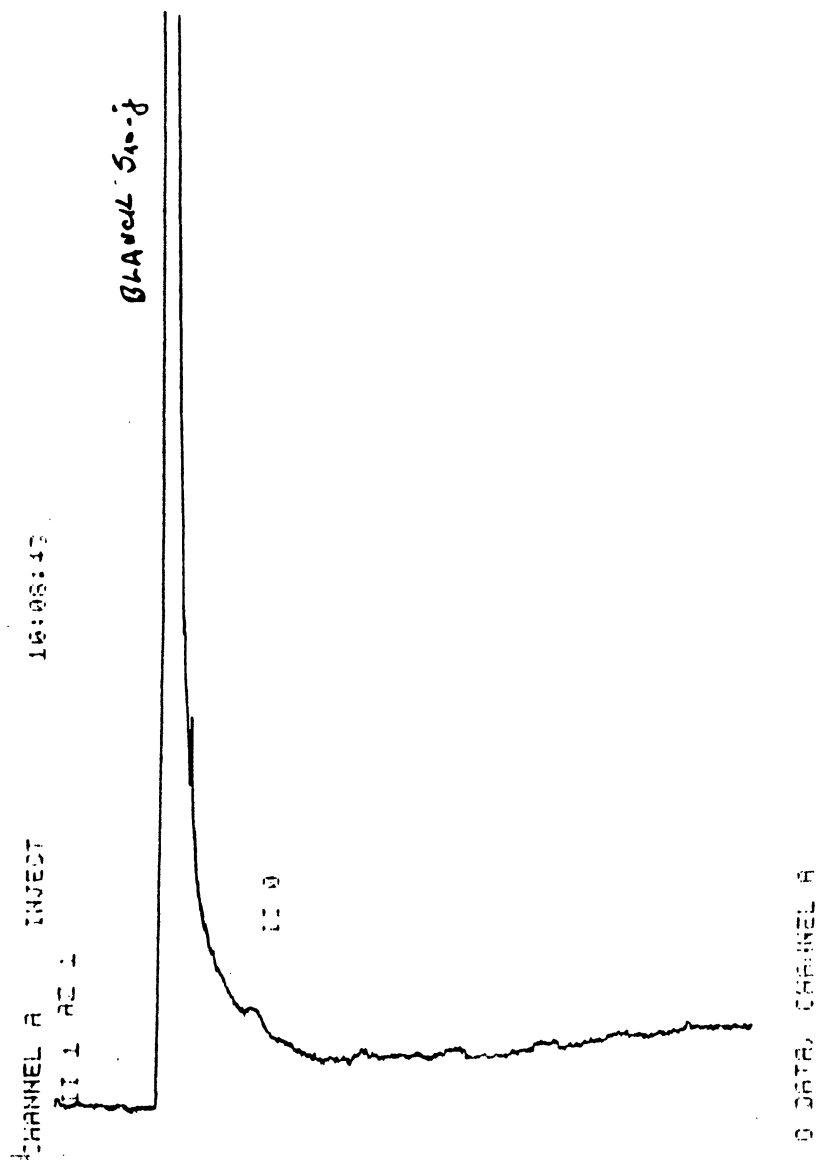


Fig. 68-A. GLC de silil-derivados: "blank" de suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

