

SUNG LIE BRUEL

DETERMINAÇÃO DE L-RHAMNOSE PELA L-RHAMNOSE  
DESIDROGENASE DE PULLULARIA PULLULANS

Tese apresentada no Departamen  
to de Bioquímica da Universida  
de Federal do Paraná para ob  
tenção do Título de Mestre em  
Bioquímica.

Curitiba - Paraná - 1.978 .

## CONTEÚDO

AGRADECIMENTOS . . . . .	1
SUMÁRIO . . . . .	2
1. INTRODUÇÃO . . . . .	3
1.1. Biossíntese de L-rhamnose . . . . .	4
1.2. Degradação de L-rhamnose . . . . .	5
1.3. Determinação quantitativa de L-rhamnose . . . . .	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	9
2.1. Substâncias químicas . . . . .	9
2.2. Crescimento das células . . . . .	9
2.3. Extrato livre de células . . . . .	10
2.4. Atividade enzimática . . . . .	11
2.5. Curva padrão de L-rhamnose pela L-rhamnose desidrogenase de <u>Pullularia pullulans</u> . . . . .	12
2.6. Determinação da temperatura e tempos ótimos de reação . . . . .	13
2.7. Obtenção do hidrolisado de rutina . . . . .	16
2.8. Cromatografia do hidrolisado de rutina . . . . .	16
2.9. Especificidade da L-rhamnose desidrogenase . . . . .	17
2.10. Interferência de outros açúcares sobre a determinação quantitativa de L-rhamnose . . . . .	18
2.11. Efeito da solução de sulfato de sódio sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase . . . . .	18
2.12. Métodos analíticos . . . . .	20
2.13. Determinação de L-rhamnose de células de <u>S.schenckii</u> 1099-12 . . . . .	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	24
3.1. Obtenção da enzima . . . . .	24
3.2. Determinação de L-rhamnose no hidrolisado de rutina através do método enzimático da L-rhamnose desidrogenase . . . . .	25

3.3. Determinação de L-rhamnose no hidrolisado de rutina pelo método da cisteína-ácido sulfúrico. . . .	26
3.4. Determinação de D-glucose no hidrolisado de rutina através do método da glucose oxidase . . . . .	27
4. BIBLIOGRAFIA . . . . .	28

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. LUIZ ALBERTO VEIGA, Chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,  
pela orientação desta tese.

Ao Dr. LUIZ RAMÓN MARECHAL, Professor visitante da Universidade Federal do Paraná,  
pela dedicada assistência concedida.

Ao Dr. HAMILTON LACERDA SUPLICY, Chefe do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná,  
por permitir a conclusão do presente trabalho.

À FINEP (Contrato 380-TC),  
pelo apoio financeiro.

Aos colegas, professores e amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,  
pela amizade e estímulo.

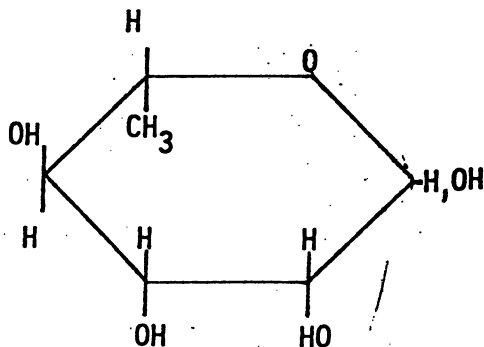
## SUMÁRIO

Descreve-se um novo método enzimático para a avaliação quantitativa de L-rhamnose, utilizando a L-rhamnose desidrogenase de Pullularia pullulans.

Este método mostrou ser altamente específico, não havendo interferência por parte dos vários açúcares testados, como a D-galactose, D-glucose, D-fucose, D-xilose, ácido glucurônico, D-arabinose, L-arabinose e D-manose, podendo ser utilizado na determinação de L-rhamnose, mesmo em mistura de açúcares.

## 1. INTRODUÇÃO

A L-rhamnose, L-manometilose ou 6 desoxi-L-manose é um açúcar largamente distribuído na natureza e apresenta a seguinte fórmula estrutural:



HIRST & JONES (10) verificaram que a L-rhamnose participa na composição dos polissacarídeos que constituem as pectinas vegetais.

JONES & SMITH (11) observaram a presença de L-rhamnose em mucilagens de sementes e em vegetais que contém gomas, substâncias obtidas como exudações produzidas espontaneamente ou após injúria da planta. As principais metilpentoses encontradas em gomas de plantas são a L-rhamnose e a L-fucose, ambas na forma piranosídica. A L-rhamnose é encontrada nas gomas de vegetais dos tipos Arabica e Cholla.

ELDERFIELD (9) encontrou a L-rhamnose juntamente com a D-glucose na estrutura de vários glucosídios utilizados no tratamento de cardíacos, como a ouabain, beta antiarin, convalla toxin e scillaren A.

SHAPOSHISKOVA et al (16), estudando a parede celular do Clostridium perfringens tipo A, de vários grupos sorológi

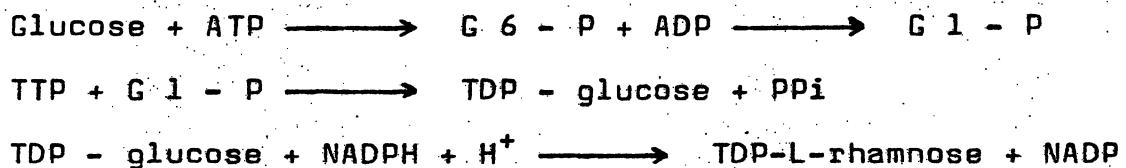
cos, obtiveram a parede celular altamente purificada, cuja composição em carboidratos foi investigada através de cromatografia. Observaram que determinadas cepas continham glucosamina, galactose e L-rhamnose, enquanto que outras não apresentavam L-rhamnose na sua parede celular. Estudos posteriores sugeriram que os carboidratos componentes da parede celular eram um dos fatores que determinam a especificidade antigênica das cepas estudadas (17).

BARKER et al (2) verificaram que o Diplococcus pneumoniae tipo II contém 47,8% de L-rhamnose na parede celular, juntamente com 34,7% de D-glucose e 16,2% de D-glucuronato de sódio. Estudos de metilação demonstraram que a L-rhamnose está ligada aos demais componentes através das posições 1 e 3.

A L-rhamnose ainda não foi detectada em tecidos animais superiores.

### 1.1 - Biossíntese de L-rhamnose

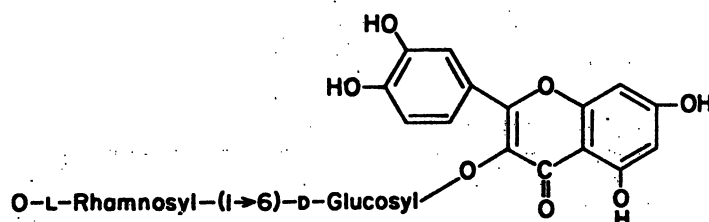
Em Streptococcus feacalis, experiências isotópicas demonstraram que a conversão da molécula de D-glucose a L-rhamnose segue diversas etapas: (14)



A primeira etapa é catalizada inicialmente por uma glucoquinase e depois por uma fosfoglucomutase. A etapa intermediária é catalizada por uma glucose pirofosforilase e a etapa final por uma série de enzimas que requerem o  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , sendo que

os detalhes do seu mecanismo ainda não foram totalmente elucidados.

