UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLUCANASES
DIGESTIVAS DE *PERIPLANETA AMERICANA* (DICTYOPTERA)

FERNANDO ARIEL GENTA

ORIENTADORA: DRA. CLÉLIA FERREIRA

SÃO PAULO
2000

“Purificação e Caracterização de β -Glucanases Digestivas de *Periplaneta Americana* (Blattodea)”

FERNANDO ARIEL GENTA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA

IQ - USP

(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANA CLAUDIA RASERA DA SILVA

IQ - USP

Prof. Dr. OSVALDO MARINOTTI

ICB - USP

**SÃO PAULO
20 DE MARÇO DE 2000.**

Dedico este trabalho a meus pais, dona Nina e seu Werther, e a meus amigos, todos eles.

“ô Senhora rezadeira (rezadeira)
ô Rezadeira senhora (minha senhora)

Senhora rezadeira
Reze uma prece com fé
Pra que a raça brasileira
Esteja sempre de pé

Reze pra que o nosso povo
Viva sempre a liberdade
E construa um mundo novo
Cheio de felicidade

Reze pra que a lua mansa
Nunca deixe de brilhar
E na vida a esperança
Nunca venha nos faltar

Reze pra que a falsidade
Seja sempre superada
E o amor e a bondade
Andem sempre de mão dada

ô Senhora rezadeira (rezadeira)
ô Rezadeira senhora (minha senhora)...”

(Dedé da Portela – Dida)

Agradecimentos

Agradeço à professora Clélia Ferreira pela orientação, amizade e, sobretudo, exemplo. Principalmente por ter conseguido conviver com minha maneira de trabalhar. Haja paciência.

Ao professor Walter Terra pelo apoio, orientação e exemplo.

A meus colegas de trabalho, pelo companheirismo, respeito, profissionalismo e, sobretudo, paciência. Sem eles (e suas sugestões, broncas, apoio, discussões e ensinamentos) este trabalho não existiria. Considerem-se culpados.

Às pessoas de outras instituições que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, pela confiança e profissionalismo. Especialmente para pesquisadores de outros institutos, pelas separatas e cópias de trabalhos a mim enviadas.

Sem o auxílio técnico das senhoras Luiza Y. Nakabayashi e Maria Ivanilde Marcelino eu estaria, neste momento, preso por homicídio doloso. Ou dormindo, sabe-se lá onde, como e por quê. Elas também são inteiramente responsáveis pelo desenvolvimento deste trabalho.

O pessoal da portaria (seu Domingos, seu Juca, seu Antônio e João) foram uma fonte constante de apoio e de bons papos ao longo destes anos.

A minha família e meus amigos, pela paciência e carinho de sempre. Eles são, em última instância, uma boa razão para se estar de pé. E trabalhar.

Ao CNPq, PRONEX e FAPESP pelos auxílios concedidos ao laboratório e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. Especialmente à FAPESP por pagar em dia.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
1.Introdução	3
1.1.β-glucanas	3
1.1.1.Definição e estrutura	3
1.1.2.Características macromoleculares	11
1.1.3.Papel biológico e ocorrência	14
1.2.β-glucanases	15
1.2.1.Definição	15
1.2.2.Classificação por tipos de atividade	16
1.2.3.A classificação estrutural	24
1.2.4.Papel biológico	28
1.2.5. Particularidades de sistemas β-glucanásicos	29
1.3.O estudo da digestão em insetos	31
1.3.1.Objetivos da pesquisa em digestão em insetos..	31
1.3.2. O processo digestório.	32
1.3.3.O estudo de β-glucanases em insetos.	32
1.4.Objetivos deste trabalho	37
2.Material e Métodos	38
2.1.Animais	38
2.2. Preparação de frações solúveis.	39
2.3.Ensaio enzimáticos.	40
2.4. Quantificação de proteína nas amostras.	41
2.5. Determinação do ponto isoelétrico por focalização isoelétrica em cilindros de poliacrilamida.	42
2.6. Preparação de coquetel de inibidores de proteinases. Ensaio de estabilidade às proteinases presentes na fração solúvel.	43
2.7. Precipitação da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> com laminarina e solubilização com etanol.	43
2.8. Precipitação de beta-glucanases na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> com liquenana.	44
2.9. Cromatografia em coluna de liquenana da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	46

2.10. Cromatografia em coluna de α celulose da fração solúvel do tubo digestório de <i>P.americana</i> .	48
2.11. Cromatografia de troca iônica em coluna Econo HiQ (BioRad, USA) em sistema de baixa pressão (EconoSistem; BioRad, USA) da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	49
2.12. Eletroforese em cilindro de poliacrilamida da fração solúvel do tubo digestivo de <i>P. americana</i> .	49
2.13. Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Metil Sepharose (BioRad, USA) em sistema de baixa pressão (EconoSistem, BioRad, USA) da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	50
2.13.1 Cromatografia do sobrenadante	50
2.13.2 Cromatografia do material precipitado por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	50
2.14. Cromatografias de interação hidrofóbica em Metil Sepharose (BioRad) da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> sob diferentes condições	51
2.15. Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Pharmacia Biotech, Suécia) ligada a um sistema FPLC (Pharmacia Biotech, Suécia).	52
2.16. Cromatografia de interação hidrofóbica da fração solúvel de <i>P. americana</i> em coluna Metil Sepharose (BioRad) ligada a sistema de baixa pressão (EconoSistem) em presença de CaCl_2 e CMC.	52
2.17. Cromatografias de troca iônica em coluna MonoQ (FPLC, Pharmacia, Sweden) do Material 2.	53
2.18 Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia).	54
2.19. Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (FPLC, Pharmacia) do Material 2.	55
2.20. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (FPLC, Pharmacia) do material CEL e do Material 2.	55
2.21. Eletroforese em cilindros de gel de poliacrilamida na presença de SDS.	56
2.22. Cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12 (FPLC, Pharmacia) das frações CEL1 e CEL2 obtidas após eletroforese.	57
2.23. Trocas de tampão em coluna Hitrap Desalting (Pharmacia).	59
2.24. Concentração de diversos materiais por centrifugação em membranas AMICON.	59
2.25. Precipitação com etanol 80% (v/v) do filtrado obtido na concentração do Pool Metil 2.	60
2.26. Eletroforese em cilindros de poliacrilamida em condições nativas do ressuspendido final da precipitação com etanol do filtrado do Pool Metil 2.	60

2.27. Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e coloração com prata.	61
2.28. Estabilidade enzimática em diferentes valores de pH.	62
2.29. Determinação do pH ótimo de LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2.	63
2.30. Determinação de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i para a hidrólise de laminarina, liquenana e carboximetilcelulose pelas enzimas purificadas.	63
2.31. Determinação do grau de polimerização dos produtos de reação de CEL1 e CEL2 sobre liquenana.	65
2.32. Cromatografia dos produtos de hidrólise de laminarina, liquenana e carboximetilcelulose por LAM, LIQ1 e CEL2 em camada delgada de sílica.	65
2.33. Ensaio de CEL1 e CEL2 sobre celulose cristalina.	66
2.34. Ensaio de lise de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	66
3.RESULTADOS	67
3.1. Ensaio de atividades β -glucanásicas em diferentes insetos	67
3.2. Estabilidade das β -glucanases de <i>P. americana</i> às proteinases do material.	68
3.3. Ensaios enzimáticos no alimento (<i>Hordeum vulgare</i>) de <i>Periplaneta americana</i>	68
3.4. Ponto isoelétrico.	69
3.5. Purificação das β -glucanases de <i>P.americana</i> .	71
3.5.1.Tentativas iniciais de purificação das β -glucanases da fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	71
3.5.2. Purificação das liquenases e laminarinase presente na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	77
3.5.3.Purificação das celulasas presentes na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	89
3.5.4. Esquema geral da marcha de purificação e rendimentos.	97
3.6.Caracterização parcial das β -glucanases de <i>P. americana</i> purificadas.	98
4.Discussão	107
4.1. Considerações a respeito das propriedades da marcha de purificação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	108
4.2. Efeito do pH na atividade das β -glucanases d <i>P. americana</i> .	112
4.3. Tipos de especificidade e comportamento cinético das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	114
4.4. Padrão de ação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	116

4.5. Classificação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de <i>P. americana</i> .	119
4.6. Função dos sistemas β -glucanásicos de <i>P. americana</i> .	121
4.7. Origem das β -glucanases do inseto.	127
4.8. β -Glucanases de insetos.	128
Resumo / Abstract	135/136
Referências Bibliográficas	137
Curriculum vitae	149

ABREVIATURAS

AVICEL – microcelulose cristalina

BES – ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfônico

CBD – Cellulose Binding Domain

CMC – Carboxi Metil Celulose

DAN – diazo acetil norleucina

DNS – ácido dinitrosalicílico

E – enzima

E.C. – Enzyme Commission

EDTA – etileno diamino tetra acetato de sódio

EPPS – ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-3-propanosulfônico

ES – complexo enzima substrato

ES₂ – complexo entre enzima e duas moléculas de substrato

FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

K_{cat} – constante de catálise

K_i – Constante de dissociação entre a enzima e o substrato inibidor

K_m – Constante de Michaelis

MES – ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico

pHMB – para-hidróxi mercuribenzoato

pI – ponto Isoelétrico

PMSF – Fenil Metil Sulfonil Fluoreto

PVDF – Difluoreto de Polivinilideno

S - substrato

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TAPS – ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfônico

TEMED – N’N’N’N’-tetrametiletenodiamina

TGO – Tris-Glicose-Oxidase

TLCK - Nαtosil L-lisina clorometil cetona

TPCK - Nαtosil L-fenilalanina clorometil cetona

Tris – [Tris(hidroximetil)aminometano]

U – unidade de atividade enzimática

v - velocidade

V_{máx} – Velocidade máxima

1. INTRODUÇÃO

1.1. β -glucanas

1.1.1. Definição e estrutura.

Glucana é o nome genérico dado a uma molécula composta de inúmeros resíduos de glicose, ligados entre si através de ligações glicosídicas. Estas ligações podem ser do tipo α ou β (ver figura 1); como não são encontrados os dois tipos de ligação no mesmo polímero (em se tratando de glucanas, ou seja, homopolímeros¹ de glicose; Aspinall, 1982), podemos dividir as glucanas conhecidas em α -glucanas e β -glucanas.

Figura 1 – Estruturas dos anômeros α e β da glicose (forma piranosídica, 1 e 2), correspondentes 1-O-metil-glicosídeos (3 e 4), maltose (4-O- α -D-glicopiranosil-D-glicopiranoose, estrutura 5) e celobiose (4-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranoose, estrutura 6).

Ao considerar-se a cadeia de uma β -glucana, podem ser encontradas duas fontes básicas de variação intra e intermolecular: a natureza das hidroxilas envolvidas na formação da ligação glicosídica e o comprimento da molécula. No grupo consideramos

apenas moléculas muito longas (polissacarídeos), contendo de dezenas a milhares de resíduos de glicose na cadeia; mesmo assim, o comprimento da molécula em si não é o fator que mais afeta suas propriedades químicas ou físicas. Sem dúvida, a maior fonte de heterogeneidade no grupo, tanto estrutural como físico-química, é o tipo de substituição encontrado ao longo da cadeia – caráter que permite a distinção de subgrupos, dependendo do tipo de ligação encontrado. De uma forma geral cada molécula de glucana possui um tipo preponderante de ligação glicosídica – embora também sejam encontradas moléculas mistas, em alguns casos (Aspinall, 1982).

Em uma ligação glicosídica temos a condensação entre a hidroxila ligada ao carbono 1 de um monossacarídeo cíclico e uma hidroxila associada a outro átomo de carbono do resíduo seguinte da cadeia (Lehninger, 1990). Uma molécula de glicose possui, tanto na forma aberta como na forma fechada, cinco sítios passíveis de substituição – hidroxilas dos carbonos 2 a 6 na forma aberta, dos carbonos 1,2,3,4 e 6 na forma piranosídica e dos carbonos 1,2,3,5 e 6 na forma furanosídica (ver figura 2).