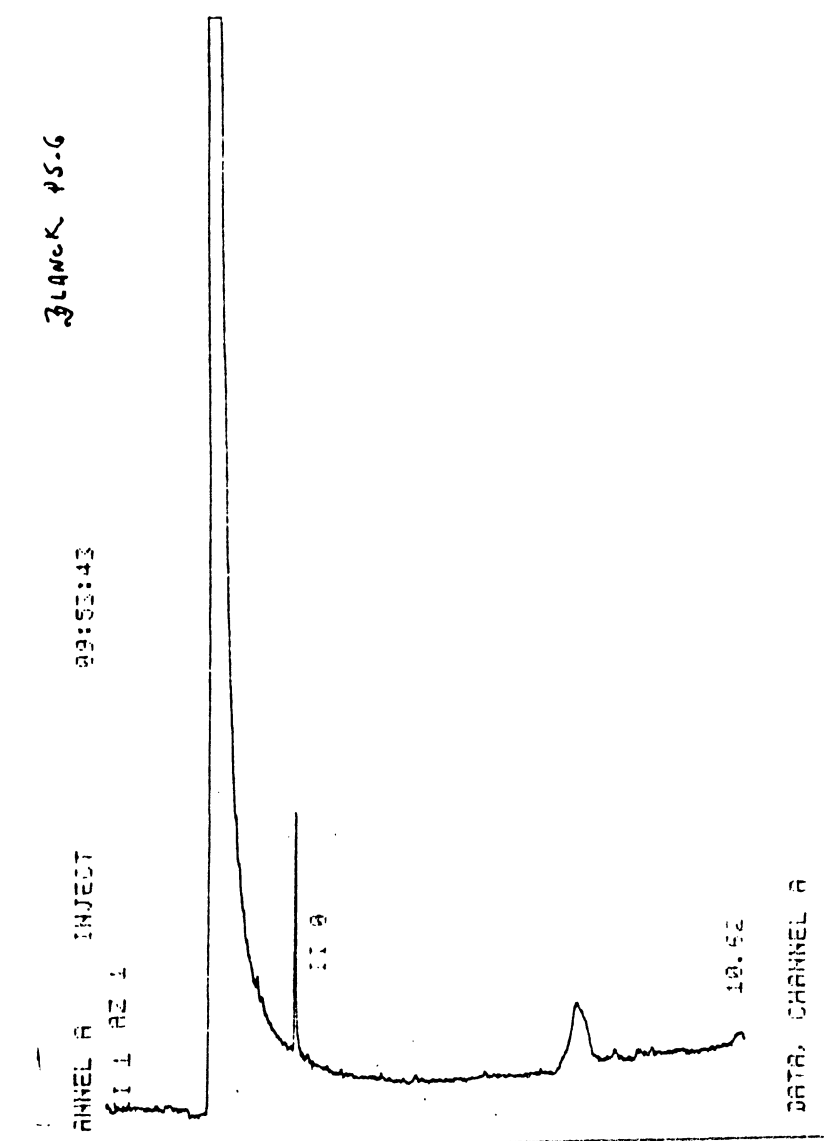


Fig. 68-B. GLC de silil-derivados: "blank" de substrato: Apiopectina (PS-6).

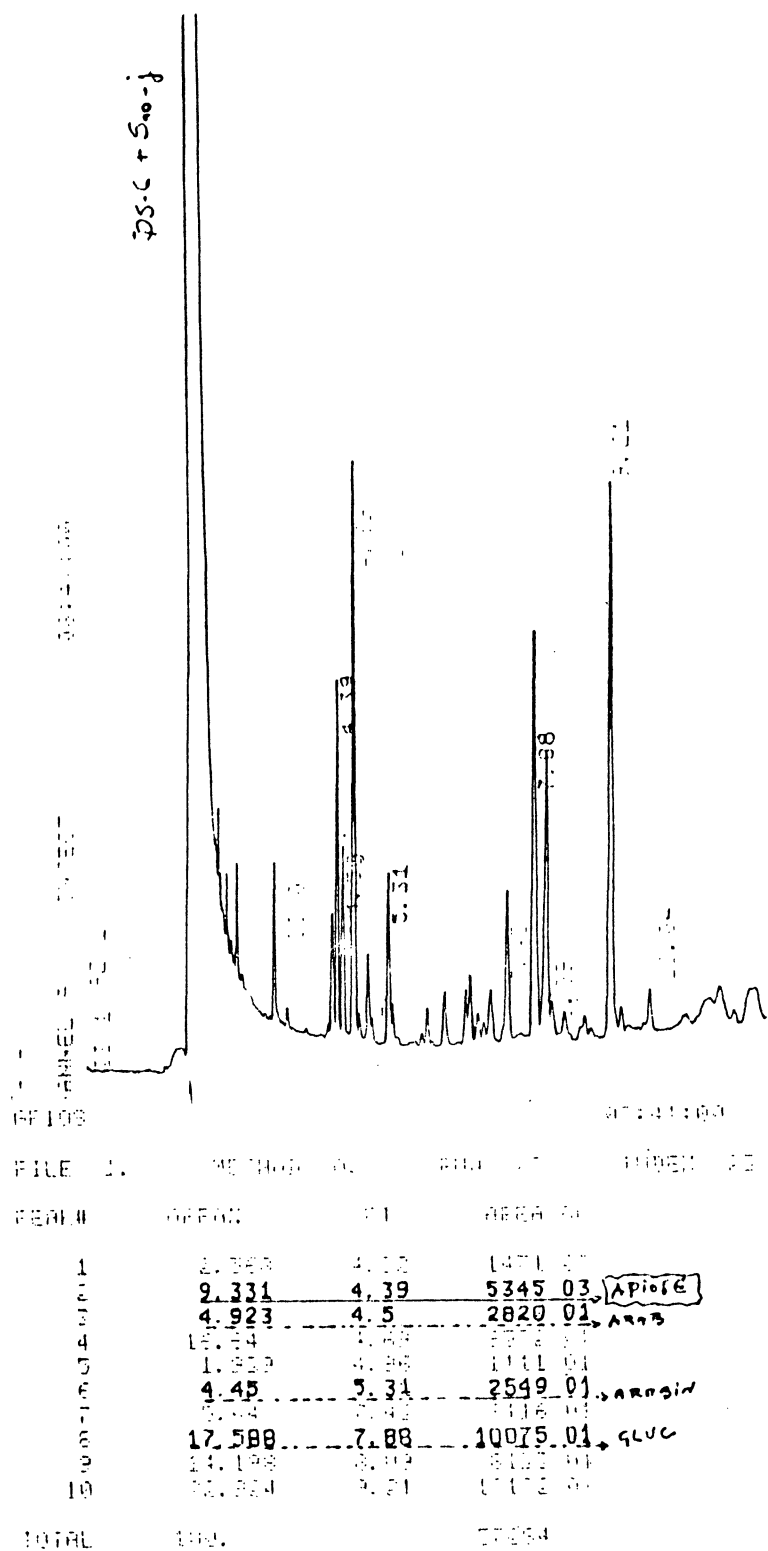


Fig. 68-C. GLC de silil-derivados dos produtos de hidrólise de (β) -D-apiosil- α -D-galacturonana (apiopectina) por ação do suco gástrico de *M. paranaguensis*.