BARBER & NEUFELD (1), estudando os nucleotídeos hexoses de Phaseolus aureus, concluíram que a TDP -L-rhamnose seria o doador de L-rhamnose a polissacarídeos ou outros glucosídios dos quais a L-rhamnose participasse como constituinte. A fração L-rhamnosil do TDP - L - rhamnose é transferida para 3 quercitina - D - glucosídio por uma preparação solúvel de enzimas de folhas de Phaseolus aureus, para formar a 3 - quercitina - O - L - rhamnosil - (1 → 6) - D - glucosídio ou rutina, que apresenta a seguinte estrutura:



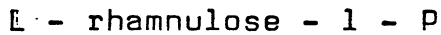
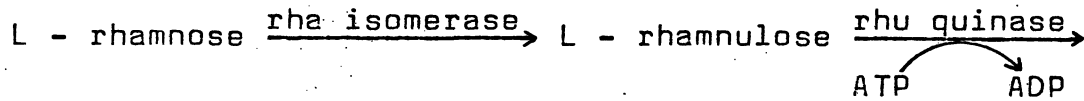
A rutina é um glucosídio cristalino amarelo, que foi obtida pela primeira vez das partes herbáceas da Ruta graveolens L. Ela é bastante difundida no reino vegetal, estando presente principalmente em folhas e flores (3).

## 1.2 - Degradação de L-rhamnose

Duas vias de degradação de L-rhamnose são conhecidas em microorganismos: uma fosforilada e outra oxidativa.

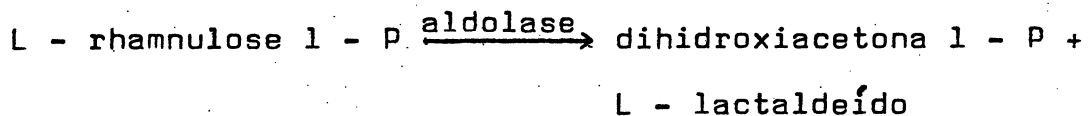
A fosforilada foi estudada primeiramente por Wilson et al (24) em extrato bruto de Escherichia coli, que demonstraram que a etapa inicial do metabolismo de L-rhamnose envolvia a

conversão da aldose correspondente à cetose, catalizada por uma enzima adaptativa, que só era produzida quando a E. coli crescia em presença de L-rhamnose. Posteriormente ocorria a fosforilação conforme esquema abaixo:

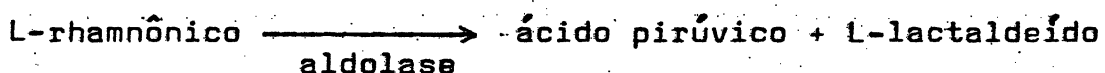
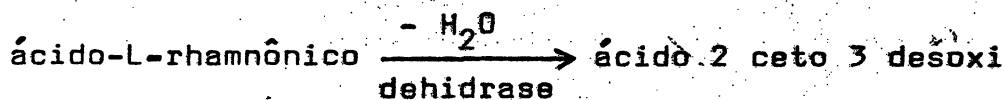
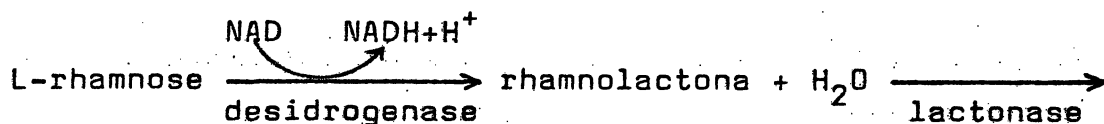


As enzimas responsáveis por esta via foram estudadas independentemente, em 1.964, por dois grupos de pesquisadores: Chiu e Feingold (5) nos Estados Unidos e Takagi e Sawada (21,22) no Japão.

Posteriormente, pela ação de uma aldolase, a L-rhamnulose 1 - P é cindida, produzindo duas trioses (25), conforme a reação:



A via oxidativa foi estudada 10 anos mais tarde por Rigo et al (15). Estes autores demonstraram que a Pullularia pullulans oxida a L-rhamnose por uma via semelhante àquela descrita por Weimberg e Doudoroff (7) para L-arabinose em P.sacharophila.



### 1.3 - Determinação quantitativa de L-rhamnose

Existem vários métodos químicos que permitem a determinação quantitativa de L-rhamnose, como o método da cisteína - ácido sulfúrico, elaborado por Dische e Shettles (6). Este método avalia as metilpentoses nas concentrações de 2 a 10  $\mu\text{g}$ . O máximo de desenvolvimento de cor ocorre 2 horas após a adição da cisteína e é determinada pela diferença das absorbâncias em 396 e 427 mm.

A L-rhamnose pode também ser avaliada pelo método de Somogyi (20) e Nelson (13) que apresenta porém pouca sensibilidade, devido a baixa capacidade redutora deste desoxi açúcar.

A L-rhamnose também pode ser determinada por métodos cromatográficos, tanto em papel quanto em camada delgada. Singh et al. (18) elaboraram um método que visa a separação por meio de cromatografia em camada delgada de rhamnose, quinovose, fucose e glucose. Cerca de 50 a 200 nmoles de cada um dos 4 açúcares podem ser separados com uma única aplicação. Após eluição, os açúcares são determinados colorimetricamente com fenol e ácido sulfúrico, segundo o método de Dubois et al (8).

Os métodos citados embora apresentem sensibilidade, têm o inconveniente de serem relativamente inespecíficos em presença de mistura de açúcares.

O presente trabalho tem por finalidade propor um método enzimático para determinação de L-rhamnose, em hidrolizados de polissacarídeos, utilizando a L-rhamnose desidrogenase extraída da Pullularia pullulans.

O método enzimático tem a vantagem de apresentar, além de grande sensibilidade, a capacidade de reagir especificamente com a L-rhamnose, mesmo em mistura de açúcares.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Substâncias químicas

NAD - nicotinamida - adenina - dinucleotídeo (Sigma Chemical Company).

EDTA - etileno diamino tetraacetato de sódio (Sigma Chemical Company).

Rutina	(Merck)
L - rhamnose	(Merck)
L - manose	(Merck)
D - manose	(Merck)
L - fucose	(Merck)
D - glucose	(Merck)
D - galactose	(Merck)
D - xilose	(Merck)
D - arabinose	(Merck)
L - arabinose	(Merck)
Ácido glicurônico	(Merck)
Cisteína	(Merck)
Extrato de leveduras	(Difco)
Ácido clorídrico	(Merck)
Ácido sulfúrico	(Merck)
Hidróxido de sódio	(Merck)
Tris-hidroximetilaminometano	(Merck)

As demais substâncias utilizadas neste trabalho foram adquiridas de fontes dignas de confiança.

### 2.2 - Crescimento das células:

As células de Pullularia pullulans foram cultivadas em meio líquido com a seguinte composição por litro:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,35 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14,5 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8,8 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,06 mg;  $\text{CaCl}_2$ , 3 mg; extrato de levedura, 1 g. O pH deste meio foi ajustado para 5,6 num potenciômetro Metron E 520.

A L-rhamnose foi autoclavada separadamente por 30 minutos sob vapor fluente e adicionado assepticamente ao meio, na concentração de 0,2 g%.

A manutenção do microorganismo foi feita no mesmo meio, solidificado para adição de 1,5 % de ágar.