¹ Homopolímero: polímero com apenas um tipo de unidade constituinte. Heteropolímeros têm dois ou mais tipos de unidades constituintes.

Figura 2 – A molécula de glicose nas configurações aberta (3), α -piranosídica (1), β -piranosídica (2), α -furanosídica (4) e β -furanosídica (5). Hidroxilas passíveis de substituição em azul.

Claramente as ligações de natureza (1 $\rightarrow$ 1) são incompatíveis com o alongamento da cadeia, por não deixarem livre a hidroxila do carbono 1 do resíduo seguinte, ou substituído, em sua forma cíclica (ver figura 3). A ligação (1 $\rightarrow$ 5) é incompatível com o alongamento de uma cadeia de piranoses, pois esta forma fechada utiliza a hidroxila deste átomo de carbono na formação da ligação hemiacetal presente nesta forma cíclica da glicose (ver figura 2). Já a ligação (1-4), pela mesma razão, é incompatível com o alongamento de uma cadeia de furanoses (ver figura 2).

Figura 3 – Tipos de ligação β -glicosídica entre resíduos de glicopiranoses (1 a 5) e glicofuranoses (6 a 10). 1) 1-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranose. 2) 3-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranose. 3) 6-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranose. 4) 4-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranose. 5) 2-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranose. 6) 1-O- β -D-glicofuranosil-D-glicofuranose. 7) 3-O- β -D-glicofuranosil-D-glicofuranose. 8) 2-O- β -D-glicofuranosil-D-glicofuranose. 9) 5-O- β -D-glicofuranosil-D-glicofuranose. 10) 6-O- β -D-glicofuranosil-D-glicofuranose.

Nas glucanas conhecidas até hoje não foram detectados resíduos de glicose na forma furanosídica (Aspinall, 1982). Portanto, as ligações possíveis para um polissacarídeo deste grupo são as dos tipos (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6). Em se tratando de beta-glucanas, para cada tipo de ligação é conhecido um polímero linear homogêneo (ver figura 4). Seus nomes e ocorrência são listados na tabela 1.

Tabela 1 – Tipo de ligação, nome e ocorrência das quatro β -glucanas lineares (Aspinall, 1982).

Ligação ²	Nome	Ocorrência
$\beta(1\rightarrow2)$	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
$\beta(1\rightarrow3)$	Calose, Laminarina, Curdlan, Pachyman	Plantas superiores, algas pardas, bactérias, fungos e protozoários
$\beta(1\rightarrow4)$	Celulose	Plantas superiores, algas e bactérias
$\beta(1\rightarrow6)$	Pustulan	Fungos

Também são encontradas na natureza β -glucanas contendo mais de um tipo de ligação glicosídica na cadeia. Esta heterogeneidade pode ou não estar relacionada à formação de ramificações da cadeia glicosídica – aonde dois resíduos de glicose ligam-se a diferentes hidroxilas de outro resíduo. Em se tratando de um carboidrato linear, observa-se apenas uma alternância dos tipos de ligação na cadeia, a qual pode ou não ser regular. As beta-glucanas mistas mais comuns (ver figura 5) estão descritas na tabela 2.

² A letra grega no início da nomenclatura denota o tipo de ligação, relativo à conformação anomérica do carbono 1 (α ou β) de um dos resíduos de glicose envolvido na ligação; os números indicam os carbonos correspondentes aos grupos condensados na formação da ligação glicosídica, nos dois monossacarídeos participantes.

Figura 4 - Estrutura das beta-glucanas lineares

existentes na natureza. a) beta(1-3) glucana linear - laminarina

insolúvel ou pachyman. b) beta (1-4) glucana: celULOSE. c) beta(1-6) glucana: pustulan.

Figura 4 (cont.) - d) estrutura
da beta-(1-2)-glucana
de *Agrobacterium*
tumefaciens.

Figura 5 - Estrutura e trecho de molécula da beta(1-3)(1-4)glucana de *Cetraria islandica* (liquenana).

Figura 5 (cont.) - Estrutura parcial da beta (1-3)(1-6) glucana de *Saccharomyces cerevisiae*, proposta por Manners et al. (1973). a+b+c constituem cerca de 60 resíduos; os valores exatos de a, b e c não são conhecidos.

Tabela 2 – Descrição das β glucanas mistas mais abundantes na natureza (Aspinall, 1982).

Tipos de ligação	Nome	Ocorrência	Tipo de cadeia
$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$	Liquenana	Líquens e gramíneas	Linear, não regular
$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	-	Fungos	Ramificada, em diferentes graus

No caso da $\beta(1\rightarrow3);\beta(1\rightarrow6)$ glucana de fungos, todas as ligações $\beta(1\rightarrow6)$ estão envolvidas na formação de ramificações. Portanto, o grau de ramificação está intimamente associado à percentagem de ligações $\beta(1\rightarrow6)$ do polissacarídeo (Manners *et al.* 1973).

1.1.2.Características macromoleculares.

A determinação inequívoca da composição (e fórmula química mínima) da molécula de celulose³, no final da década de 30, trouxe à tona o que seria uma aparente contradição: como uma molécula com tantas hidroxilas livres, teoricamente passíveis de complexação com moléculas de água, poderia mostrar-se completamente insolúvel? Desde cedo tornou-se claro que a insolubilidade de um polissacarídeo linear não estava relacionada a alguma propriedade intrínseca da molécula de uma forma direta, mas sim a interações entre moléculas de uma mesma população, ou mesmo de populações distintas. Duas cadeias de um polissacarídeo linear regular, ao se emparelharem, fazem inúmeras pontes de hidrogênio entre si; a queda na entalpia relativa a este conjunto de interações, na população de moléculas como um todo, suplanta qualquer aumento na entropia ou diminuição da entalpia relativa à inserção das cadeias no retículo de

moléculas de água da fase líquida. De fato, a determinação da estrutura cristalina das celulosas I e II evidenciou que a hidroxila do carbono 3 está envolvida em uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do anel da piranose seguinte da cadeia, e que as hidroxilas dos carbonos 2 e 6, as duas na posição equatorial, estão envolvidas na formação de ligações de hidrogênio com as cadeias de celulose adjacentes (Fan et al., 1987)(ver figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica da cela unitária no retículo cristalino da celulose I. Em pontilhado, as ligações de hidrogênio entre a hidroxila do carbono 3 e o oxigênio do anel piranosídico do resíduo adjacente da mesma cadeia, como também as ligações de hidrogênio entre a hidroxila do carbono 2 e a hidroxila do carbono 6 de um resíduo de uma cadeia adjacente, antiparalela. A)Visão das cadeias em diagonal; B)Visão axial.

A presença de ramificações e irregularidades ao longo da cadeia polissacarídica leva à desestruturação deste emparelhamento – de onde se observa que polissacarídeos ramificados ou cuja cadeia principal é bastante irregular são em diferentes graus solúveis em água. $\beta(1\rightarrow3); \beta(1\rightarrow6)$ glucanas altamente ramificadas são completamente solúveis em água, podendo formar soluções altamente concentradas (da ordem de 25% (p/v) ou mais); carboidratos do mesmo grupo, mas com menor grau de ramificação são

³ É importante ressaltar que, em se tratando de polissacarídeos, o termo molécula é associado a uma população relativamente homogênea, quanto a tipos de ligação entre resíduos e tamanho de molécula, mas nunca do modo estrito em que este termo é normalmente utilizado.

completamente insolúveis⁴ (Nelson and Lewis, 1974). A liquenana ($\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow4)$ glucana) é parcialmente solúvel, formando agregados e géis a partir de uma concentração da ordem de 2% (p/v) - este valor, como poder-se-ia esperar, depende do grau de regularidade da cadeia. Cadeias menos regulares levam a polissacarídeos mais solúveis (Perlin and Suzuki, 1950). Propriedades gelificantes de polissacarídeos seguem a mesma tendência, pois da mesma forma derivam da interação entre cadeias – quanto mais linear, ou mais regular é a sua cadeia principal, maior será a tendência de formação de uma fase gel. É o que se observa em liquenanas de diversas fontes⁵ (Aspinall, 1982).

Contudo, em alguns casos a insolubilidade em água não deriva apenas de um emparelhamento linear simples das cadeias polissacarídicas entre si. Em termos de macroestrutura cristalina da molécula, são conhecidos quatro grandes grupos estruturais dentre os polissacarídeos mais comuns: conformação em tira (cadeias $\beta(1\rightarrow4)$), conformação em hélice vazia (cadeias $\beta(1\rightarrow3)$), conformação em rugas (cadeias $\beta(1\rightarrow2)$) e fracamente compactado (cadeias $\beta(1\rightarrow6)$) (ver figura 7). Pode-se prever um emparelhamento entre as hidroxilas expostas de uma hélice e algumas hidroxilas de uma cadeia estendida em tira, como também entre as hidroxilas de cadeias fracamente organizadas (rugadas e não compactadas) ou mesmo entre as hidroxilas expostas de diferentes hélices. São conhecidas desde interações entre os diferentes tipos de glucanas (por exemplo, celulose e pachyman) até a formação de hélices duplas e triplas por cadeias do mesmo polímero (p.ex., pachyman; Mishima et al., 1998; Ding et al., 1998). A presença de ramificações e irregularidades leva à disrupção de qualquer um destes retículos cristalinos, diminuindo a possibilidade de emparelhamento (Rees, 1977).

⁴ A $\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow6)$ glucana de *Laminaria digitata* encontra-se no primeiro caso, sendo altamente solúvel. Como exemplo de glucana insolúvel deste grupo, temos a do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. *Laminaria cloustoni* apresenta duas $\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow6)$ glucanas, uma solúvel e a outra insolúvel.

⁵ Por exemplo, temos as $\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow4)$ glucanas de *Hordeum vulgare* e de *Cetraria islandica*. A primeira possui uma cadeia mais regular do que a segunda, sendo menos solúvel e formando géis em concentrações menores.

Figura 7 – Representações de estados conformacionais energeticamente favoráveis em glucanas. (a) β (1-2) glucana (conformação em ruga) ; (b) β (1-3) glucana (conformação em hélice); (c) β (1-4) glucana (conformação em tira). (d) representação da ligação β (1-6) glicosídica, mostrando o espaçamento de dois átomos e os três pontos de rotação entre resíduos de glicose adjacentes, levando à fraca compactação e organização das cadeias.

1.1.3. Papel biológico e ocorrência.

São conhecidas basicamente duas funções biológicas para β -glucanas:

1) formação de estruturas anatômicas rígidas, com uma função específica ou simplesmente protetora; 2) utilização como carboidrato de reserva. No primeiro grupo encontramos a β (1→2) glucana de *Agrobacterium tumefaciens* (capa da bactéria), as β (1→3) (Pachyman) e β (1→3); β (1→6) glucanas constituintes da parede de fungos (*Poria cocos* e *Saccharomyces cerevisiae*), a β (1→4) glucana (Celulose) presente na parede celular de células vegetais em geral, a β (1→6) glucana (Pustulan) da parede de alguns fungos (*Schizophyllum commune* e *Umbilicaris pustulata*), a β (1→3) glucana

(Calose) formadora das paredes dos poros do Floema de plantas superiores e presente em outras células vegetais (célula mãe do grão de pólen e tubo polínico, por exemplo) e a $\beta(1\rightarrow3);\beta(1\rightarrow4)$ glucana presente nas paredes de células de cereais⁶ (tecidos não-endospermicos, *Hordeum vulgare*), alguns fungos (*Pleurotus ostreatus*) e líquens (*Cetraria islandica*). No segundo grupo encontramos apenas a $\beta(1\rightarrow3)$ glucana característica das Euglenophyta (Paramylon, *Euglena gracilis*), estocada na forma cristalina em grânulos intracelulares e as $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow3);\beta(1\rightarrow6)$ glucanas de algas pardas, estocadas na forma de matéria amorfa associada ao conteúdo da parede celular (*Laminaria digitata* e *Laminaria cloustoni*). Evidentemente, características como insolubilidade e agregação das cadeias polissacarídicas entre si são determinantes na utilização de cada um destes materiais para o cumprimento de seu papel biológico específico (Aspinall, 1982; Lehninger, 1990; Bull and Chesters, 1966; Farkaš, 1979).