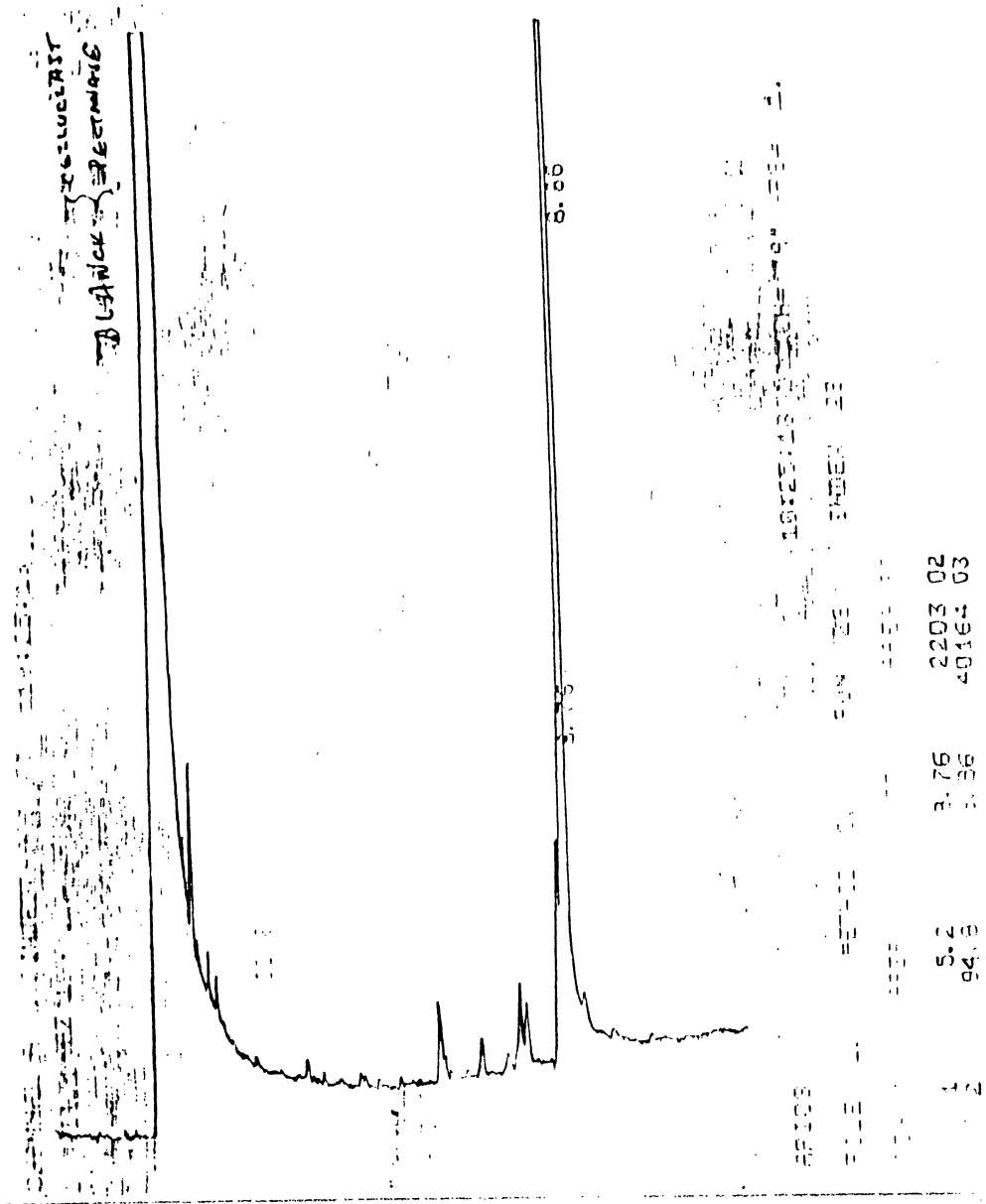


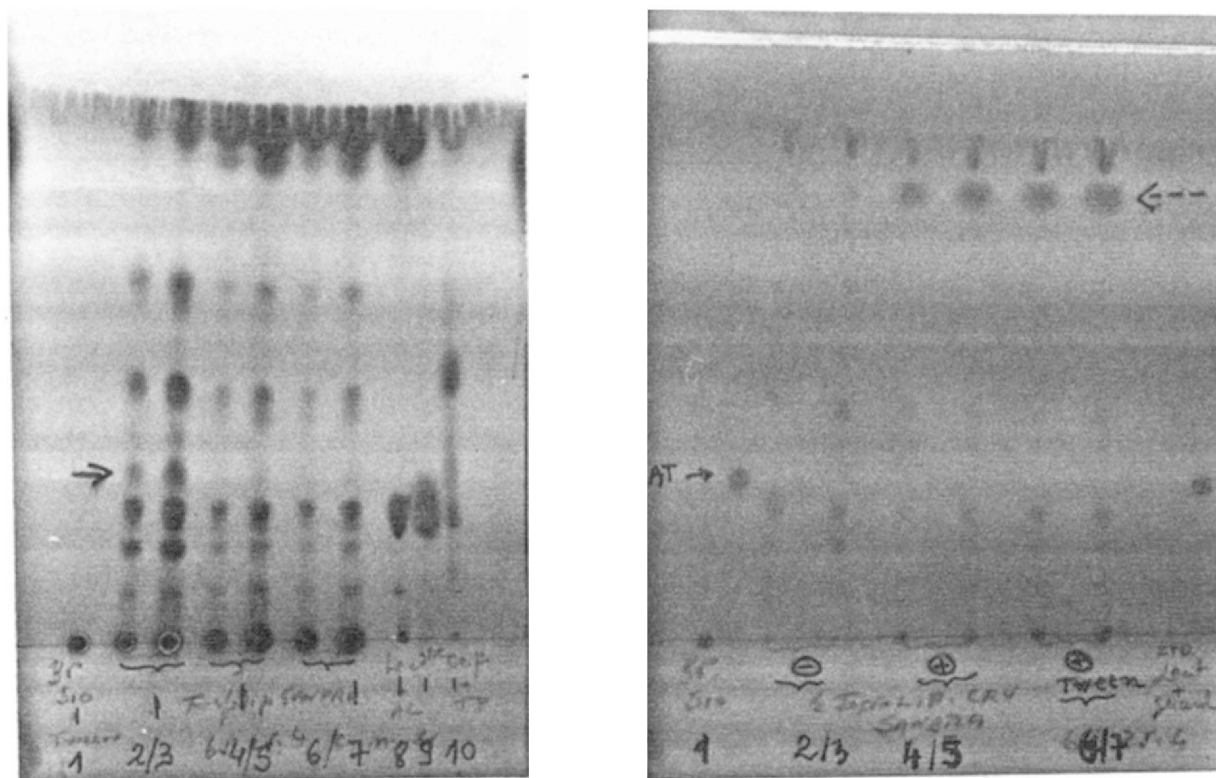
Figura 68-D. GLC de silil-derivados: "blank" de enzimas: Celluclast® + Pectinase.

uma fração bruta de semente de soja, solúvel em solventes orgânicos, parcialmente enriquecida em fosfolipídios (amostra SANBRA, provida por Richard Fontana; linha 2/3 da cromatoplaça de TLC da fig. 69-A), onde se pode detectar cerca de 10 componentes. Em tal sistema cromatográfico, os lipídios "neutros" (mono-, di- e triglicerídios, ácidos graxos livres, esteróides, etc.) migram na zona mais avançada, os glicolipídios entre a mediana e mais avançada e os lipídios polares (fosfolipídios) migram na faixa inicial até a mediana. Após incubação exaustiva com S-10 (suco gástrico; linha 4/5) e mesmo na presença de detergente (Tween-80, para forçar melhor acesso aos substratos; linha 6/7), pode-se verificar que a ação do suco é limitada: um único componente (com R_f intermediário entre lecitina = linha 8 e cefalina = linha 10) é completamente hidrosilado. Os demais são apenas em parte hidrolisados (verificar, com melhor clareza, a zona de "front" da placa gêmea, revelada com vapores de iodo; placa 69-B).