No preparo do pré-inóculo, uma amostra dos micélios foi transferida para um frasco contendo 250 ml do meio líquido e incubada a 28°C por 24 horas com agitação, em agitador rotatório a 130 revoluções por minuto. Aliquotas de 30 ml foram retiradas e adicionadas a 500 ml do meio líquido contidos em frascos Erlenmeyer de capacidade para 2 litros. As células foram crescidas da maneira descrita acima, após o que foram coletadas por centrifugação a 3.000xg por 30 minutos à temperatura de 4°C, em centrífuga refrigerada International, Modelo-PR<sub>2</sub> e lavadas por duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após remoção do líquido de lavagem, as células foram estocadas no congelador a -15°C.

### 2.3 - Extrato livre de células

O extrato de células de P.pullulans foi obtido triturando-se em gral de porcelana gelado, cerca de 20 g de células

com 10 g de areia do mar previamente tratada. O macerado foi suspenso em 20 ml de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, contendo 5 mM de EDTA e 3 mM de mercaptoetanol.

A suspensão foi centrifugada a 17.000 xg durante 30 minutos e o sobrenadante coletado. O precipitado foi ressuspenso num pequeno volume do mesmo tampão e recentrifugado. Os sobrenadantes reunidos são denominados extrato livre de células, e apresentaram uma concentração de proteínas de cerca de 18 mg/ml.

Antes das experiências, o extrato livre de células era passado através de uma coluna de Sephadex G-25, previamente equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

#### 2.4 - Atividade enzimática

A atividade L-rhamnose desidrogenase contida no extrato livre de células foi medida seguindo a velocidade de redução do NAD em 340 nm, no espectrofotômetro Varian Techtron UV-VIS, modelo 635, à temperatura de 30°C.

##### a) Sistema de reação:

O sistema de reação continha uma concentração final de 10  $\mu$ moles de solução tampão Tris-HCl, pH 9 contendo EDTA  $10^{-3}$  M, 0,4  $\mu$ moles de NAD, 0,1  $\mu$ mol de L-rhamnose e 10 a 20 miliunidades de enzima.

##### b) Unidade de enzima:

Unidade de enzima foi definida como a quantidade de L-rhamnose desidrogenase necessária para reduzir 1  $\mu$ mol de NAD por minuto, nas condições de reação citada.

2.5 - Curva padrão de L-rhamnose pela L-rhamnose desidrogenase de Pullularia pullulans:

A curva padrão de L-rhamnose pelo método da L-rhamnose desidrogenase foi feita utilizando o açúcar em concentrações que variaram de 0.05 a 0.2  $\mu$ moles, conforme demonstra a figura 1.

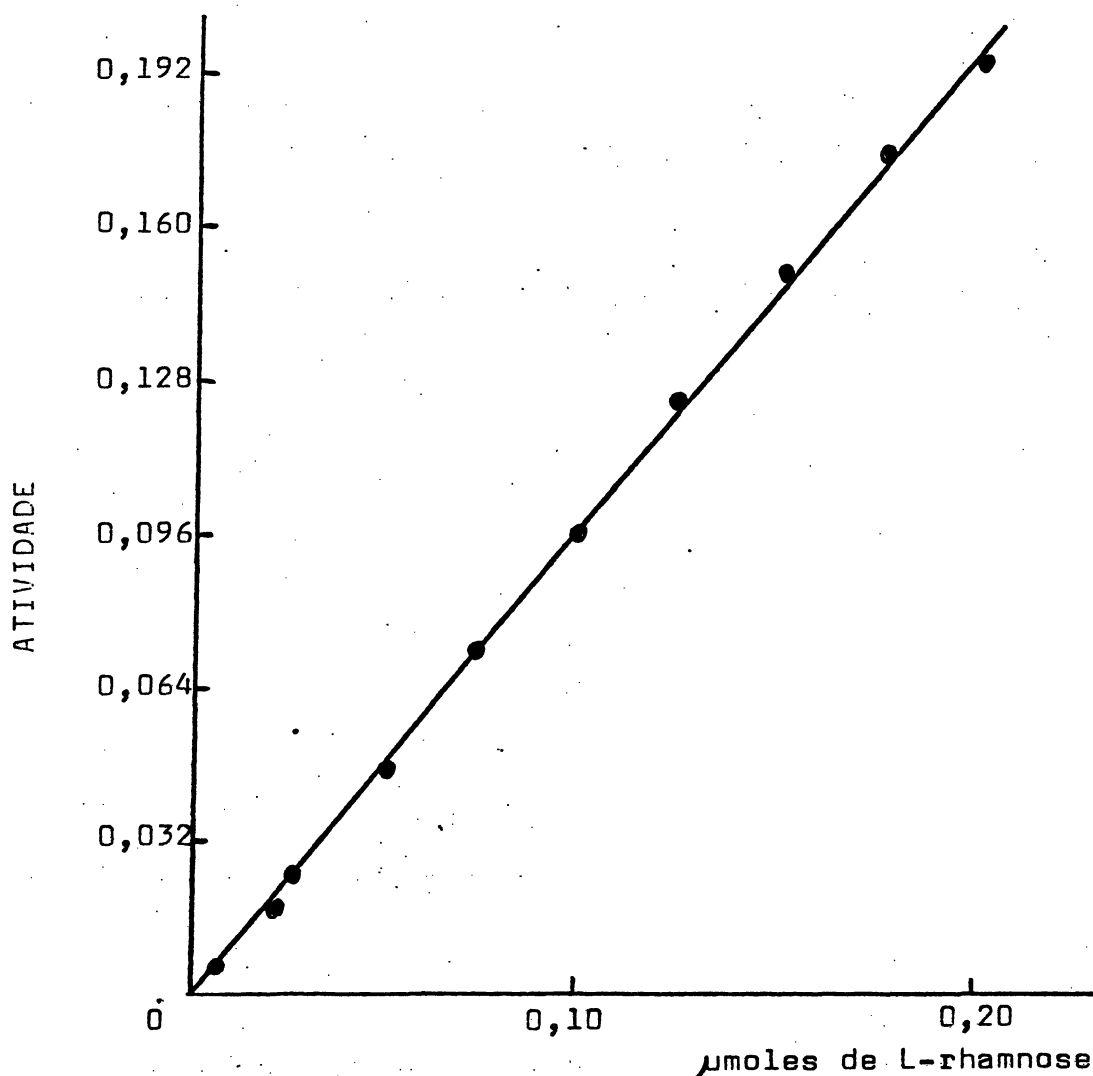


Figura 1 - Curva padrão de L-rhamnose pelo método de P.pullulans.

O sistema de reação continha 10  $\mu$ moles de tampão Tris-HCl pH 9,0 contendo EDTA  $10^{-3}$ M, 0,4  $\mu$ moles de NAD, enzima de 10 mil unidades e L-rhamnose em quantidades variáveis.

## 2.6 - Determinação da temperatura e tempos ótimos de reação

O sistema de reação 0,1 ml foi montado em tubos de hemólise contendo os seguintes reagentes: 10  $\mu$ moles da solução tampão Tris - HCl, pH 9 contendo EDTA  $10^{-3}$  M; 0,4  $\mu$ moles de NAD; 10 a 20 miliunidades de enzima; L-rhamnose nas concentrações de: a) 0,05; b) 0,075; c) 0,100 d) 0,125 e d) 0,150  $\mu$ moles.

Estes sistemas foram incubados por 10, 20 e 30 minutos, em temperaturas de 25° e 37°C. (Figuras 2 e 3).