1.2. β -glucanases

1.2.1. Definição

β -Glucanases são proteínas (enzimas) que catalizam a hidrólise de ligações glicosídicas em β -glucanas. Embora possam, em alguns casos, possuir uma pequena atividade hidrolítica sobre ligações glicosídicas de substratos de pequena massa molecular (glicosídeos), a catálise se dá preferencialmente sobre substratos de cadeia longa (polissacarídeos). Enzimas cuja atividade preponderante se dá sobre glicosídeos são chamadas de β -glicosidases. β -glucanases em geral também não possuem atividade sobre ligações glicosídicas em moléculas aonde carboidratos compõem apenas uma parte da molécula (glicoproteínas e glicolipídeos, por exemplo) (Schomburg and Salzmänn, 1991).

⁶ A presença deste tipo de $\beta(1\rightarrow3);\beta(1\rightarrow4)$ glucana em paredes celulares do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* já foi demonstrada, mas trata-se de um caso isolado.

De uma forma geral, observa-se uma diminuição na constante de Michaelis e uma elevação da constante de velocidade relativa à quebra da ligação glicosídica conforme o aumento no tamanho da cadeia do substrato (Hiromi, 1972; Hiromi et *al.*, 1973). Os dois fatos são indicativos da existência de um número de subsítios de ligação a resíduos de glicose maior do que dois. Estas enzimas também apresentam, em seu conjunto, um pH ótimo ligeiramente ácido, variando em torno de 4,5 a 6,5 (Schomburg and Salzmann, 1991).

1.2.2. Classificação por tipos de atividade

As β -glucanases conhecidas podem ser divididas em grupos de acordo com diferenças em sua atividade catalítica ou em sua estrutura. Os principais critérios envolvidos na descrição de singularidades quanto a sua atividade catalítica são quatro:

1) Especificidade: β -glucanases em geral são seletivas em relação ao polissacarídeo ou mesmo ao tipo de ligação reconhecido e clivado. Assim, encontram-se enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas apenas em se tratando de $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$, ou $\beta(1\rightarrow6)$ -glucanas. Em outros casos, a enzima reconhece o mesmo tipo de ligação tanto em glucanas lineares como em glucanas mistas: é o caso de enzimas que clivam a ligação $\beta(1\rightarrow3)$ em laminarina e liquenana, das enzimas que clivam a ligação $\beta(1\rightarrow4)$ em liquenana e celulose, ou das enzimas que clivam a ligação $\beta(1\rightarrow6)$ em pustulan e em laminarinas ramificadas. São encontradas enzimas que reconhecem e clivam uma ligação aonde o resíduo no qual o carbono 1 está envolvido na ligação é substituído na posição 3. Também são encontradas enzimas que reconhecem apenas um tipo misto de glucana, sem reconhecer as β -glucanas lineares correspondentes⁷(McCleary, 1988). Até o momento não foi descrito nenhum caso aonde a enzima apresente uma especificidade que inclua o reconhecimento ou clivagem de

mais de um tipo de ligação – por exemplo, clivagem de laminarina ($\beta(1-3)$) e celulose ($\beta(1-4)$) (Schomburg and Salzmann, 1991).

2) Padrão de ação: divide-se o grupo das β -glucanases em exo e endo- β -glucanases. De uma forma geral, as primeiras ligam-se à ponta do polímero, e as últimas a porções internas da cadeia⁸. Uma quebra simples, devido à ação das exo-glucanases, levaria à liberação de um produto de baixo grau de polimerização – em grande parte dos casos, glicose – e a uma pequena diminuição no grau de polimerização do substrato (ver figura 8). Endoglucanases, ao contrário, através de uma quebra simples não produzem produtos de baixo grau de polimerização, levando, contudo, à uma queda rápida no grau de polimerização do substrato (ver figura 8). O critério clássico para distinção entre endo e exo-glucanases é a influência da atividade enzimática na viscosidade de uma solução do polímero, ou do substrato modificado, no caso deste ser insolúvel (por exemplo, uso de uma solução concentrada de carboximetilcelulose ou de carboximetilpachyman). Uma endo glucanase reduz rapidamente a viscosidade da solução do substrato, enquanto uma exoglucanase tem pouca ou nenhuma influência sobre este parâmetro, nas mesmas condições de ensaio (mesma quantidade formada de poder redutor, ou pontas na cadeia) (Barras and Stone, 1969a and 1969b; Nanjo et al., 1984; Jeffries and MacMillan, 1981).

3) Processividade – apesar da nítida diferença entre os conceitos de exo e endo-glucanase, existem enzimas que, a priori, não se encaixam bem neste sistema de classificação. Entre elas estão enzimas capazes de diminuir rapidamente a viscosidade de uma solução do substrato, mas liberando produtos de baixo grau de polimerização como glicose ou dímeros no meio de reação, e enzimas responsáveis pela formação de

⁷ O exemplo mais conhecido são as liquenases, enzimas capazes de clivar $\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow4)$ glucanas mas que não hidrolisam ligações de $\beta(1\rightarrow3)$ ou de $\beta(1\rightarrow4)$ glucanas simples.

⁸ Há quem interprete a ligação de endo-glucanases como sendo randômica: a preferência por resíduos internos se daria em função da maior proporção destes na composição da molécula do substrato.

produtos com um grau de polimerização médio (3 a 7) a partir do polissacarídeo. Interpreta-se o primeiro caso imaginando-se uma enzima que, após ligar-se a uma porção central da cadeia de glicoses, é capaz de realizar a quebra seqüencial de inúmeras ligações glicosídicas, em uma seqüência definida (ver figura 8j a 8m). O segundo caso é típico de uma enzima que, mesmo em se tratando de uma exo-hidrolase, produz uma pequena ou moderada alteração na viscosidade da solução do substrato, pois altera substancialmente o seu grau de polimerização médio (ver figura 8c e 8d)(Schomburg and Salzmann, 1991; Bochkov *et al.*, 1972; Nelson, 1975).

Estas exceções resultaram, ao longo do tempo, na criação do conceito de processividade em uma reação de despolimerização: a capacidade de uma enzima de clivar inúmeras ligações do polímero durante o encontro com uma mesma molécula do substrato (também conhecida como ataque múltiplo). Podem-se encontrar, assim, enzimas sem processividade, clivando apenas uma ligação da cadeia durante o encontro com a molécula do substrato – o que resulta na divisão simples inicial entre exo e endohidrolases – e enzimas capazes de realizar dezenas de quebras ao longo da cadeia da molécula de substrato originalmente a ela ligada (ver figura 8). A uma enzima sem processividade associou-se o termo mecanismo multi-cadeia, aonde a produção de poder redutor envolve a ligação sucessiva da enzima a várias moléculas do substrato (ver figura 9), enquanto que a uma enzima com alto grau de processividade associou-se o termo mecanismo de cadeia única, aonde a produção de poder redutor

Figura 8 - Representação gráfica do ataque de glucanases com diferentes padrões de ação e graus de processividade sobre um polímero linear. O conjunto de setas representa as ligações clivadas após a formação de um complexo enzima-substrato. A seta em azul representa a primeira reação de hidrólise da enzima sobre o polímero. a-d) exoglucanases sem processividade, mas com diferentes padrões de ação; e) endo-glucanase sem processividade. f-i) exoglucanases processivas com os padrões de ação a-d; j-m) endoglucanases com processividade mas com diferentes padrões de ação.

se dá pela clivagem quase completa ou total das ligações glicosídicas de uma só molécula (ver figura 9; Bochkov et *al.*, 1972; Nelson, 1975).

Figura 9 – Representação gráfica da produção de dez moléculas de glicose por uma exoglucanase com (a) mecanismo multi-cadeia; (b) mecanismo de cadeia única.

4)Mecanismo: distinguem-se dois tipos de glucanase quanto a sua capacidade de inverter ou manter a estereoespecificidade do carbono número 1 do resíduo de glicose envolvido na ligação glicosídica hidrolisada . Para uma β -glucanase, portanto, enzimas inversoras produzem, a partir do substrato, um resíduo de α -glicose (isolado ou na nova ponta redutora da cadeia), enquanto enzimas retentoras mantêm a configuração β original (ver figura 10).

Esta simples diferença na configuração do produto reflete, contudo, diferenças profundas na geometria do sítio ativo e no tipo de reação ocorrida durante a catálise (ver figura 10). Os dois tipos de enzima se utilizam de um mecanismo de catálise ácida geral, aonde atuam um grupo doador de prótons e um nucleófilo – e nos dois tipos de enzima o grupo doador de prótons encontra-se mais ou menos à distância de uma ligação de hidrogênio do oxigênio da ligação glicosídica. Contudo, nas enzimas retentoras, o grupo nucleófilo encontra-se na vizinhança próxima do carbono

anomérico, enquanto que nas enzimas inversoras há espaço para o posicionamento de uma molécula de água entre o nucleófilo e o carbono anomérico (ver figura 10). Assim sendo, em enzimas retentoras a distância entre os dois grupos catalíticos é de cerca de 5,5 Å, e nas enzimas inversoras esta distância é da ordem de 10 Å. No primeiro grupo de enzimas, o carbono anomérico é atacado pelo próprio grupo nucleófilo da enzima, enquanto que no segundo grupo este carbono é atacado pelo átomo de oxigênio (devidamente polarizado pelo nucleófilo da enzima) da molécula de água que se posiciona no interior do sítio ativo (ver figura 10) (Davies and Henrissat, 1995).

Figura 10 – Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica em enzimas a) retentoras e b) inversoras da configuração do carbono anomérico, propostos por Koshland (1953) e revisados por Davies e Henrissat (1995).

A definição e estudo dos parâmetros acima em diferentes enzimas (especificidade, padrão de ação, processividade, mecanismo de catálise) resultou, ao longo dos anos, em uma tentativa de racionalização e entendimento da diversidade do grupo das β -glucanases, com o estabelecimento de diferentes classes enzimáticas (E.C.s). Até o presente momento são definidas, no grupo das β -glucanases, as 9 classes

enzimáticas a seguir (International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Nomenclature Comitee, 1992):

E.C. 3.2.1.4. Celullase - Hidrólise interna de ligações glicosídicas β (1-4) em celulose, liquenana e β -glucanas cereais.

E.C. 3.2.1.6. Endo (1-3(4)) β -D-Glucanase – Hidrólise interna de ligações (1-3) ou (1-4) em β -glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é ligado à unidade glicosídica anterior pelo carbono 3.

E.C. 3.2.1.39. Glucan Endo (1-3) β -D-Glucosidase – Hidrólise de ligações glicosídicas do tipo (1-3) em β -(1-3)-glucanas.

E.C. 3.2.1.58. Glucan (1-3) β -glucosidase – Hidrólise sucessiva de unidades de β -D-glicose da ponta não redutora de β (1-3) glucanas, liberando o anômero α da glicose.

E.C. 3.2.1.71. Glucan endo-1,2- β -glucosidase – Hidrólise randômica de ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 2) em β (1 $\rightarrow$ 2) glucanas.

E.C. 3.2.1.73. Licheninase – Hidrólise de ligações glicosídicas β (1-4) em β glucanas contendo ligações (1-3) e (1-4).