Para algumas aplicações de interesse biotecnológico do suco de caracol (e.g., protoplastificação), o ideal seria a preparação enzimática estar completamente livre de lipases (e também proteases) com vistas à maior preservabilidade do material processado (protoplastos), mas um teor reduzido destas hidrolases já é de interesse e não parece criar maior problema quando da aplicação da técnica (figs. 12 a 26).

13 ATIVIDADE(S) TRANSGLICOSILANTE(S) DO SUCO GÁSTRICO DE *M. paranaguensis*

Quando do estudo de estrutura fina de material polissa-



A
revelado com p-anisaldeído-sulfúrico

B
revelado com vapores de iodo

Fig. 69. Cromatograma em camada delgada (TLC) da ação de lipases do suco gástrico de *M. paranaguensis* sobre fosfolipídios brutos de semente de soja.

Cromatoplaca: SílicaGel 60, Merck
Solvente : CHCl_3 : MeOH : H_2O 65:25:4

1 = "blank" de enzima (S-10)
8 = padrão de lecitina
9 = padrão de glicerol
10 = padrões de cefalina + tripalmitina

Amostras:

2/3 = fosfolipídios crus incubados na ausência de enzima (S-10)
4/5 = fosfolipídios crus incubados na presença de enzima (S-10)
6/7 = idem de 4/5, mais Tween-80 0,01 g% (conc. final).