Embora a temperatura e o tempo ótimos para incubação do sistema de reação sejam 37°C por 20 minutos, pode-se realizar a incubação por um período de 15 a 30 minutos, sem alteração significativa dos resultados obtidos.

Incubações por tempos superiores a 30 minutos demonstraram ser inadequadas para as determinações.

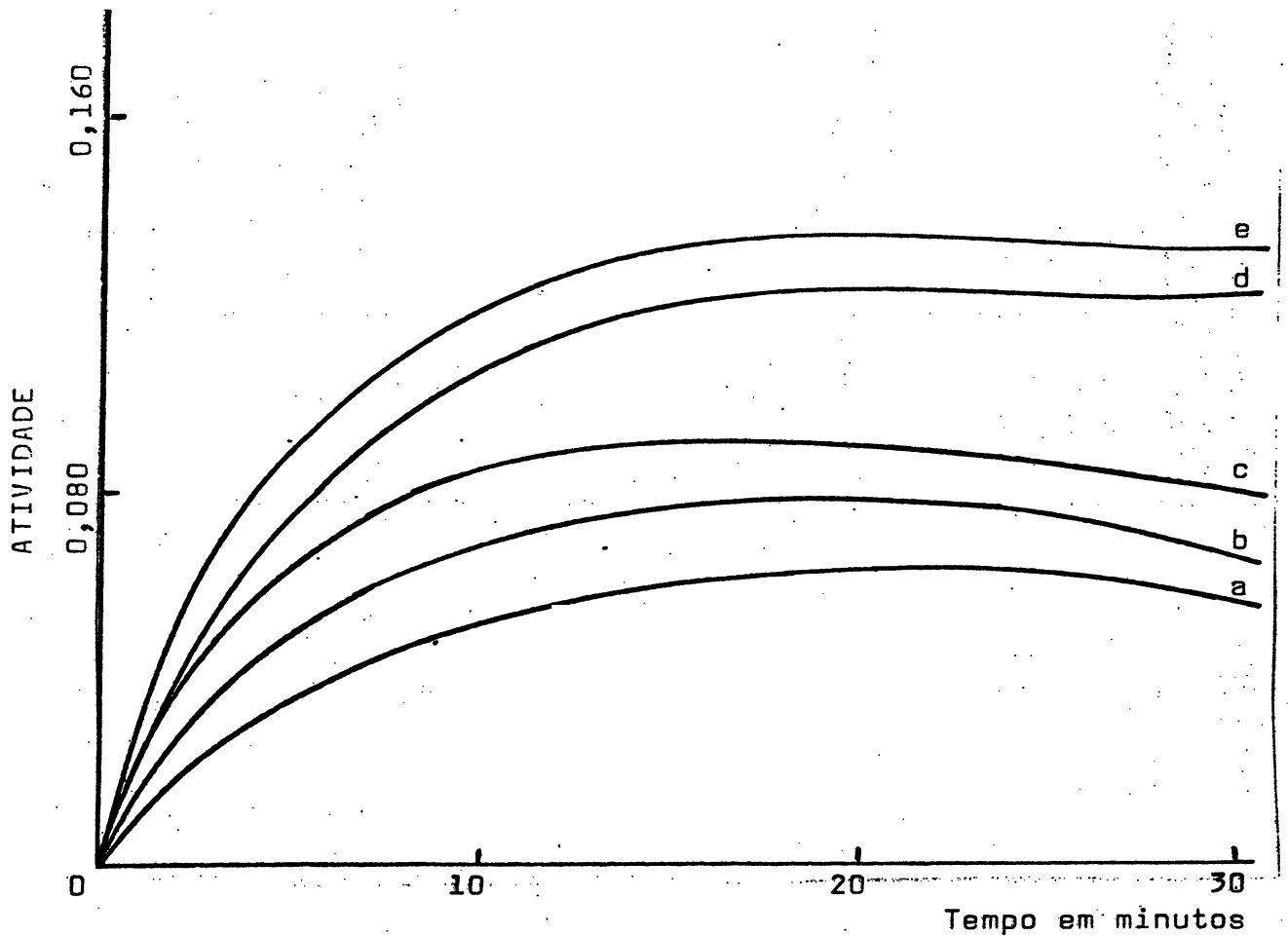


Figura 2 - Determinação da temperatura e tempo ótimos de reação da L-rhamnose desidrogenase incubando-se diferentes concentrações de L-rhamnose à temperatura de 25°C.

O sistema de reação continha 10  $\mu$ moles de tampão Tris-HCl pH 9,0 contendo EDTA 1 mM 0,4  $\mu$ moles de  $\text{NAD}^+$ , 10 a 20 miliunidades de L-rhamnose desidrogenase e L-rhamnose em concentrações variáveis.