E.C. 3.2.1.74. Glucan (1-4) β -D-Glucosidase – Hidrólise de ligações em β (1-4) glucanas de maneira a remover unidades sucessivas de glicose.

E.C. 3.2.1.75. Glucan endo-1,6- β -glucosidase - Hidrólise randômica de ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 6) em β (1 $\rightarrow$ 6) glucanas.

E.C. 3.2.1.91. Cellulose (1-4) β -D-Cellobiosidase – Hidrólise de ligações glicosídicas β (1-4) em celulose e celotetraose, liberando celobiose da ponta não redutora das cadeias.

Um outro fator de diferenciação entre as atividades β -glucanásicas conhecidas é a capacidade de adsorção específica a substratos com algum caráter macromolecular definido – os dois fatores mais influentes neste tipo de modulação secundária da especificidade são a conformação tridimensional do substrato (cristalina ou amorfa) e a presença de grupos substituintes. Assim sendo, encontramos enzimas capazes de reconhecer preferencialmente a celulose em seu estado cristalino, e outras capazes de hidrolisar apenas seu estado amorfo. Da mesma forma, encontramos enzimas cuja hidrólise preferencial se dá sobre carboximetilcelulose, e outras enzimas incapazes de clivar este substrato (Klesov, 1991).

São conhecidas cerca de uma dúzia de famílias de CBDs⁹, domínios de ligação de celulose, em diferentes enzimas (Bayer et al., 1998). Estes domínios estão geralmente associados ao reconhecimento de superfícies do substrato cristalino ou na manutenção da processividade no sítio ativo (Bolam et al., 1998; Irwin et al., 1998; Tormo et al., 1996). Estes domínios são responsáveis pelo tipo de “macroespecificidade” apresentado por uma celulase. Nos outros tipos de glucanases ($\beta(1\rightarrow2)$, $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$), tanto estes parâmetros como a presença deste tipo de domínios moduladores não se encontram bem estudados (Bayer et al., 1998), embora já tenham sido documentados (Yamamoto et al., 1998).

1.2.3.A classificação estrutural

O crescente acúmulo de seqüências de aminoácidos e nucleotídeos de diferentes glicosil-hidrolases¹⁰ (e de seus putativos genes), aliado ao desenvolvimento de algoritmos de comparação de seqüências, permitiu a divisão destas enzimas em famílias, de acordo com similaridades na distribuição de grupos hidrofóbicos ao longo

⁹ A sigla deriva de **C**ellulose **B**inding **D**omains, em inglês.

¹⁰ Glicosil-hidrolases (E.C. 3.2.1.-): enzimas responsáveis pela hidrólise (e às vezes transferência) de ligações O, S ou N-glicosídicas. Obviamente o grupo inclui todas as β -glucanases.

da cadeia polipeptídica (Henrissat, 1991). Esta classificação, segundo seus autores, reflete melhor as características estruturais das proteínas envolvidas e permite uma visualização das relações evolutivas entre as enzimas já conhecidas, como também uma extrapolação mais confiável de propriedades estruturais e mecánísticas dentro de um grupo. Isto se deveria à relação existente entre a estrutura tridimensional e a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo (Bairoch, 2000).

De fato, até o presente momento observou-se que membros de uma mesma família possuem a mesma estrutura tridimensional e mesmo tipo de produto (retenção ou inversão da estereoespecificidade) em todos os casos observados. São conhecidos cinco tipos de pares de grupamentos atuantes como doador de prótons e nucleófilo ao longo das famílias de glicosil hidrolases conhecidas (ver tabela 3). Em apenas um caso – mirosinases da família 1, que não apresentam um resíduo de ácido glutâmico como doador de prótons - observou-se uma diferença na natureza dos resíduos envolvidos em catálise entre membros de uma família. O agrupamento de seqüências não apresenta fidelidade a grupos taxonômicos, de forma que em uma mesma família podem ser encontradas enzimas de arqueobactérias, bactérias e eucariontes (família 1), ou mesmo enzimas de bactérias, eucariontes e vírus (famílias 18 e 25) (Bairoch, 2000).

Tabela 3 – Tipos de resíduos envolvidos em catálise nas famílias conhecidas de glicosil-hidrolases. Carb – Oxigênio da carbonila do grupo acetamido do carbono 2 de um resíduo (N-acetilglicosamina) do substrato. ? – resíduo de natureza desconhecida.

Nucleófilo	Doador de Prótons	Famílias
Glu	Glu	1 ¹¹ , 2, 4, 5, 7, 10-12, 15-17, 26, 30, 35, 39, 42, 51, 53, 72
Asp	Glu	8, 9, 13, 22, 38, 46
Asp	Asp	6, 45
Carb	Glu	18, 20
Tyr+Glu	?	33, 34
?	Glu	23
?	?	3, 14, 19, 24, 25, 27-29, 32, 36, 37, 43, 44, 47-50, 52, 54-59, 61-71, 73-81

São conhecidas até o presente momento 81 famílias de glicosil-hidrolases, sendo que β -glucanases estão presentes em 18 (Coutinho and Henrissat, 2000). Aparentemente cada uma destas 18 famílias não correspondem a um E.C. específico - são conhecidas famílias contendo até 6 tipos de atividade enzimática (ver tabela 4). As famílias com apenas um tipo de atividade enzimática caracterizam-se pelo baixo número de seqüências incluídas, o que levanta a possibilidade de que esta monoespecificidade seja devida apenas a um problema amostral. Dentre β -glucanases, apenas três E.C.s são restritos a uma família e em nenhum dos casos a família é composta apenas por elementos da mesma classe.

¹¹ Nas mirosinases (15% das seqüências da família 1), o resíduo doador de prótons (ácido glutâmico) está ausente: a catálise se dá apenas com a presença do nucleófilo, dada a alta eletronegatividade do aglicone.

Tabela 4 – Classes enzimáticas (E.C.s) presentes nas famílias de glicosil-hidrolases possuidoras de algum tipo de β -glucanase em seu interior (ver Bairoch, 2000).

Família	E.C.
3	beta-glucosidase (EC 3.2.1.21); beta-xylosidase (EC 3.2.1.37); <i>N</i> -acetyl beta-glucosaminidase (EC 3.2.1.52); cellodextrinase (EC 3.2.1.74) ; exo-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.-)
5	endoglucanase (EC 3.2.1.4); beta-mannanase (EC 3.2.1.78); exo-1,3-glucanase (EC 3.2.1.58); endo-1,6- glucanase (EC 3.2.1.75); xylanase (EC 3.2.1.8); endoglycoceramidase (EC 3.2.1.123)
6	endoglucanase (EC 3.2.1.4); cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
7	endoglucanase (EC 3.2.1.4); cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
8	endoglucanase (EC 3.2.1.4); lichenase (EC 3.2.1.73); chitosanase (EC 3.2.1.132)
9	endoglucanase (EC 3.2.1.4); cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
10	xylanase (EC 3.2.1.8); endo-1,3-beta-xylanase (EC 3.2.1.32); cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
12	endoglucanase (EC 3.2.1.4); xyloglucan hydrolase (EC not defined)
16	lichenase (EC 3.2.1.73); xyloglucan xyloglucosyltransferase (EC 2.4.1.207); agarase (EC 3.2.1.81); κ - carrageenase (EC 3.2.1.83); endo-beta-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39); endo- β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.6)
17	endo-1,3-beta-glucosidase (EC 3.2.1.39); lichenase (EC 3.2.1.73); exo-1,3-glucanase (EC 3.2.1.58)
44	endoglucanase (EC 3.2.1.4)
45	endoglucanase (EC 3.2.1.4)
48	endoglucanase (EC 3.2.1.4); cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)
51	alfa-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); endoglucanase (EC 3.2.1.4).
55	exo-1,3-glucanase (EC 3.2.1.58); endo-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39)
61	endoglucanase (EC 3.2.1.4)
64	beta-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39).
74	endoglucanase (EC 3.2.1.4)

São conhecidos dentre as 18 famílias de β -glucanases oito modelos básicos de estrutura tridimensional (Bayer et al., 1998): $(\beta/\alpha)_8$ barril (clã GH-A), rocambole β^{12} do clã GH-B, rocambole β do clã GH-C, (β/α) barril distorcido da família 6, $(\alpha/\alpha)_6$ barril da família 8, $(\alpha/\alpha)_6$ barril da família 9, β -barril da família 45 e $(\alpha/\alpha)_6$ barril da família 48. Estes modelos estão expostos na figura 11.

¹² Em inglês, β -jellyroll.

Figura 11 – Modelos de estrutura tridimensional conhecidos em glicosil-hidrolases (Davies and Henrissat, 1995).

1.2.4. Papel biológico

Na natureza, β -glucanases são encontradas basicamente em duas situações: como parte de sistemas de renovação e rearranjo de β -glucanas presentes na parede celular ou em estruturas de reserva de microorganismos, fungos e plantas superiores, e em sistemas digestórios de herbívoros, fungívoros e decompositores (Bull and Chesters, 1966). No primeiro caso, as enzimas encontram-se intracelularmente, ou no espaço periplásmico (Euglenophyta, líquens, fungos e gramíneas), enquanto que no segundo caso estas são secretadas para o meio externo (fungos, invertebrados) ou estão presas à superfície celular externa (cellulosomas de bactérias).

A digestão de β -glucanas possui um objetivo que em si é dual, correspondendo parcialmente às duas funções que estes compostos cumprem na natureza: além da obtenção de glicose como fonte de energia, o desarranjo estrutural da parede celular vegetal, fúngica ou bacteriana ingerida implica, no caso de sistemas digestórios, em um melhor acesso, para outras enzimas, a outros compostos intracelulares, como proteínas e carboidratos. Em sistemas intracelulares observam-se β -glucanases envolvidas na obtenção de glicose de materiais de reserva, como também enzimas envolvidas no

remodelamento da parede, a partir de um desarranjo estrutural localizado (Barras and Stone, 1969).

A digestão de β -glucanas também parece possuir um papel auxiliar, para o caso de grandes consumidores de material vegetal, no trânsito do alimento ingerido. Dada a natural tendência destes compostos na formação de agregados, géis e soluções de alta viscosidade, geralmente a presença de β -glucanases no trato digestório leva à diminuição da viscosidade do bolo alimentar, o que possibilita ao animal uma passagem mais rápida do bolo alimentar não digerido (Danicke et al., 1999).

1.2.5. Particularidades de sistemas β -glucanásicos.

É preciso considerar, também, nos sistemas glucanásicos conhecidos, a presença de outros fenômenos: sinergismo (estrutural ou cinético) entre diferentes tipos enzimáticos, inibição pelos produtos da digestão de glucanas, complexidade inicial do substrato, adsorção de enzimas à superfície de um substrato insolúvel, formação de heterogeneidades no substrato ao longo de sua degradação e a interação estrutural entre componentes enzimáticos e não enzimáticos, com a formação de macroestruturas (celulosomas). Todos estes fatores, aliados ao grande número de tipos de atividade envolvidos, tornam extremamente difícil uma descrição e interpretação sintéticas de qualquer sistema glucanásico. A possibilidade de construção de um modelo teórico completo tem sido, mesmo recentemente, descartada, com a adoção de uma abordagem empírica (GonzalezTello et al., 1996).