carídico, o resgate de fragmentos oligossacarídios que fielmente seja representativo da estrutura nativa e completa, torna-se indispensável. Se, por um lado, o processo hidrolítico em sua plenitude, i.é., a monomerização pode ser governado pela manipulação de parâmetros cinéticos, tais como, pH, temperatura, concentração de enzima, inibidores, etc., um risco teórico é a co-produção de artefatos (a partir de monômeros ou monômeros e oligômeros) pelo processo de transglicosilação. Esta é uma situação relativamente freqüente para muitos sistemas enzimáticos e mesmo ácidos. Para verificar esta possibilidade, dois monômeros de importância na ocorrência natural de fitobiomassa, D-xilose e D-glucose, em soluções concentradas, foram exaustivamente incubados com concentrações também elevadas de suco gástrico. Os resultados registrados nas figs. 70-A e 70-B parecem excluir qualquer resultado significativo de transglicosilação. À exceção única de traços de um componente com migração cromatográfica superior aos monossacarídios mencionados (assinalados com setas; linhas G-10 e X-10, respectivamente, para xarope de glucose e de xilose) e cuja natureza é desconhecida, os substratos não sofrem nenhuma modificação, e o que é mais importante nenhum traço sequer de di- ou oligossacarídio é detectável.

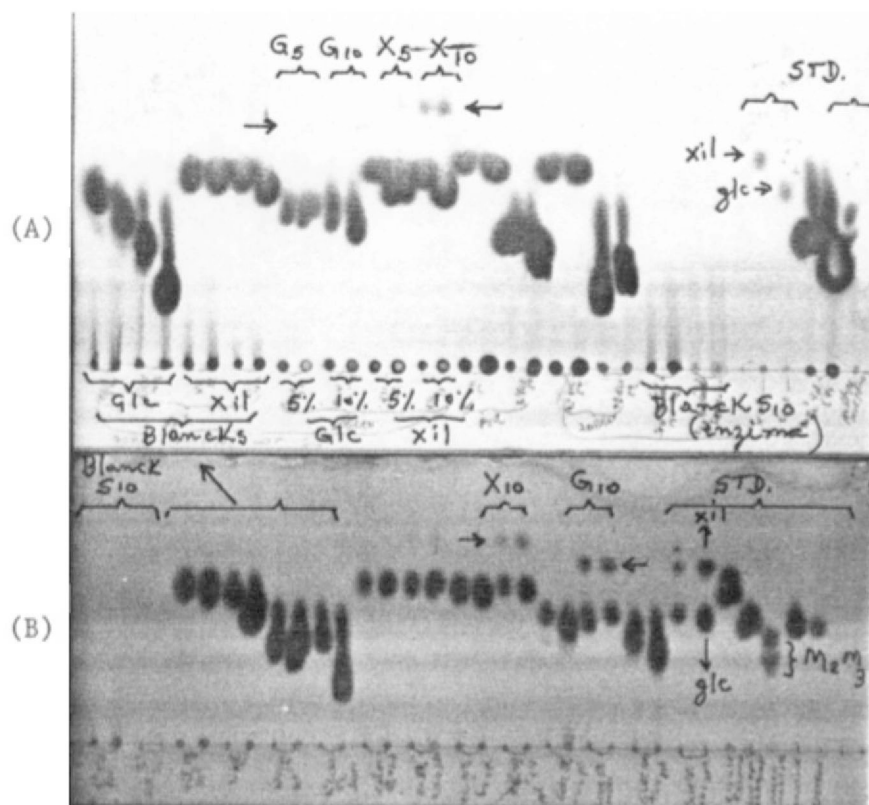


Fig. 70. Monitoramento cromatográfico em camada delgada (TLC) de possíveis atividades transglicosilantes do suco gástrico de *M. paranaguensis* (S-10).

(Condições de corrida : similares às da fig. 63)

(A) Cromatoplaça com "sample overload" (sobrecarga)

(B) Cromatoplaça com amostramento convencional

Amostras:

Blanks glc; xil = controles de substratos incubados na ausência de enzima (S-10)

Blanks S-10 = incubado apenas de enzima

G5 , G10 = incubações de xarope de glucose (5% ou 10 g%) na presença de enzima

X5 , X10 = idem para xarope de xilose (5 ou 10 g%)

Padrões: (em ordem decrescente de migração)

xil = D-xilose

glc = D-glucose

M₂, M₃ = maltose e maltotriose

...

setas = compostos gerados, em reduzida proporção, nas incubações de soluções concentradas de D-xilose ou D-glucose com suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

IV - CONCLUSÕES

Os dados seguintes foram levantados a partir da experimentação laboratorial com o molusco terrestre **Megalobulimus paranaguensis** e mais particularmente com o suco gástrico obtido a partir do mesmo:

1. O complexo enzimático se caracteriza por alto conteúdo proteico (> 140 mg proteínas totais/ml) e é molecularmente heterogêneo (35 bandas tingíveis pelo Coomassie Brilliant Blue) podem ser detectadas após isoeletrofocalização na faixa pI 3-10).

2. O suco gástrico fresco vem acompanhado de variada microflora. Dois isolados bacterianos exibiram atividade xilanolítica em ensaio com substrato solidificado com ágar, a qual se reduz quando do ensaio em meio líquido agitado.