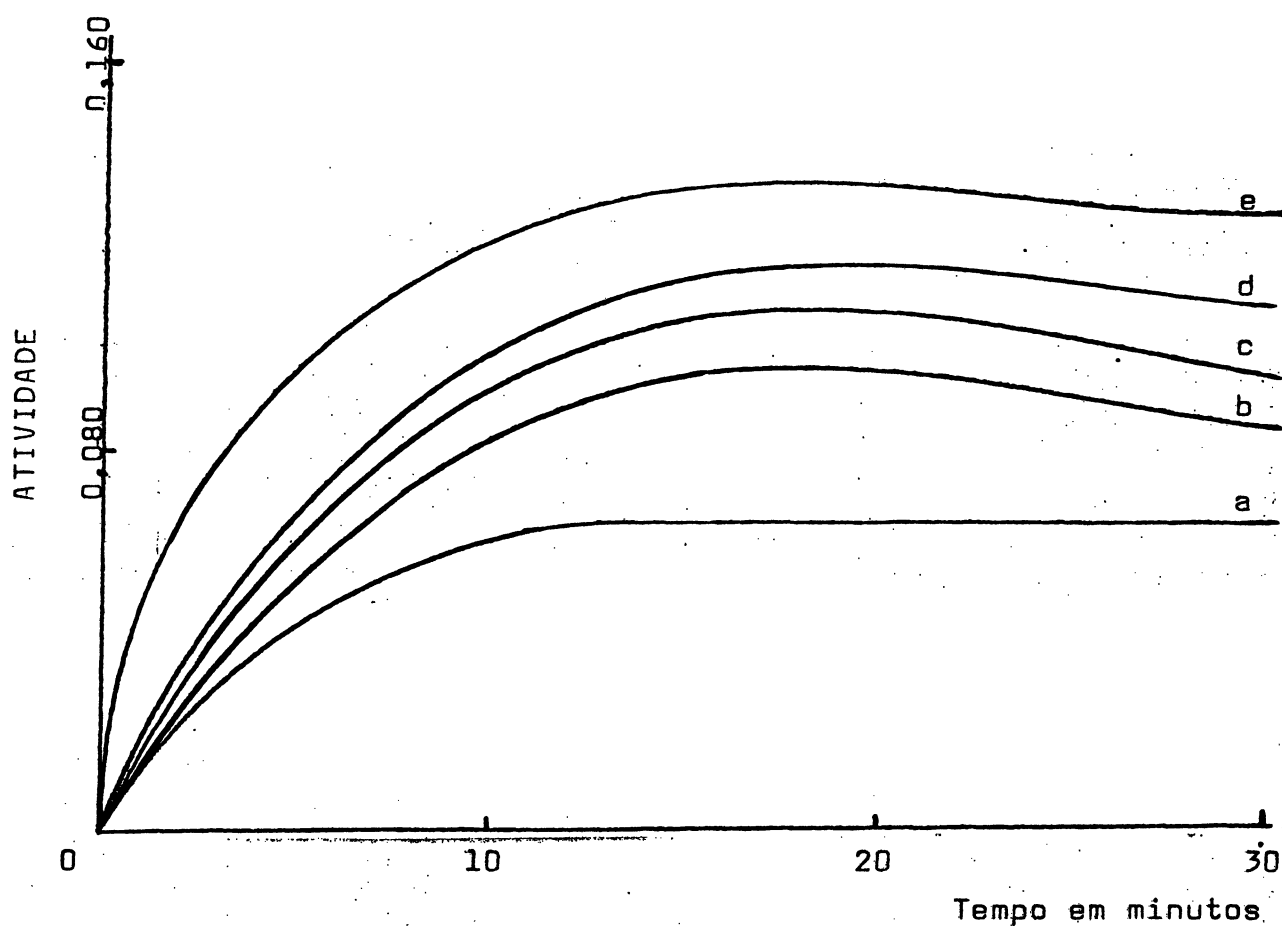


Figura 3 - Determinação da temperatura e tempo ótimos da L-rhamnose desidrogenase incubando-se diferentes concentrações de L-rhamnose à temperatura de 37°C.

A experiência foi efetuada usando o mesmo sistema de reação descrito na figura anterior.

## 2.7 - Obtenção do hidrolisado de rutina

Como um dos materiais escolhidos para a determinação da L-rhamnose, utilizou-se a rutina ou B - quercitina-O-L-rhamnosil (1 $\longrightarrow$ 6)- D-glucosídeo.

Quando submetida à hidrólise ácida, este glucosídeo se desdobra produzindo uma molécula de quercitina ou 3'4-4'5-tetrahidróxi flavanol ( $C_{15}H_8O_7$ ), uma molécula de L-rhamnose e uma molécula de D-glucose.

A obtenção do hidrolisado foi feita pesando-se 0,064 g de rutina mantida por 48 horas em dessecador a vácuo e fervendo-a com 6,4 ml de solução de ácido sulfúrico 4% por 4 horas, conforme técnica proposta por Charaux (4).

O material insolúvel, a quercitina, foi separada por filtração. O filtrado, contendo D-glucose e L-rhamnose, foi neutralizado com soluções de NaOH 0,1N e 1N e o seu volume foi completado para 10 ml com água destilada de modo a obter uma solução 0,01 M. (Com relação à rutina original). A L-rhamnose e D-glucose podem ser dosadas por métodos enzimáticos ou químicos.

## 2.8 - Cromatografia do hidrolisado de rutina

Com a finalidade de comprovar a ausência de contaminação no hidrolisado de rutina, foi elaborada uma cromatografia ascendente em papel Whatmann nº 4, frente a padrões de L-rhamnose e D-glucose. O solvente utilizado foi uma mistura de

benzol: n-butanol: piridina: H<sub>2</sub>O (1:5:3:3). O cromatograma foi visualizado com uma solução de nitrato de prata alcalino, segundo o método de Trevelyan (23).

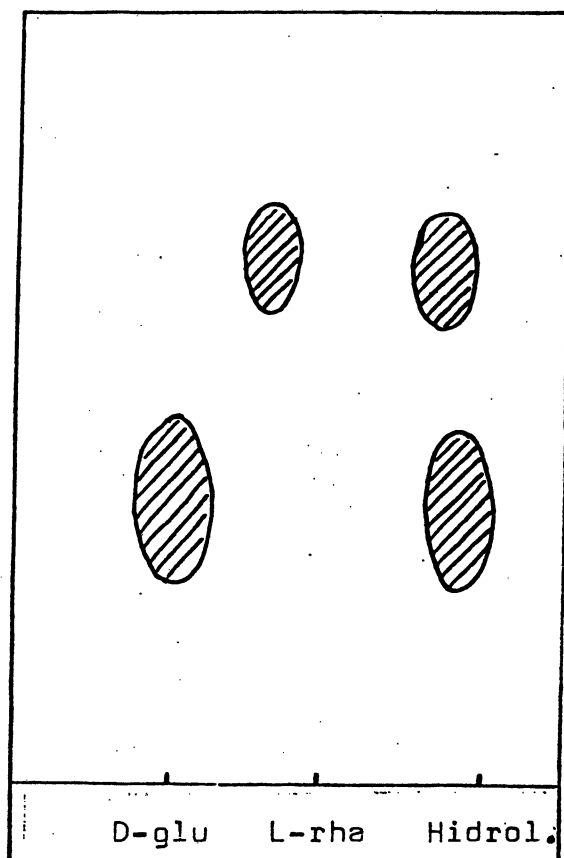


Figura 4 - Diagrama do cromatograma realizado com o hidrolizado de rutina, mostrando somente a presença de L-rhamnose e D-glucose.

## 2.9 - Especificidade da L-rhamnose desidrogenase

Com a finalidade de verificar se alguns dos açúcares mais comumente encontrados em extratos vegetais, como D-galactose, D-glucose, L-fucose, D-xilose, ácido glucorônico, D-arabinose, L-arabinose e D-manose poderiam servir como substrato da L-rhamnose desidrogenase, 0,1; 1,0 e 10  $\mu$ moles destes compostos substituíram L-rhamnose nos sistemas de incubação. Nenhuma atividade enzimática foi observada, demonstrando que a L-rhamnose desidrogenase é específica para a L-rhamnose.

## 2.10 - Interferência de outros açúcares sobre a determinação quantitativa de L-rhamnose

Incubando-se no mesmo sistema de reação 0,1  $\mu$ mol de L-rhamnose a 10  $\mu$ moles de cada um dos açúcares do ítem anterior foi estudada a interferência dos mesmos sobre a determinação quantitativa de L-rhamnose. Verificou-se que não houve interferência destes açúcares sobre a determinação quantitativa da L-rhamnose. A mistura de 5  $\mu$ moles de D-glucose, D-manose e D-xilose também não manifestou nenhum tipo de interferência na avaliação de L-rhamnose.

## 2.11 - Efeito da solução de sulfato de sódio sobre a atividade da L-rhamnose desidrogenase:

Os resultados do efeito estão mostrados na tabela 1 e demonstram que não houve interferência da solução de sulfato de sódio sobre a atividade enzimática.

Tubos	Tampão Tris-HCl pH 9 com EDTA $10^{-3}$ M $\mu$ moles	NAD $\mu$ moles	L-rha $\mu$ moles	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> $\mu$ moles	Enzima miliunidades	Conc. L-rha esperada $\mu$ moles	Conc. L-rha obtida $\mu$ moles
1	10	0,4	0,1	—	10	0,1	0,090
2	10	0,4	—	100	10	—	—
3	10	0,4	0,1	100	10	0,1	0,085

Tabela 1: Efeito do sulfato de sódio sobre a  
atividade enzimática

## 2,12 - Métodos analíticos

a) A determinação de proteínas do extrato livre de células foi realizada pelo método de Lowry et al (12), usando a albumina bovina como padrão, em concentrações que variaram de 20 a 100  $\mu\text{g}$ , conforme mostra a figura 5.