Ao longo dos últimos vinte anos uma série de modelos cinéticos e de estudos estruturais foram desenvolvidos de forma a explicar um ou outro dos comportamentos mencionados acima. Destacamos aqui o modelo de Suga, que delineia as bases da

existência do sinergismo cinético entre endo e exo-glucanases (Suga et al., 1975a¹³); modelos de hidrólise levando em conta fatores como insolubilidade do substrato e interações de superfície (Suga et al., 1975b); modelos desenvolvidos para o sistema celulásico de *Trichoderma* sp. (inibição pelo produto, adsorção e transferência de massa; ver Howell and Stuck, 1975; Huang, 1975; Seiboth et al., 1997; Hayashi et al., 1998); o estudo da degradação de celulose bacteriana microcristalina (heterogeneidade ao longo do ensaio; ver Sangseethong et al., 1998, Valjamae et al., 1998); estudo do celulosoma de *Clostridium* sp. (formação de macroestruturas; Zverlov et al., 1998; Ciruela et al., 1998; Kataeva et al., 1997; Gal et al., 1997) e o estudo da regulação de secreção das celulases de *Thermomonospora fusca* (Spirodonov and Wilson, 1998). Os outros modelos conhecidos até agora carecem de um conhecimento mais completo dos diversos componentes do substrato e de particularidades do funcionamento das enzimas envolvidas. O avanço nos campos do estudo da estrutura de carboidratos e do entendimento da diversidade enzimática envolvida em sua degradação provavelmente permitirá, em breve, a construção de modelos mais completos para os sistemas glucanásicos menos complexos conhecidos (*Trichoderma reesei*, *Thermomonospora fusca* ou *Clostridium*, por exemplo).

¹³ Dados conflitantes e uma discussão interessante a respeito do sinergismo entre exo e endo glucanases podem ser encontrados em Jones et al., 1974.

1.3.O estudo da digestão em insetos.

1.3.1.Objetivos da pesquisa em digestão em insetos.

A classe Insecta é composta por cerca de 1.000.000 espécies conhecidas, distribuídas por cerca de 35 ordens (Brusca and Brusca, 1990). Caracteriza-se especialmente por sua diversidade interna: dificilmente um conhecimento obtido a partir de uma ordem pode ser generalizado para outras, como pode ser observado em outras classes (mamíferos, por exemplo). Nestes animais, o entendimento de qualquer fenômeno fisiológico em uma escala evolutiva mais ampla passa obrigatoriamente pelo estudo de inúmeros gêneros.

O investimento na pesquisa em fisiologia e bioquímica de insetos esteve sempre bastante relacionado ao desenvolvimento de formas de controle populacional destes indivíduos. O surgimento e a utilização de inseticidas químicos no início do século XX resultou em uma crença inicial de que se havia chegado a uma solução definitiva para o problema. Ao longo do tempo, diversas abordagens como o controle biológico ou a utilização de plantas transgênicas (teoricamente menos danosas ao meio ambiente que os pesticidas) puderam ser colocadas à disposição dos sistemas de produção agrícolas, em diversas partes do globo. Contudo, a necessidade de novos investimentos nesta área tornou-se patente com a verificação da existência de diferentes tipos de resistência tanto aos controles biológicos como aos pesticidas e às plantas transgênicas (Hilder and Boulter, 1999; Oppert et al., 1997). O consenso atual prega a utilização da maior variedade possível de formas de controle, evitando uma pressão seletiva específica exagerada (McGaughy and Whalon, 1992; Bauer, 1995).

O alcance deste objetivo pressupõe um maior conhecimento da fisiologia destes animais, especialmente no que concerne a seu sistema digestório – não só a principal

interface entre estes animais e a produção agrícola cuja proteção pretende-se atingir, mas também a mais acessível a agentes externos de controle.

1.3.2. O processo digestório.

Em insetos, o tubo digestório é dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. O principal local de secreção de enzimas e absorção de nutrientes é o intestino médio. Os intestinos anterior e posterior são revestidos por cutícula, não secretam enzimas e não absorvem nutrientes, embora possa ocorrer neles digestão do alimento ingerido por enzimas provenientes do intestino médio, das glândulas salivares (anterior) ou mesmo até da flora intestinal (posterior) (Chapman, 1982). Em alguns insetos, parte significativa dos lipídeos da dieta é absorvida no intestino anterior (Bell e Adiyodi, 1982).

O intestino médio é revestido por uma membrana quitinoprotéica (membrana peritrófica, inexistente nos Hemiptera), a qual delimita os espaços ectoperitrófico (entre o epitélio intestinal e a membrana peritrófica) e endoperitrófico (interior da membrana peritrófica; lúmen intestinal). Nas ordens mais apomórficas de insetos, as únicas enzimas digestórias que atravessam esta membrana e entram em contato direto com o alimento são despolimerases; oligomerases são encontradas no espaço ectoperitrófico e enzimas de digestão final localizam-se na superfície das células do epitélio, associadas ao glicocálix ou à própria membrana plasmática (Terra, Ferreira and Baker, 1996).

1.3.3. O estudo de β -glucanases em insetos.

São conhecidas inúmeras estratégias utilizadas por plantas na defesa contra herbívoros e patógenos. Entre elas, estão a produção de inibidores da função digestória, produção de substâncias tóxicas para o herbívoro, produção de polissacarídeos (barreiras físicas), lectinas, agentes antimicrobianos (fitoalexinas), e fatores de

reconhecimento e lise de microorganismos patogênicos (Maleck & Dietrich, 1999; Dixon and Harrison, 1990; Broekaert et *al.*, 1997).

A posição estratégica das despolimerases, tanto espacialmente (espaço endoperitrófico, em contato com o alimento) como no processo de digestão (aproveitamento inicial do material ingerido) faz com que estas enzimas sejam o melhor alvo para a inibição do sistema digestório de insetos. De fato, em diferentes plantas observa-se a produção de inibidores de proteinases e amilases, levando à diminuição da eficiência do ataque do herbívoro à planta em questão. Estes inibidores têm sido utilizados para a confecção de plantas transgênicas, com diferentes eficiências de proteção (Felton & Gatehouse, 1996)

O estudo pormenorizado de sistemas β -glucanásicos de insetos encontra-se inicialmente no contexto da obtenção de uma maior compreensão das possíveis interações entre insetos herbívoros ou fungívoros e seu alimento, o que, sem dúvida, colabora para a gama de conhecimentos necessários para a idealização de estratégias e mecanismos de defesa de recursos agrícolas desta natureza, através do controle da população destes insetos.

O estudo de β -glucanases de insetos sem dúvida encontra-se em um estado incipiente: na maior parte das espécies estudadas não se têm nada mais do que a simples demonstração da atividade enzimática no organismo. Em poucos casos a atividade β -glucanásica foi isolada para estudo mais detalhado - não havendo provas inequívocas de que tenha sido de fato o epitélio digestório do inseto a fonte secretora da enzima isolada, e não o alimento ou a flora intestinal do animal. Tais provas (imunocitocalização em células da glândula salivar e clonagem a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares) foram obtidas apenas para um inseto: *Reticulitermes speratus*, um

térmita inferior¹⁴(Watanabe et al., 1997). Evidências da secreção de β -glucanases (eminentemente celulases) por insetos têm sido obtidas para outros térmitas (*Mastotermes darwiniensis*, *Coptotermes formosanus*) e alguns membros de Blattodea (*Panesthia cribata*)(Scrivener and Slaytor, 1994). A questão da secreção de celulases por insetos, levantada no início do século, nunca deixou de ser polêmica, dada a convicção inicial dos pesquisadores na área (os quais concentraram seus estudos em térmitas inferiores) de que a digestão de celulose nestes invertebrados era efetuada por microorganismos da flora intestinal. De fato, em muitos insetos a participação da flora no aproveitamento da celulose (e eventual absorção do acetato produzido por esta pelo inseto) é indubitável; mas este panorama não exclui a possibilidade de uma digestão conjunta, em um sistema aonde tanto celulases do inseto e da flora atuem ao mesmo tempo (O'Brien, 1979; Yamaoka and Nagatani, 1975; Hogan et al., 1988; Breznak and Brune, 1994). Contudo, nos dois insetos aonde estas enzimas mais foram estudadas (*Panesthia cribata* e *Reticulitermes speratus*) as enzimas do inseto parecem possuir um papel preponderante em relação às enzimas da flora (Scrivener and Slaytor, 1994; Watanabe et al., 1997). Para as outras β -glucanases nenhum estudo deste tipo foi conduzido até o momento.

Enzimologicamente, foram estudadas em detalhe apenas as atividades laminarinásicas de *Rhagium inquisitor* (Coleoptera; Chipoulet and Chararas, 1984) e *Abracris flavolineata* (Orthoptera, dados do nosso laboratório não publicados), embora tenham sido demonstradas atividades sobre laminarina em outros Orthoptera e Coleoptera, além de membros de Trichoptera, Diptera e Isoptera (Terra & Ferreira, 1994). A enzima de *R. inquisitor* é uma endoglucanase e não cliva liquenana (Chipoulet and Chararas, 1984), enquanto que a enzima de *A. flavolineata* é uma exoglucanase e é

¹⁴Os térmitas inferiores são conhecidos por terem no interior do intestino posterior grandes quantidades

ativa sobre liquenana. A enzima de *A. flavolineata* é inibida pelo substrato, produz glicose e laminaribiose (na razão 2:1) a partir de laminarina em dois sítios ativos distintos, aparentemente possuindo três sítios de interação com o substrato. Os dois sítios ativos possuem carboxilas envolvidas na catálise. Quanto a liquenases, é conhecido o isolamento parcial destas enzimas em *Rhagium inquisitor* (Chipoulet and Chararas, 1985b) e *Abracris flavolineata*, sem nenhum estudo mais detalhado.

Já foram caracterizadas algumas celulases de cupins (*Nasutitermes walkeri*, Schulz, 1986; *Macrotermes mulleri*, Rouland et al., 1988; *Reticulitermes speratus*, Watanabe et al., 1997), baratas (*P. cribata*; Scrivener and Slaytor, 1994) e besouros (*Ergates faber*, Chararas et al., 1983), mas em nenhum caso obteve-se um estudo completo de sua especificidade (Terra & Ferreira, 1994). A única beta-glucanase de insetos para a qual já existem dados de sequenciamento completos é a celulase de *Reticulitermes speratus*. Trata-se de uma enzima da família 9 das glicosil-hidrolases, uma família até tal estudo composta apenas por enzimas de fungos e bactérias (Watanabe et al., 1998). A seqüência amino-terminal das $\beta(1-4)$ glucanases de *P. americana* também mostra alta homologia com as glicosil-hidrolases da família 9 (Scrivener et al., 1997).

Podem-se visualizar, até o presente momento, quatro papéis fisiológicos básicos para β -glucanases intestinais de insetos:

- 1) Aproveitamento de recursos lignocelulósicos como fonte de energia;
- 2) Aproveitamento de hemiceluloses como fonte de carbono;
- 3) Aumento da acessibilidade aos processos digestivos do animal de alimentos primariamente protegidos por estruturas β -glucânicas;

4) Provável lise de paredes celulares bacterianas ou fúngicas, sejam estas infestantes, presentes no alimento ingerido ou na flora intestinal do inseto.

A importância da presença de hemicelulases e celulasas no tubo digestório, considerando a desagregação e o desarranjo parcial de substratos inicialmente refratários, com o fim de melhorar o aproveitamento do alimento protegido por paredes lignocelulósicas, geralmente é minimizada ou desconsiderada. Contudo, estudos recentes de suplementação alimentar com β -glucanases em porcos e galinhas deixam claro que estas enzimas podem levar a um incremento significativo na digestibilidade de alimentos de origem vegetal, e mesmo até no crescimento geral das culturas (Thacker and Campbell, 1999; Danicke et al., 1999; Jaroni et al., 1999; Ravindran et al., 1999). É provável que nos sistemas digestórios de insetos herbívoros e fungívoros estas enzimas possuam um papel fundamental no aproveitamento do alimento ingerido.