3. Adequando-se o "osmoticum", o suco presta-se à protoplastificação de leveduras (**Saccharomyces, Candida, Pichia, Torula**), fungos (**Aspergillus, Tricholoma**), bem como para a individualização celular, esferoplastificação e protoplastificação de tecidos vegetais superiores (**Dahlia, Stevia**).

4. Alguns edulcorantes naturais (esteviosídeo e rebaudiosídeo; glicirrizina) ou artificiais (aspartame) são hidrolisados, liberando componentes essenciais (glucose e ácido glucurônico; fenilalanina, ácido aspártico e metanol, respectivamente).

5. Um amplo espectro de ligações glicosídicas podem ser hidrolizadas como demonstrado para substratos cromogênicos (nitro e umbeliferil derivados) de pentoses e hexoses.

6. As atividades hidrolíticas dos tipos protease, nuclease e lipase são muito limitadas quando comparadas com as carboidrases.

7. A enzima básica (endo- β -D-xilanase) bem como as complementares (β -D-xilosidase ou β -D-xilobiase; α -L-arabinofuranosidase; α -(4-O-metil)-D-glucuronidase e O-acetil-D-xilana esterase) do complexo xilanolítico estão presentes no suco. Uma detalhada metodologia para a análise deste grupo de hidrolases foi estabelecida, envolvendo: cromatografias em camada delgada (TLC), líquida de alta resolução (HPLC) e em fase gasosa (GLC), eletroforese e espectrometria de massa. O complexo xilanolítico é relativamente estável ao armazenamento com refrigeração ou congelamento seguido de vários descongelamentos.

8. Ácidos fenol-carboxílicos simples são liberados quando o suco age sobre substratos de pequeno grau de polimerização (fração solúvel em metanol após celulólise exaustiva) ou de fitobiomassa nativa (bagaço de cana). Dentre estes produtos de reação identificaram-se os ácidos ferúlicos e p-coumárico.

9. Tanto no suco bruto, quanto em frações obtidas por filtração em gel, isoeletrofocalização, troca iônica ou por precipitação fracionada com sal, são detectáveis as atividades depolimerizantes para ambos componentes monossacarídicos de α -xilo-D-glucanas.

10. D-apiose é parcialmente liberada por ação do suco

gástrico sobre material péctico de **Petroselinum** sp. (apiogalacturonana solúvel em oxalato de amônio).

11. A atividade lipolítica do suco gástrico é limitada frente a extratos brutos de oleaginosas e não experimenta incremento na presença de detergente (Tween-80). Igualmente não são muito expressivas as atividades do tipo protease e nuclease (respectivamente medidas com azo-substratos e tRNA, respectivamente).

12. Não se pode observar atividade transglicosilantes do suco gástrico de **Megalobulimus paranaguensis** quando se ensaiaram xaropes de D-xilose e D-glucose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALBERSHEIM, P. The primary cell wall. In: BONNER, J. & VARNER, J.E. (Ed) **Plant Biochemistry**, 3rd ed. NY. Acad. Press, p.226, 1976.
- 2 AMARAL, D.; KUBICKI, D. & TERENZI, H.F. Release of protoplasts from the galactose oxidase producing mold **Dactylium dendroides**. *Canad. J. Microb.*, **29**(7), 763, 1983.
- 3 BACON, J.S. & Cheshire, M.V. Apiose and mono-O-methyl sugars as minor constituents of the leaves of deciduous trees and other species. *Biochem. J.*, **124**, 555, 1971.
- 4 BARBOSA, A.M.; PASSOS, M; CHOCIAI, J.G.; CHOCIAI, M.B.; GEBARA, M.; HAULY, M.C.O.; ROMANÓ D. & FONTANA, J.D. Native cane bagasse fungal hemicellulolysis. *Arq. Biol. Tecnol.*, **32**(1), 277, 1989.
- 5 BARBOSA, A.M. Atividade xilanolítica dos fungos **Dactylium dendroides** e **Fusarium oxysporum**. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1984.
- 6 BELL, D.J. Branched-chain sugars (Apiose). *Methods in Carboh. Chem.*, **1**, 260, 1962.
- 7 BIELY, P.; MACKENZIE, C.R. & SCHNEIDER, H. Acetylxytan esterase of **Schizophyllum commune**. *Methods in Enzymology*, **160**, 700, 1988.
- 8 BOSE, S.K. Observation on the enzyme system involved in the oxidation of gluconic acid by **Aspergillus niger**. *J. Indian Chem. Soc.*, **24**, 327, 1946.
- 9 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, **72**, 248, 1976.
- 10 CARRAU, J. (Comunicação pessoal).
- 11 CORRÊA, J.B.C. Estudos estruturais sobre hemiceluloses de **Mimosa scabrella** (bracatinga). Tese de concurso para Professor Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1985.