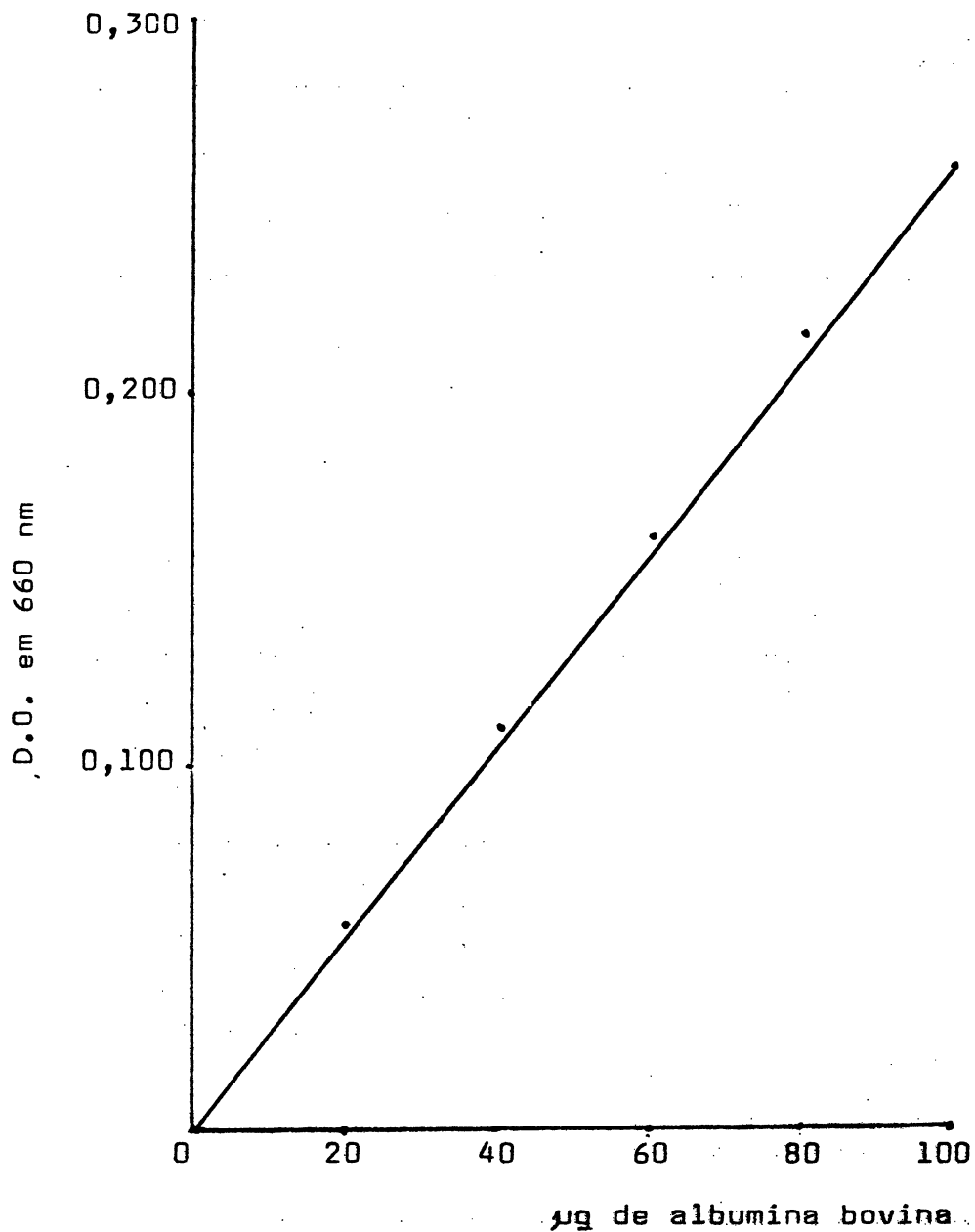


Figura 5. Curva padrão de albumina bovina elaborada de acordo com o método de Lowry et al.

b) Determinação de L-rhamnose no hidrolisado de rutina pelo método químico da cisteína-ácido sulfúrico. O método químico utilizado na avaliação da L-rhamnose foi o método da cisteína-ácido sulfúrico, proposto por Dische e Shettles (6). A curva padrão de L-rhamnose foi feita utilizando este açúcar em concentrações que variaram de 0.05 a 0.2  $\mu$ moles. conforme mostra a figura 6.

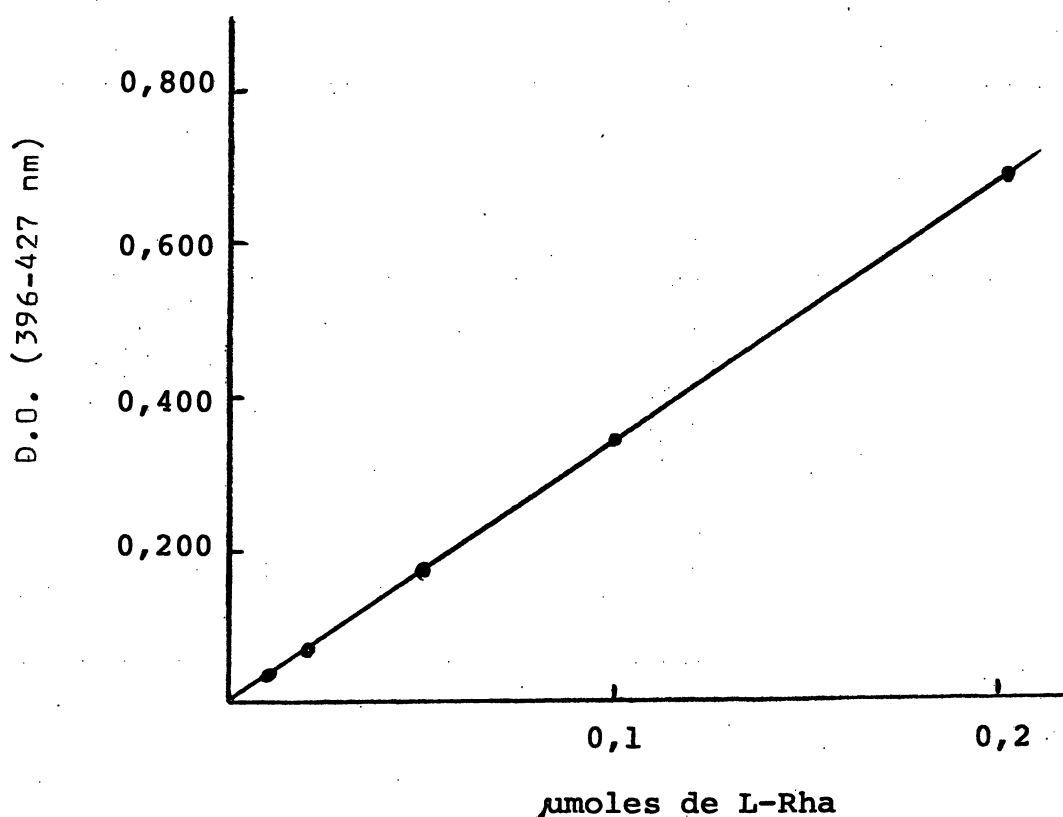


Figura 6 - Curva padrão de L-rhamnose, construída de acordo com o método de Dische & Shettles.

c) Determinação da D-glucose do hidrolisado de rutina pela glucose oxidase. Glucose oxidase-peroxidase foi preparada no momento do uso, pesando-se 12,5 mg de glucose oxidase; 5 mg de peroxidase e 5 mg de O-dianisidina dissolvida em 1 ml de etanol; 2,5 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e

água destilada em quantidade suficiente para 100 ml.