O estudo de sistemas β -glucanásicos em invertebrados poderia, eventualmente, ter importância em futuras aplicações biotecnológicas, no campo da reciclagem e aproveitamento de recursos lignocelulósicos (Brune, 1998). Sistemas enzimáticos de hidrólise de celulose em escala industrial, utilizando papel de jornal ou Solka Floc como fonte de celulose, e filtrados de *Trichoderma reesei* como fonte de enzimas, têm resultados ótimos em termos de custo de produção quando a hidrólise do substrato chega a 30%. Valores maiores de hidrólise são atingidos apenas após tempos muito longos de incubação, aumentando em muito os custos de produção (Fan et al., 1987). A digestibilidade de celulose em gafanhotos é dessa ordem, em torno de 30% (Marana et al., 1992). Se imaginarmos valores da mesma ordem para *P. americana*, e, considerando o tempo de percurso do alimento no tubo digestivo (cerca de 20 horas; Bell & Adiyodi, 1982)), não podemos deixar de considerar o tubo digestivo de *P. americana* como um sistema altamente eficiente no aproveitamento deste recurso, dados os tempos de

incubação nos reatores industriais considerados (10 horas) e a concentração de enzima necessária para que se atinja este rendimento (1 g/l) (Fan et *al.*, 1987).

Acredita-se que o ancestral da lactase-florizina hidrolase, a β -glicosidase digestória de mamíferos, seja uma laminarinase, devido ao fato da lactase florizina hidrolase clivar laminaribiose e gentiobiose (Freund et *al.*, 1991). Embora tenha sido encontrado um gene com uma sequência de nucleotídeos semelhante ao da lactase de mamíferos em molusco (Freund et *al.*, 1997), a escassez de estudos sobre β -glucanases de invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de corroboração desta teoria.

Assim sendo, o estudo de β -glucanases de insetos mostra-se inserido em inúmeras áreas da bioquímica (talvez apenas refletindo a complexidade do objeto de estudo), podendo vir a ter um papel fundamental não só em estudos fisiológicos e evolutivos do grupo, mas também contribuindo com áreas gerais do conhecimento (como a evolução e diversificação de tipos enzimáticos e de sistemas multi-enzimáticos).

1.4.Objetivos deste trabalho.

As β -glucanases têm sido bastante estudadas em fungos e microorganismos. Mesmo assim, vários aspectos destas enzimas tais como um possível sinergismo de atividades, não são conhecidos. O estudo de propriedades de β -glucanases animais é incipiente.

Para iniciar o estudo das β -glucanases de insetos escolhemos a *P. americana* por este animal apresentar alta atividade destas enzimas em seu tubo digestório. Nosso objetivo é verificar quantas glucanases são encontradas nesse animal, purificá-las, caracterizá-las e tentar inferir seu papel biológico.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Animais

A cultura de *Periplaneta americana* mantida em nosso laboratório consiste de um recipiente plástico de dimensões 40x50x70cm, coberto com uma tampa de madeira e tela de arame, de forma que os animais são expostos a condições naturais de fotoregime e temperatura ambiente. No interior da caixa são colocados seis suportes de papelão para ovos, intercalados com tubos de cartão (rolos de magipack ou alumínio usados), de maneira que as baratas possam alojar-se. Os animais são alimentados com sementes de *Hordeum vulgare* (aveia das marcas Quaker ou Ferla, Brasil) e ração para cães moída (Bonzo Mix Carnes, Purina, Brasil). Como fonte de água manteve-se na caixa uma placa de Petri com algodão úmido. O alimento e o algodão são trocados semanalmente; a caixa deve ser esvaziada, limpa e os suportes de papelão trocados mensalmente, de forma a evitar a infestação da cultura por parasitóides e o acúmulo de detritos. Em uma caixa acomodam-se cerca de quinhentos animais, entre adultos e ninfas.

Nas culturas de *Tenebrio molitor*, mantidas em nosso laboratório, os animais (adultos e larvas) são acondicionados em recipientes de 30x30x40cm cheios de farelo de trigo, expostos à luminosidade ambiente (proteção de madeira com tela de aço) e sob uma temperatura constante de 26°C. Os exemplares de larvas e adultos de *Atta rubropilosa*, como também porções do fungo *Attamyces bromatificus*, foram gentilmente cedidos pelo Sr. Faíçal Simon, diretor do departamento de criação da fundação Parque Zoológico da Cidade de São Paulo.

2.2. Preparação de frações solúveis.

Adultos de *Periplaneta americana* e larvas *Tenebrio molitor* de ambos os sexos foram retirados de suas respectivas culturas e dissecados de forma a isolar o tubo digestório completo do animal. Durante a dissecção, o material dissecado foi embebido em uma solução de Cloreto de Sódio (220mM para *P. americana* e 342mM para *T. molitor*) para evitar o dessecamento dos tecidos. Traquéias, corpos gordurosos, glândulas salivares e túbulos de Malpighi foram separados do tubo digestório.

Os tubos digestórios de *Tenebrio molitor* foram homogeneizados em um Homogeneizador tipo Potter-Ehveljem (dez movimentos de subida e descida) em água milliQ gelada. O produto obtido foi então centrifugado a 10.000g por 30 minutos, tendo seu sobrenadante recolhido. Este foi então filtrado em lã de vidro e teve seu volume acertado até que se obtivesse a concentração de 20,5 animais por mililitro, sendo a fonte dos ensaios enzimáticos realizados para *Tenebrio molitor*.

Os tubos digestórios de *Periplaneta americana* foram homogeneizados em água milliQ gelada num aparelho homogeneizador Omni-Mixer (Sorvall), em três pulsos (6.000 rpm) de 30 segundos cada, intercalados por três períodos de descanso de 30 segundos. O produto obtido foi sonificado em um aparelho Branson SX-10 em três pulsos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos cada, e homogeneizado novamente no Omni-Mixer (condições anteriores). O material, durante sua preparação, foi mantido sempre no gelo, sendo então centrifugado a 10.000g por 10 minutos a 4°C, tendo seu sobrenadante coletado e filtrado em lã de vidro. O volume da preparação foi acertado de forma a obter concentrações de 1,5-2 animais por mililitro.

Exemplares inteiros de larvas de *Atta rubropilosa* foram homogeneizados em homogeneizadores do tipo Potter-Ehveljem (quinze movimentos de subida e descida) em água milliQ gelada. Os homogeneizados foram então centrifugados a 10.000g por 30 minutos, tendo seus sobrenadantes coletados. Estes sobrenadantes tiveram seus volumes acertados de modo a obter as concentrações de 3,08 a 10,8 animais por mililitro, sendo o material utilizado para os ensaios de atividade enzimática.

200 miligramas de grãos de aveia (Quaker, Brasil) foram retiradas da cultura de *Periplaneta americana* após estarem lá uma semana, sendo então homogeneizados em água milliQ gelada em um Omni-Mixer (Sorvall), em três pulsos de 30 segundos cada (6.000 rpm), com intervalos de descanso de 30 segundos. O material foi então sonificado por 6 minutos num sonicador Branson B-SX-10. A seguir, o material foi homogeneizado novamente em Omni-Mixer, desta vez em três pulsos (6.000 rpm) de um minuto cada com intervalos de descanso de 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por dez minutos, tendo seu sobrenadante recolhido. O volume final do sobrenadante foi acertado de modo a conter o material proveniente de 0,5 gramas de aveia por mililitro, sendo este o material usado nas determinações de atividade enzimática.

2.3.Ensaaios enzimáticos.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados pela incubação da mistura de uma alíquota (geralmente de 50 microlitros) do material de interesse com uma alíquota de uma solução (50microlitros) contendo o substrato, a 30°C por diferentes períodos de tempo. A mistura foi então fervida por três minutos e os produtos da ação enzimática foram quantificados. Foram utilizados os substratos a seguir: laminarina (*Laminaria digitata*, Sigma) 0,25% (p/v), liquenana (*Cetraria islandica*, Sigma) 0,125% (p/v), carboximetilcelulose (Sigma) 0,25% (p/v), amido solúvel (*Zea mays*,

Polypharma) 0,5% (p/v), celobiose (Sigma) 7 mM, paranitrofenil- α -glicopiranosídeo (Sigma) 7 mM e paranitrofenil- β -glicopiranosídeo (Sigma) 7 mM, sempre em tampão citrato fosfato pH 6,0 50mM (concentrações finais no ensaio). À preparação de amido solúvel foi adicionado Cloreto de Sódio de forma a obter-se uma concentração final no ensaio de 100mM.

Nos ensaios sobre laminarina, liquenana, carboximetilcelulose e amido solúvel foi determinado o acréscimo na quantidade de grupos redutores presentes no meio de reação pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS; Noeting & Bernfeld, 1948). No ensaio sobre celobiose foi determinado o acréscimo na concentração de glicose pelo método do reagente Tris-Glicose-Oxidase (TGO; Dalqvist, 1968). Nos ensaios sobre paranitrofenil- α -glicopiranosídeo e paranitrofenil- β -glicopiranosídeo foi determinado o acréscimo na concentração de paranitrofenolato (Terra et al., 1979).

Controles sem substrato (brancos de enzima) e sem enzima (brancos de substrato) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. Adotou-se como medida de atividade enzimática (mU) o número (η moles) de ligações glicosídicas hidrolisadas por minuto (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1983). Nos ensaios sobre polissacarídeos, tal número foi determinado através de uma curva padrão do DNS utilizando glicose como agente redutor.

2.4. Quantificação de proteína nas amostras.

A concentração de proteína em frações solúveis iniciais e materiais provenientes dos primeiros passos de purificação foi determinada pelo método de Bradford (1976) (Coomassie Blue G), utilizando albumina de ovo na confecção da curva padrão. Para materiais com baixa concentração de proteína, geralmente produtos finais da marcha de purificação, utilizou-se o método de determinação de proteínas em solução com prata de Krystal *et al.* (1985), também utilizando albumina

de ovo como padrão. Neste método a amostra deve estar em uma solução Tris 10mM, CaCO_3 10mM, Tween 20 0,75% (v/v), pH 10-12; as amostras foram passadas para este tampão através de uma cromatografia de filtração em gel em uma coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, Suécia; ver item 2.23) e concentradas para um volume de 100ul através de vários ciclos de centrifugação (10.000g) em membranas Microcon-10 (AMICON, USA; corte de 10.000 Daltons, ver item 2.24).

2.5. Determinação do ponto isoelétrico por focalização isoelétrica em cilindros de poliacrilamida.

Para determinar o ponto isoelétrico das beta-glucanases digestivas de *P. americana*, realizou-se uma focalização isoelétrica em cilindros de poliacrilamida da fração solúvel de seu tubo digestório, segundo Terra *et al.* (1978). Usou-se um anfolito (Pharmacia, 2% (v/v) no gel) cuja faixa de pontos isoelétricos abrange os valores de 3 a 10. Foram montados e pré-focalizados (30 minutos a 31 V/cm) dois géis (7%, p/v) de 6,5 cm de comprimento. Num deles, aplicou-se a amostra (90 microlitros do homogeneizado de *P. americana* misturado a 10 microlitros de glicerol), enquanto o outro foi usado como controle de pH. Após a focalização (2 horas a 200V e 2 miliAmpères por gel), os géis foram fracionados em água em um fracionador de géis de poliacrilamida (Savant Microsystems, USA). Foram coletadas frações de cerca de 300 µl cada. Nas frações do gel controle foi adicionado 0,5 ml de água. Após isto, as frações foram mantidas em 4°C (frações experimentais) e em temperatura ambiente (frações controle) durante 3 horas. Nas frações experimentais foram determinadas as atividades sobre laminarina e liquenana e nas frações do gel controle foi medido o pH. As duas determinações foram realizadas a 30°C. O valor do pI das enzimas de interesse foi determinado comparando-se o perfil de atividade das frações experimentais com o perfil de pH das frações controle.

2.6. Preparação de coquetel de inibidores de proteinases. Ensaio de estabilidade às proteinases presentes na fração solúvel.