- 12 CORRÊA, J.B.C.; GOMES, S.L.; GEBARA, M. Structural features of the hemicellulose from the steam of *Mimosa bracinga*. *Carbohydr. Res.*, **60**, 337, 1978.
- 13 CURY, J.A. Constituintes da parede celular de *Picnoporus cinnabarinus* em função das condições de cultivo. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1974.
- 14 DEKKER, R.F.H. & RICHARDS, G.N. Hemicelluloses: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* **32**, 277, 1976.
- 15 DOW, J.M. & RUBERY, P.H. Chemical fraction of the cell walls of mycelial and yeast-like forms of *Mucor rouxii*: a comparative study of the polysaccharide and glycoprotein components. *J. Gen. Microb.*, **99**, 29, 1977.
- 16 DUARTE, J.H. Mecanismo de Degradação da celulose por enzimas de *Biomphalaria glabrata*. Tese de Doutorado apresentada à Cadeira de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Católica do Paraná, 1968.
- 17 DUARTE, J.H. Estudos estruturais sobre galactanas de moluscos. Tese de concurso para Professor Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1985.
- 18 DUBOIS, M.; GILLES, G.A.; HAMILTON, J.K.; RIBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350, 1956.
- 19 FERRARESI, M.L., BRACHT, A.M.K., BRACHT, A. Hydrolysis of *Stevia rebaudiana* glycosides with the gastric juice of *Megalobulimus paranaguensis*. *Arq. Biol. Tecn.* **28**(3), 399, 1985.
- 20 FONTANA, J.D. Polissacarídeo de reserva de *Polyporus circinatus*, Fr. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1975.
- 21 FONTANA, J.D. Contribuiciones al conocimiento bioquímico de *Neurospora crassa*. Tese apresentada ao Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundacion Compomar (Argentina) para obter o título de Doutor em Ciências Químicas, 238 p., 1980.
- 22 FONTANA, J.D. & BARBOSA, A.M. Qualificação da hemicelulose A do caule de *Gossypium hirsutum* (algodoeiro) através de hidrólise ácida e enzimática. III Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas - FUEM - Maringá - PR. 1985.

- 23 FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H.; GALLO, B.H.; IACOMINI, M. & GORIN, P.A.J. Occurrence of β -D-galactopyranosyl units esterified at O-6 with 2-aminoethylphosphonic acid in the D-galactan of the albumen glands of the snail *Megalobulimus paranaguensis*. *Carbohydr. Res.*, 143, 175, 1985.
- 24 FONTANA, J.D.; FEIJÓ, M.A.L. & DUARTE, J.H. Ação de algumas carboidratases do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis*, Pilsbry-Ihering (1900) sobre substratos definidos. 28ª Reunião Anual da SBPC, 1976.
- 25 FONTANA, J.D. & GEBARA, M. Enzymatic characterization of an iodophilic a glycan of *Neurospora crassa* cell wall using the gastric juice from the snail *Megalobulimus paranaguensis*. 38ª Reunião Anual da SBPC, 1986.
- 26 FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C.R.; JOHNSON, K.G. The α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. *Methods in Enzymology*, 160, 650, 1988.
- 27 FONTANA et al. Uses and potential of a native cellulosic biofilm from *Acetobacter*. (Eleventh Symposium on Biotechnology For Fuels And Chemicals), Colorado Springs, Colorado, USA, maio, 1989. *ASppl. Biochem. Biotechnol.*, 1989 (in press).
- 28 FONTANA, J.D. & TORRES, H.N. An amylose-like polysaccharide associates to *Neurospora crassa* cell walls. III Reunião Regional da PAABS - Cone Sul. X Reunião Anual da SBPC. *Arq. Biol. Tecnol.*, 2(1), 55, 1981.
- 29 FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F. Plant Protoplasts. C.R.C. Press. Inc., Boca Raton, Florida, 1985.
- 30 FRY, S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*, 157, 111, 1983.
- 31 GAILLARD, B.D.E. Separation of linear from brached polysaccharides by precipitations as iodine complexes. *Nature*, 23, 1295, 1961.
- 32 GANTER, J.L.M.S. Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga). Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1988.
- 33 GORDON, A.H.; HAY, A.J., DENSDALE, D.J.S.D. Polysaccharides and associated components of mesophyll cell-walls prepared from grasses. *Carbohydr. Res.*, 57, 235, 1977.

- 34 GORNAL, A.C.; BARDAWIEL, C.G. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751, 1949.
- 35 HALL, J.L. & TAYLOR, A.R. In: *Plant Organelles : Methodological Survey*, 9, 103, 1979.
- 36 HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear response. *Anal. Biochem.*, 48, 422, 1972.
- 37 HAULY, M.C.O.; BARBOSA A.M., CHOCIAI, M.B.; LYRA, I.N.; CHOCIAI, J.G.; MIRANDA, P.; FONTANA, J.D. Mold inulinolytic activity induced by *Dahlia pinnata* tuber power as carbon source. *Arq. Biol. Tecnol.*, 32(1), 277, 1989.
- 38 HAYASHI, T. & MACLACHAN, G. Pea Xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. *Plant Physiol.*, 75, 596, 1984.
- 39 HAYASHI, T. & MATSUDA, K. Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Evidence that enzyme system of xyloglucan synthesis does not contain β -1,4-D-glucosyltransferase activity (EC 2.4.1.2) *Plant Cell Physiol.*, 22, 1571, 1981.
- 40 HAYASHI, T.; WONG, Y.S. & MACLACHAN, G. Pea Xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by Pea endo-1,4- β -glucanases. *Plant Physiol.*, 75, 605, 1984.
- 41 HOLDEN, M. & TRACEY, M.V. A study of enzymes that can break down Tabaco-Leaf components. II. Digestive juice of *Helix pomatia* on defined substrates. *Biochem. J.*, 47(1), 407, 1950.
- 42 HOLL, F.B. et al. *Tissue culture and plant science.* Academic Press, London, 1974.
- 43 HOUGH, L; JONES, J.K.N & WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved method for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on paper chromatogram. *J. Chem. Soc.*, 1702, 1950.
- 44 JOHNSON, K.G.; SILVA, C.; MACKENZIE, C.R., SCHNEIDER, H; FONTANA, J.D. Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Applied Biochem. Biotechnology*, 20, 245, 1988.
- 45 JUNICHI, M.; KATO, Y & MATSUDA, K. Purification and properties of an β -D-xylosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 98(3), 825, 1985.
- 46 KEILIN, J. Helicorubin an cytochrome h: purification an physical properties. *Biochem. J.*, 64, 663, 1956.