A determinação da D-glucose foi feita utilizando-se 0,01  $\mu$ mol de rutina cujo volume foi completado para 0,5 ml com água destilada e 1,5 ml do reativo enzimático, de acordo com a técnica descrita por Sols et al (19). Após uma hora de incubação a 30°C, determinou-se as D.O. em 420 nm.

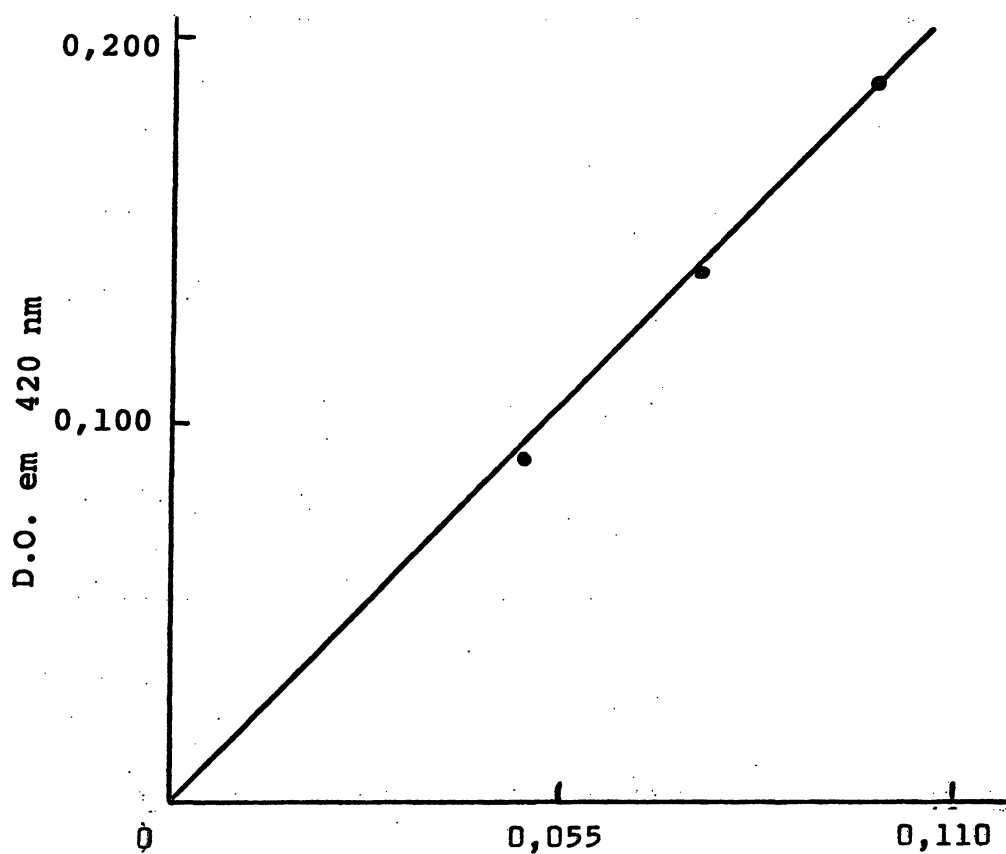


Figura 7 - Curva padrão de D-glucose, determinada pela glucose-oxidase.

2.13 - Determinação de L-rhamnose de células de S.schenckii -  
1099-12

A determinação quantitativa de L-rhamnose também foi realizada em uma rhamnomanana constituinte da parede celular de S.schenckii.

Esta amostra nos foi gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Rodolfo Travassos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

20  $\mu$ g de células previamente dessecadas foram hidrolizadas com 1 ml de  $H_2SO_4$  1 N em banho maria a  $100^\circ C$  durante 2 horas; Após neutralização do hidrolizado com 1 ml de NaOH 1 N, o material foi utilizado nas determinações de L-rhamnose através dos métodos da L-rhamnose desidrogenase e cisteína-ácido sulfúrico.

a) - Determinação de L-rhamnose de células de S.schenckii (1099 -12), pelo método da L-rhamnose desidrogenase:

A determinação foi realizada, adicionando-se ao sistema de incubação 10  $\mu$ moles de tampão Tris-HCl pH 9 com EDTA  $10^{-3}M$ , 0,4  $\mu$ moles de NAD, 10 miliunidades de enzima e 0,1 mg de células de S.schenckii.

b) - Determinação de L-rhamnose de células de S.schenckii (1099-12) pelo método da cisteína-ácido sulfúrico:

O sistema de reação continha: 0,01 mg de células de S.schenckii,  $H_2O$  em q.s.p. 1 ml, 4,5 ml de  $H_2SO_4$  (6V:1V) e 3 mg de cloridrato de cisteína.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Obtenção da enzima

O extrato livre de células de Pullularia pullulans, crescida em l-rhamnose foi submetido a diferentes tratamentos com a finalidade de obter uma fonte de enzima com graus de atividade e estabilidade mais convenientes ao método aqui proposto.

Verificou-se que a diálise durante a noite contra o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9 contendo EDTA  $10^{-3}$  M diminuía a atividade enzimática.

Também foi determinado que os extratos livres de célula resistiam bem à liofilização, processo que pode ser usado quando se pretende estocar a enzima por longos períodos de tempo.

O tratamento dos extratos com  $MnCl_2$  e sulfato de amônio não forneceram melhoria significativa na atividade específica da enzima.

Como consequência dos resultados obtidos, decidiu-se utilizar como fonte de l-rhamnose desidrogenase o extrato livre de células de Pullularia pullulans, sem qualquer tipo de tratamento.

Quando extraída com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 a enzima se mostrou mais estável do que com o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9 contendo EDTA  $10^{-3}$  M. Com o objetivo de proteger a enzima assim obtida, foi adicionado ao meio de extração 25% de glicerol e mercaptoetanol na concentração 3 mM. Experiências posteriores,

entretanto, demonstraram que os extratos livres de células não purificados, apresentavam uma álcool desidrogenase que utiliza o glicerol e o 2 mercaptoetanol como substratos, competindo com a l-rhamnose desidrogenase pelo NAD presente no sistema de reação.

Devido a interferência destes agentes, passou-se a equilibrar a coluna de Sephadex G-25 com uma solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

A obtenção do extrato livre de células também pode ser feita utilizando-se tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 com EDTA 5 mM. Embora a enzima apresente atividade inferior àquela obtida com a presença de mercaptoetanol e glicerol, ela é suficientemente ativa para a determinação de l-rhamnose e evita a etapa de passar o extrato livre de células através da coluna de Sephadex G-25, cuja finalidade era reter glicerol e mercaptoetanol presentes no extrato. A enzima contida no extrato livre de células obtida com este tampão é bastante estável, mantendo-se ativa por vários meses.

### 3.2 - Determinação de l-rhamnose no hidrolisado de rutina através do método enzimático da l-rhamnose desidrogenase.

Os resultados da determinação estão mostrados na tabela II.

TABELA II

Tubos	L-rhamnose esperada	L-rhamnose obtida
L-rhamnose	0,1 $\mu$ mol	0,096 $\mu$ mol
Hidrolisado	0,1 $\mu$ mol	0,093 $\mu$ mol
L-rhamnose + hidrolisado	0,2 $\mu$ mol	0,197 $\mu$ mol

O sistema de incubação continha 10  $\mu$ moles de tampão Tris-HCl pH 9, com EDTA  $10^{-3}$ M, 0,4  $\mu$ moles de NAD, 10 miliunidades de enzima, 0,1  $\mu$ mol de rutina, 0,1  $\mu$ mol de L-rha e 0,1  $\mu$ mol de L-rha + 0,1  $\mu$ mol de hidrolisado de rutina. A incubação foi de 20 minutos a 37°C.