Foi preparada a seguinte mistura de inibidores: TLCK 2mM, TPCK 2mM, pHMB 4mM, pepstatina A 100µM, DAN 6mM e EDTA 10mM. As proteinases alvo são tripsina (TLCK; Shaw et *al.*, 1965), quimotripsina (TPCK; Shaw, 1967), cisteína proteinases e cisteinil carboxipeptidases (pHMB; Barret and Salvesen, 1986), cisteína proteinases e aspartico proteinases (Pepstatina A; Murao et *al.*, 1993), metaloproteinases (EDTA; Barret and Salvesen, 1986) e pepsina (DAN; Barret and Salvesen, 1986). Antes de se acertar o volume da solução o pH foi elevado para 12,2 com NaOH.

Três microlitros do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* foram misturados a 147 microlitros de tampão citrato fosfato 400mM pH 6,0 (duas preparações). A esta mistura foram adicionados 150 microlitros do coquetel (solução experimental) ou 150 microlitros de NaOH pH 12,16 (controle). Metade dos dois materiais foi utilizada imediatamente para determinação das atividades enzimáticas sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose (atividades iniciais). A outra metade foi incubada por treze horas a 4°C, tendo então as mesmas atividades enzimáticas determinadas. As atividades iniciais nos dois materiais foram equivalentes.

2.7. Precipitação da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* com laminarina e solubilização com etanol.

200 microlitros da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* foram pipetados sobre 10 mg de laminarina em um eppendorf. Adicionaram-se então à mistura 800µl de etanol. Suspendeu-se todo o material no fundo do eppendorf

manualmente. A suspensão foi incubada por 30 minutos com agitação, após o qual foi centrifugada a 10.000 g por dez minutos. O sobrenadante foi coletado e denominado Sob80. Ao precipitado adicionou-se 1ml de etanol 60% (v/v). Repetiu-se a suspensão, a incubação, a centrifugação e a coleta do sobrenadante, dando origem ao material Sob60. Repetiram-se as operações utilizando etanol 40% (v/v), etanol 20% (v/v) e água, dando origem aos materiais Sob40, Sob20, Sob0 e a um precipitado insolúvel final.

Em todas as frações foram determinadas a concentração de proteína e a atividade sobre laminarina e liquenana. A concentração de laminarina nas amostras (Sob80, Sob60, Sob40, Sob20 e Sob0) foi estimada realizando-se um experimento idêntico sem a adição de homogeneizado, e medindo-se a quantidade de carboidrato total (método do fenol-ácido sulfúrico) nos materiais correspondentes a Sob80, Sob60, Sob40, Sob20 e Sob0. A atividade nos diversos materiais foi normalizada de acordo com o incremento no poder redutor e na atividade de laminarinase esperado para estas concentrações de laminarina. Os valores de atividade nos sobrenadantes com etanol foram comparados aos níveis de atividade da amostra original a qual foi adicionada etanol nas mesmas concentrações de cada fração. Em geral, quanto maior a concentração de etanol no ensaio, menor é a sua atividade (inibição das beta-glucanases, inativação parcial ou precipitação do substrato). Foi medido o poder redutor de Sob80, Sob60, Sob40, Sob20 e Sob0, obtendo-se valores coerentes com os interceptos obtidos em cada ensaio de atividade.

2.8. Precipitação de beta-glucanases na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* com liquenana.

Foram idealizados três protocolos de precipitação das beta-glucanases da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* com liquenana, descritos a seguir:

2.8.1. - 50 μ l da preparação de enzima foram pipetados sobre 10mg de liquenana. Adicionaram-se à mistura 950 μ l de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,0. Suspendeu-se o material num eppendorf e o conjunto foi incubado com agitação (agitador vertical Heto RS-PL 28-20 rotação 3 a 15° de inclinação) por 60 minutos no gelo. Centrifugou-se a mistura por 10 minutos a 10.000g (todas as centrifugações realizadas a 0°C), coletando-se o sobrenadante (sobrenadante inicial, ou Sob). O precipitado foi ressuspendido com 1ml de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,0. Centrifugou-se a mistura (sem incubação) por 5 minutos a 2.500g, coletando-se o sobrenadante (L1). Ressuspendeu-se o precipitado em 1ml de etanol 60% (v/v). Centrifugou-se a mistura (5 minutos a 2.500g) e coletou-se o sobrenadante (L2). Repetiu-se a ressuspensão com etanol 60% (v/v) duas vezes, originando os materiais L3 e L4 e um precipitado que foi ressuspendido com 1ml de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,0 com 1M NaCl. Após centrifugar 5 minutos a 2.500 g o sobrenadante foi coletado (L5). Todos os materiais tiveram estimadas suas concentrações e atividades sobre laminarina e liquenana. Como a liquenana é virtualmente insolúvel em água ou tampões gelados, não foi levada em conta a presença adicional do composto nos diversos materiais.

2.8.2 - 15 μ l de homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* foram pipetados sobre 10 mg de liquenana. Adicionaram-se 200 μ l de tampão citrato fosfato 200mM e 785 μ l de água milliQ à mistura. O material insolúvel foi suspenso e a mistura incubada com agitação (mesma condições do item 1) por uma hora e meia. Centrifugou-se a mistura por 5 minutos a 2.500 g e coletou-se o sobrenadante (sobrenadante inicial ou Sob). Ressuspendeu-se o precipitado com 1 ml de tampão citrato fosfato 400mM com 1M NaCl. Este material foi centrifugado por 5 minutos a

2.500 g. O sobrenadante foi coletado (Ressuspendido, ou Res) e as concentrações de proteína e atividades sobre liquenana e laminarina determinadas nos dois materiais.

2.8.3. - 50 µl de homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* foram pipetados sobre 10 mg de liquenana. Adicionou-se à mistura 950 µl de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,0. O material insolúvel foi ressuspendido e a mistura foi incubada com agitação (mesmas condições do item 1) por 60 minutos. Centrifugou-se o material por 10 minutos a 10.000 g, coletando-se o sobrenadante (sobrenadante inicial ou Sob). Resuspendeu-se o precipitado com 1ml de tampão EPPS 20mM pH 8,0, centrifugando-se a mistura imediatamente a 2.000 g. O sobrenadante foi coletado (material L1) e o precipitado foi ressuspendido novamente com o mesmo tampão, repetindo-se toda a operação duas vezes, o que deu origem aos materiais L2 e L3. As atividades sobre laminarina e liquenase, como também a concentração de proteína, de todos os materiais foram determinadas. Os materiais L1, L2 e L3 foram reunidos e aplicados em uma cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ ligada a um sistema FPLC (Pharmacia, Suécia).

2.9. Cromatografia em coluna de liquenana da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Coluna 1 / 1º corrida - 800 miligramas de liquenana (Sigma) foram suspensas em tampão citrato fosfato 20mM pH 6,0 com 2mM de benzamidina e empacotadas em um suporte cromatográfico de 1cm de diâmetro (altura da coluna de 5cm). A coluna foi equilibrada com 40 ml do mesmo tampão citrato fosfato. Aplicaram-se diretamente no topo da coluna 500 µl do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* (em PMSF 10mM). Conectou-se a coluna a uma bomba peristáltica LKB, eluindo-se a coluna até a secagem do topo. Após cinco minutos de incubação da coluna com o homogeneizado, iniciou-se a corrida, sob um fluxo de 0,22 ml/min e

com aplicação manual de tampão no topo da coluna. A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente (26°C). Foram coletadas frações de 550 µl. Foi retirada de cada fração três alíquotas de 50 µl cada, para ensaio das atividades sobre laminarina, liquenana e CMC. Após a corrida a coluna foi congelada.

2º corrida – A mesma coluna do item anterior foi reutilizada, com a aplicação de um pouco de liquenana no topo para manter a mesma altura do princípio da primeira corrida. Condições de aplicação, corrida e ensaio idênticas ao item anterior, com as seguintes alterações:

- incubação da coluna com o homogeneizado por 30 minutos a 4°C;
- utilização de tampão gelado.

Após a corrida passou-se etanol 20% pela coluna, solução na qual esta foi guardada.

3º corrida – A mesma coluna do item anterior foi reutilizada, nos moldes expostos no item 1, com as seguintes alterações no protocolo:

- equilibrou-se a coluna antes da corrida com 20ml de tampão citrato fosfato;
- incubação da coluna com o homogeneizado por 5 minutos à temperatura ambiente;
- até a fração 14, usou-se um fluxo de 0,11 ml/min. depois desta fração, aumentou-se o fluxo para 0,22 ml/min;
- após a fração 53, frações de 1 ml.

Coluna 2 – 800 miligramas de liquenana (Sigma) foram suspensos em tampão citrato fosfato 20mM e empacotadas em um suporte cromatográfico (dimensões da coluna 5cm de comprimento e 1cm de diâmetro). Aplicou-se diretamente 500 µl do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* (em PMSF

4mM). Ligou-se a coluna a uma bomba peristáltica LKB e, após a secagem do topo da coluna, incubou-se esta com o homogeneizado por cinco minutos à temperatura ambiente. Eluiu-se a coluna com um fluxo de 0,25 ml/min do mesmo tampão de suspensão (aplicação manual de tampão no topo da coluna). Coletaram-se frações de 500 µl, retirando-se alíquotas de 10 µl para os ensaios enzimáticos. Após a fração 80, trocou-se o tampão de eluição por tampão citrato fosfato 20mM com 1 M de NaCl.

2.10. Cromatografia em coluna de α -celulose da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

1º corrida - 670 mg de α -celulose (Sigma) foram suspensas em tampão citrato fosfato 20mM pH 6,0 e empacotadas em um suporte cromatográfico (dimensões da coluna: 6,4 cm de comprimento por 1cm de diâmetro). A coluna foi acoplada a um sistema de baixa pressão (EconoSistem; BioRad, USA). Foram aplicados na coluna 500µl do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana*. A coluna foi eluída com um fluxo de 0,5 ml/min e foram coletadas frações de 1ml. Retiraram-se alíquotas de 50µl para os ensaios enzimáticos de cada fração.

2º corrida – 670 mg de α -celulose foram suspensas em tampão citrato fosfato 20mM pH 6,0 e empacotadas em um suporte cromatográfico, o qual foi acoplado a uma bomba peristáltica LKB. Aplicaram-se 500µl do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* no topo da coluna. Ligou-se a bomba peristáltica até que o topo da coluna fosse seco, e incubou-se esta por cinco minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, eluiu-se a coluna com um fluxo de 0,5 ml/min, aplicando-se o mesmo tampão de suspensão em seu topo. Foram coletadas frações de 0,5 ml cada e retiradas alíquotas de 50µl para os ensaios enzimáticos de cada fração.

2.11. Cromatografia de troca iônica em coluna Econo HiQ (BioRad, USA) em sistema de baixa pressão (EconoSistem; BioRad, USA) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Equilibrou-se uma coluna EconoHiQ ligada a um sistema de baixa pressão (EconoSistem, BioRad) com tampão trietanolamina 20mM pH 7,0. Aplicaram-se 650µl da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* na coluna, que foi inicialmente eluída com 5ml do tampão inicial para lavagem do material não ligado. Aplicou-se então um gradiente de concentração salina de 0 a 1M de Cloreto de Sódio no mesmo tampão (20ml), após o qual lavou-se a coluna com 5 ml de tampão trietanolamina 20mM com 1M NaCl. Utilizou-se um fluxo de 1 ml/min. Coletaram-se frações de 1ml e retiraram-se alíquotas de 50µl destas para ensaios de atividade sobre laminarina e liquenana.