- 47 KEMMELMEIER, C. Contribuição a taxomia do fungo produtor de galactose oxidase. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1976.
- 48 KNAPP, D.R. Handbook of analytical derivatization reactions, p.572. Wiley, New York, 1979.
- 49 KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.*, 4, 17, 1962.
- 50 LOWRY, O.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951.
- 51 MACKENZIE, C.R. & BILOUS, D. Ferulic acid esterase activity from *Scizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5), 1170, 1988.
- 52 MASCARO, L.J. Jr. & KINDEL, P.K. Characterization of apiogalacturonans synthesized in a cell-free system from *Lemna minor*. *Arch. Biochem. Biophys*, 183, 139, 1977.
- 53 Mc.DONALD, J.E. The polyfructosans and difructose anhydrides. In: PIGMAN, W.W. and WOLFROM, M.L.J. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 2, 253, 1946.
- 54 MILLIBANK, J.W. & MACRAE, R.M. Degradation of yeast cell wall by fractionated snail gut enzymes. *Nature*, 201, 1347, 1964.
- 55 NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375, 1944.
- 56 NISHIMURA, M.; GRAHAM, D. & AKAZANA, T. Isolation of intact chroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.*, 58, 309, 1976.
- 57 O'DWYER, M.H. The Hemicelluloses. Part IV. The hemicelluloses of beech wood. *Biochem. J.*, 20, 656, 1926.
- 58 OKADA, H. & SHINMYO, A. Xylanase of *Bacillus pumulis*. *Meth. in Enzymology*, 160, 632, 1988.
- 59 PAN, Y.T. & KINDEL, P.K. Characterization of particulate D-apiosyl and D-xylosyltransferase from *Lemna minor*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 131, 1977.
- 60 REICHER, F.; CORREA, J.B.C. & GORIN, P.A.J. Location of O-acetil groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetil group migration. *Carbohydr. Res.*, 135, 129, 1984.
- 61 REUSSER, F.; GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. The production of fructose as a residue of sucrose fermentation by *Tricholoma nudum*. *Can. J. Microbiol.*, 6, 17, 1960.

- 62 SIERAKOWSKI, M.R. Aspectos estruturais de mecilagem de *Pereskia aculeata* Mill(Ora Pro Nobis). Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 1988.
- 63 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160, 61, 1945.
- 64 SOWDEN, J.C. II. Monosaccharides: occurrence, properties, synthesis. In: PIGMAN, W. (ed.) *The Carbohydrates*, p.95, 1957.
- 65 TAYLOR, I.E.P. & CAMERON, D.S. Preparation and quantitative analysis of fungal cell walls strategy tactics. *Ann. Rev. Microb.*, 27, 243, 1973.
- 66 TREVELYAM, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444, 1950.
- 67 VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbiol. Gen. Bull.*, 13, 42, 1956.
- 68 VONGERICHTEN, E. & MULLER, F. *Bert*, 39, 325, 1906 (citado) In: *Adv. Carbohydr. Chem.*, 4, 68, 1949.
- 69 WATSON, R.R. & ORENSTEIN, N.S. Chemistry and Biochemistry of apiose. *Adv. Carbohydr. Biochem.*, 31, 135, 1975.
- 70 WEIRICH, G.F. et al. Sulphated steroids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3, 109, 1986.
- 71 WENZEL, G.E. & CORREA, J.B.C. Hemicelluloses from the leaves of coffee-tree. I. Fractionation of the hemicellulose JAK and structural analysis of 4-O-methylglucuronoxylan. *An. Acad. Bras. Cient.*, 49(4), 605, 1977.
- 72 WILLIAMS, A.G. Screening of Hemicellulose degrading bacteria. *FEMS Microb. Letters*, 20, 253, 1983.
- 73 WOOD, P.J.; ERFLE, J.D. & TEATHER, R.M. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharides hydrolases. *Methods in Enzymol.*, 160, 59, 1988.
- 74 WOOD, T.M.; McCRAE, S.I. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2973-2982, 1982.