### 3.3 - Determinação de L-rhamnose no hidrolisado de rutina pelo método da cisteína - ácido sulfúrico.

A determinação quantitativa da L-rhamnose do hidrolisado de rutina pelo método químico está mostrada na tabela III.

TABELA III

Tubos	$\mu$ mol de L-rha esperado	$\mu$ mol de L-rha obtido
1	0,02 $\mu$ moles	0,02 $\mu$ moles
2	0,05 $\mu$ moles	0,048 $\mu$ moles

O sistema de reação continha 0,02 e 0,05  $\mu$ moles de rutina, água destilada em q.s.p. 1 ml, 4,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6V : 1V) e 3 mg de cloridrato de cisteína.

Na determinação de L-rhamnose através do método de L-rhamnose desidrogenase de Pullularia pullulans obteve-se a concentração de 9,3  $\mu$ moles de L-rhamnose por ml de hidrolisado de rutina, enquanto que pelo método químico da cisteína-ácido sulfúrico foi obtida a concentração de 10  $\mu$ moles por ml. Comparativamente, os resultados obtidos foram bastante próximos, com a vantagem do método enzimático ser altamente específico, enquanto que o método químico também avalia os açúcares ramificados, anidros e outras metilpentoses que também reagem com a cisteína.

No método enzimático a determinação da absorbância

é feita num único comprimento de onda de 340 nm e o tempo de incubação é de 20 minutos à 37°C, enquanto no método químico é necessário a determinação das absorbâncias em dois comprimentos de onda: 396 e 427 nm, além do tempo de espera de 2 horas, após a adição da cisteína para que a reação de cor se desenvolva.

#### 3.4 - Determinação de D-glucose no hidrolisado de rutina através do método da glucose oxidase.

A determinação quantitativa da D-glucose pelo método da glucose oxidase-peroxidase forneceu resultado de 9,4  $\mu$ moles por ml de hidrolisado de rutina, estando de pleno acordo com o resultado obtido pelo método enzimático para a l-rhamnose.

Frente aos dados obtidos, conclui-se que realmente o método proposto parece ser sensível e eficiente para ser utilizado na determinação da l-rhamnose.

Através do método da L-rhamnose desidrogenase, obteve-se, em células de S.schenckii, 0,22 mg de L-rhamnose por mg de células, enquanto que pelo método da cisteína ácido-sulfúrico o valor obtido foi de 0,3 mg de L-rhamnose por mg de células.

## 4. BIBLIOGRAFIA

01. BARBER, G.A. & NEUFELD, E.F. Rhamnosil transfer from TDP-L-Rhamnose catalized by a plant enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., 6: 44-48, 1961
02. BARKER, S.A.; SOMERS, P.J.; STACEY, M. Arrangement of the L-rhamnose units in Diplococcus pneumoniae Type II Polysaccharide. Carbohydr. Res., 1: 106-115, 1966.
03. CHARAUX, M.C. Sur le dédoublement biochimique de la rutine. Rutinose, nouveau biose, provenant de ce dédoublement. Bull. Soc. Chim. Biol., 6: 631-640, 1924.
04. \_\_\_\_\_, Sur la présence de la rutine dans certain végétaux. Preparation et identification de ce glucoside et ses produits de dédoublement. Bull. Soc. Chim. Biol., 6: 641 - 647, 1924.
05. CHIU, T.H. & FEINGOLD, D.S. The purification and properties of L-rhamnulokinase. Biochim. Biophys. Acta, 92: 489-497, 1964.
06. DISCHE, Z. & SHETTLES, L.B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem., 175: 595-603, 1948.
07. DOUDOROFF, M.; DELEY, J.L.; PALLERONI, N.L.; WEIMBERG, R. New pathways in oxidation of D-galactose and D-arabinose. Fed. Prec., 15: 244-250, 1956.

08. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 160 : 61-68, 1945.
09. ELDERFIELD, R.C. The carbohydrate components of the cardiac glycosides. Adv. Carbohydr. Chem., 1 : 147-173, 1945
10. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. The chemistry of pectic materials. Adv. Carbohydr. Chem., 2 : 235-251, 1946.
11. JONES, J.K.N. & SMITH, F. Plants gums and mucilages. Adv. Carbohydr. Chem., 4 : 243-291, 1949.
12. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folinphenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.
13. NELSON, N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153 : 375-380, 1941.
14. PAZUR, J.H. & SHUEY, B.W. The enzymatic synthesis of thymidine diphosphate glucose and its conversion to thymidine diphosphate rhamnose. J. Biol. Chem., 236 : 1780-1785 , 1961.
15. RIGO, L.U.; SATO, M.; FEINGOLD, D.S.; VEIGA, L.A. Congresso Latino Americano de Microbiologia: 5ª Punta del Este, Uruguay, 1971.

16. SHAPOSHNIKOV, G.M.; SHIPITSYNA, G.K.; ISPOLATOVSKAYA, M.V.; BLOGOVESCHENSKI, U.S.A.; ZEMLYANISKAYA, E. P. Zh. Microbiol. Epidemiol. Imunobiol., 50 (2), 36-40, 1973. Inst. Epidemiol. and Microbiol., Acad. Med. Sci USSR, Moscow, USSR. A study of the cell wall of Clostridium perfringens Type A of various serological groups. In: Carbohy. Chem. Metab. Abst., 1 (6): 15, 1973.
17. \_\_\_\_\_, Microbiol. Epidemiol. Imunobiol., 50 (2) 40-44, 1973. Inst. Epidemiol. and Microbiol., Acad. Med. Sci USSR, Moscow, USSR. Extration and serological properties of Clostridium perfringens cell wall components. In: Carbohy. Chem. Metab. Abst., 1 (6): 16, 1973.
18. SINGH, H.S & STACEY, B.E. Analyst: 97 (1161), 977-980, 1972 (Dep. Appl. Biol. and Foods Sci, Polytech. South Banck, Borought Rd. London SE1 0AA, UK). Thin layer chromatographic separation and colorimetric determination of rhamnose, quinovose, fucose and glucose. In: Carbohydr. Metab. Abst., 1 (5): 101-110, 1973.
19. SOLS. A.; DE LA FUENTE, G. PALASI, C.V.; ASENSIO, C. Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexoquinase. Biochim. Biophys. Acta, 30: 92-101, 1958.
20. SOMOGY, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160: 61-68, 1945.
21. TAKAGI, Y. & SAWADA, H. The metabolism of L-rhamnose in Escherichia coli: I - L-rhamnose isomerase. Bioquim. Biophys. Acta, 92: 10-17, 1964.

22. \_\_\_\_\_, The metabolism of L-rhamnose in Escherichia coli : II- L-rhamnulose quinase. Biochim. Biophys. Acta, 92 : 18-25, 1964.
23. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by the use of dipping reagents. Nature, 166 : 444-445, 1950.
24. WILSON, D.M. & AJL, S.J. Metabolism of L-rhamnose by Escherichia coli I-L-Rhamnose isomerase. J. Bacteriol., 73 : 410-414, 1957.
25. \_\_\_\_\_, Metabolism of L-rhamnose by Escherichia coli II - Phos phorylation of L-rhamnulose. J. Bacteriol., 73 : 415-420.