2.12. Eletroforese em cilindro de poliacrilamida da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

90 microlitros da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* (misturados a 10µl de glicerol) foram aplicados em um cilindro de eletroforese em gel de poliacrilamida, preparado segundo Hedrick & Smith (1968). Usou-se uma concentração de acrilamida no gel de 7,5 % (p/v), sendo que a eletroforese foi desenvolvida a 4°C com uma corrente de 2,5mA no cilindro. O comprimento do cilindro era de 8cm. Terminada a corrida, o gel foi lavado com tampão citrato fosfato 20mM a 4°C por um período de uma hora, com trocas de tampão a cada 15 minutos para retirada do Tris. Após este período o gel foi fracionado em um fracionador de géis de poliacrilamida, no mesmo tampão de lavagem. Foram coletadas frações de 600 µl. Após a coleta, estas frações permaneceram na geladeira a 4°C por três horas, antes da retirada de alíquotas para os ensaios enzimáticos.

2.13. Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Metil Sepharose (BioRad, USA) em sistema de baixa pressão (EconoSistem, BioRad, USA) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Misturaram-se 500 μl do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* com 367 μl de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4M. Incubou-se a mistura por 30 minutos a 4°C, após o qual esta foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos. O sobrenadante e o precipitado assim obtidos foram submetidos a cromatografias em Metil Sepharose.

2.13.1. Cromatografia do sobrenadante.

Aplicou-se 650 μl do sobrenadante em uma coluna Metil Sepharose ligada a um sistema de baixa pressão (EconoSistem) e equilibrada em um tampão citrato fosfato 100 mM pH 6,0 com 1,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A coluna foi lavada com 5 ml desse tampão, sendo aplicado então um gradiente de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1,7M-0M (20ml), após o qual lavou-se a coluna com 5 ml de tampão citrato fosfato 100 mM pH 6,0. Utilizou-se um fluxo de 0,7 ml/min e foram coletadas frações de 0,5 ml. Retiraram-se alíquotas de 50 μl para ensaios de atividade de cada fração sobre laminarina e liquenana.

2.13.2. Cromatografia do material precipitado por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O precipitado do subitem anterior foi ressuspenso em 465 μl de tampão citrato fosfato 100mM pH 6,0, aos quais foram adicionados 98,7 μl de tampão citrato fosfato com 4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Incubou-se a mistura por 20 minutos a 4°C, após o qual esta foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos. Aplicou-se 650 μl do sobrenadante em uma coluna Metil Sepharose ligada a um sistema de baixa pressão (EconoSistem) e equilibrada em um tampão citrato fosfato 100 mM pH 6,0 com 0,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Utilizaram-se os mesmos métodos de corrida, gradiente e ensaio da corrida descrita acima, coletando-se frações de 1ml.

2.14. Cromatografias de interação hidrofóbica em Metil Sepharose (BioRad) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* sob diferentes condições.

Em outras ocasiões, a cromatografia do item 2.13.2. foi realizada sem a precipitação prévia do material com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,7M – adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (em tampão citrato fosfato) à fração solúvel de forma a obter uma concentração final de 0,7M, sendo esta então aplicado em uma coluna Metil Sepharose (BioRad, EconoSistem) nos mesmos moldes da cromatografia 2.13.2. Posteriormente, a mesma cromatografia foi realizada sem a utilização de gradiente – apenas eluindo-se a coluna com 17ml de tampão citrato fosfato com 0,7M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 23 ml do tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando uma bomba peristáltica LKB, mantendo os outros parâmetros da cromatografia de 2.13.2.

Mantendo a utilização da bomba LKB, foram realizadas outras cromatografias da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* aonde os tampões utilizados na cromatografia foram MES 50mM pH 6,0, NaCl 2M (lavagem) e o mesmo tampão sem sal (eluição). Também foram realizadas cromatografias em tampões MES 50mM pH 6,0, NaCl 5M e o mesmo tampão sem sal – com a colocação eventual (e separadamente, em cada cromatografia) de trealose (5mM), ZnCl_2 (5mM), MnCl_2 (10 μ M), CaCl_2 (5mM) ou MgCl_2 (5mM), nos dois tampões (lavagem e eluição). Nesta série de cromatografias, os volumes de lavagem da coluna variaram de 7 a 10ml, e os de eluição de 16 a 22ml – os outros parâmetros da cromatografia foram mantidos como no item 2.13.2. Em todas as cromatografias, adicionaram-se à amostra

tampões correspondentes ao tampão de lavagem, mais concentrados, de forma a submeter a fração solúvel às condições nas quais a coluna se encontrava equilibrada.

2.15. Cromatografias de troca iônica em coluna MonoQ (Pharmacia Biotech, Suécia) ligada a um sistema FPLC (Pharmacia Biotech, Suécia).

Aplicou-se o material ressuspendido em EPPS 20 mM pH 7,0, após precipitação com liquenana (reunião dos materiais L1, L2 e L3, item 2.8.3) ou as frações mais ativas reunidas após cromatografia em Metil Sepharose (item 2.13.2). O material derivado da coluna de Metil Sepharose e que continha $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi primeiramente aplicado em uma coluna HiTrap Desalting (Pharmacia) para remoção do sal (item 2.23).

A coluna MonoQ foi equilibrada com tampão EPPS 20 mM pH 7,0, sendo lavada com 5 ml desse tampão após as aplicações. Aplicou-se então um gradiente de concentração de NaCl de 0-0,5 M (20 ml), após o qual lavou-se a coluna com 5 ml de tampão EPPS 20 mM pH 7,0 com 1,0 M de NaCl e 5 ml de tampão EPPS 20 mM pH 7,0. Utilizou-se um fluxo de 1 ml/min e coletaram-se frações de 400 μl . Retiraram-se alíquotas de 50 μl para ensaios de atividade de cada fração sobre laminarina e liquenana.

2.16. Cromatografia de interação hidrofóbica da fração solúvel de *P. americana* em coluna Metil Sepharose (BioRad) ligada a sistema de baixa pressão (EconoSistem) em presença de CaCl_2 e CMC.

700 μl da fração solúvel de *P. americana* (diluídos 3,32 vezes em tampão citrato fosfato pH 6,0 20 mM) foram misturados a 0,2 g de NaCl, sendo então aplicados em uma coluna Metil Sepharose (BioRad) ligada a um sistema de cromatografia de baixa pressão (EconoSistem, BioRad) e equilibrada com tampão MES 50mM, NaCl 5M, CaCl_2 5mM e CMC 0,5% (p/v), pH 6,0. Após lavagem com 5

ml deste tampão, a eluição foi feita com 20 ml de um gradiente de NaCl (5M-0M). A seguir a coluna foi lavada com 10 ml de tampão MES 50 mM pH 6,0 contendo 5 mM CaCl_2 e 0,5% (p/v) CMC. O fluxo utilizado foi de 0,5 ml/min e as frações coletadas tinham 1 ml, sendo retirados 50 μl de cada para ensaio enzimáticos. As frações com atividade β -glucanásica foram recolhidas, obtendo-se os Materiais 1 e 2.

2.17. Cromatografias de troca iônica em coluna MonoQ (FPLC, Pharmacia, Suécia) do Material 2.

Em todas as cromatografias realizadas no sistema FPLC, utilizou-se água milliQ na confecção dos tampões, os quais foram filtrados e deaerados antes do uso, e foram coletadas frações de 0,4 ml, das quais foram retiradas alíquotas para ensaios de diversas atividades β -glucanásicas.

O material 2, obtido após cromatografia em Metil Sepharose (cerca de 20ml; ver item 2.16) foi dialisado contra 4 litros de água milliQ (2 trocas) e aplicado (10 aplicações de 2ml cada) em uma coluna MonoQ ligada a um sistema FPLC (Pharmacia) e equilibrada em tampão trietanolamina 20mM pH 7,0 com 5 mM CaCl_2 e 0,2% (p/v) CMC. A coluna foi então eluída com 5ml deste mesmo tampão, seguidos por um gradiente (20ml) 0-1M de NaCl e lavagem (10ml) com tampão trietanolamina 20mM, 5mM CaCl_2 e CMC 0,2% (p/v) pH 7,0 com 1M de NaCl. Utilizou-se um fluxo de 1ml/min.

Num outro experimento, esse material 2 foi dialisado da mesma forma, mas foi misturado com trietanolamina de forma a obter uma concentração final desta de 20mM e teve o seu pH acertado para 7,0 com NaOH. Aplicaram-se 4 ml deste pool (2 aplicações) em MonoQ; a coluna foi equilibrada e eluída nas condições acima. Noutra corrida, após a lavagem (5ml), com tampão de baixa força iônica, passaram-se pela coluna 10ml de tampão com 250mM de NaCl, um gradiente (20ml) de 250-650mM

NaCl, e 5 ml de tampão com NaCl 1M. Posteriormente, realizou-se uma corrida nos mesmos moldes, mas sem a passagem de 10ml de tampão com 250mM NaCl.

2.18 Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia).

O material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose foi saturado com NaCl e aplicado em uma coluna Resource ETH ligada a um sistema FPLC (Pharmacia) e equilibrada com o mesmo tampão inicialmente utilizado na Coluna Metil Sepharose (ver item 2.16). Após a passagem de 5 ml de tampão com 5M de NaCl, submeteu-se a coluna a um gradiente de 5-0M de NaCl (20ml), e esta foi lavada com 10 ml de tampão sem NaCl. Utilizou-se um fluxo de 0,8ml/min. As frações com atividade beta-glucanásica foram recolhidas e denominadas materiais CEL, LAM, LIQ1 e LIQ2 de acordo com a atividade apresentada. Essas frações foram submetidas a outros métodos de purificação de proteínas ou utilizadas para o estudo das enzimas purificadas.

Em outra cromatografia, após a aplicação do Material 2 em Resource ETH (equilibrada no mesmo tampão acima), passaram-se 10ml do tampão de alta força iônica pela coluna, com um fluxo de 0,5ml/min, após o que seguiu-se um gradiente e uma lavagem nos moldes anteriores (fluxo de 0,8ml/min).

Foram também realizadas corridas nas quais o Material 2 foi saturado com acetato de sódio. Tal material foi aplicado em Resource ETH (Pharmacia) ligada a um sistema FPLC e equilibrada com tampão MES 50mM, 5mM CaCl₂, CMC 0,5% (p/v) e 5M acetato de sódio. A coluna foi lavada com 5ml desse tampão e eluída com um gradiente (20ml) 5-0M de acetato de sódio, e 5ml de tampão sem acetato. Usou-se um fluxo de 0,8ml/min. Em uma das corridas com acetato de sódio no tampão utilizou-se um gradiente de 30ml com o mesmo fluxo.

Posteriormente, o material LIQ2 foi ressaturado com NaCl, sendo reaplicado na coluna Resource ETH, e cromatografado nas mesmas condições da primeira cromatografia do Material 2 nesta coluna (ver texto acima, início deste item, 2.18).

O ressuspendido da precipitação com etanol do filtrado do Material 2 (ver itens 2.24. e 2.25.) foi aplicado em duas condições na coluna Resource ETH. Primeiramente, a amostra foi saturada com NaCl e aplicada nos mesmos moldes da cromatografia do Material 2; secundariamente, a amostra foi saturada com NaH_2PO_4 e aplicado nesta coluna equilibrada com um tampão MES 50mM com CaCl_2 5mM, CMC 0,5% (p/v) e NaH_2PO_4 2,22M. A coluna foi lavada então com 5ml deste tampão, seguindo-se um gradiente (20ml) de NaH_2PO_4 de 2,22-0 M e uma lavagem (5ml) com tampão MES 50mM CaCl_2 5mM e CMC 0,5% (p/v). Os outros parâmetros seguiram as condições das cromatografias anteriores.

2.19. Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (FPLC, Pharmacia) do Material 2.

O Material 2 foi saturado com NaCl e aplicado em uma coluna Resource PHE (Pharmacia) ligada a um sistema FPLC (Pharmacia) e equilibrada com o mesmo tampão inicialmente usado no item 2.16 (Metil Sepharose). Seguiu-se um procedimento idêntico ao primeiro método do item anterior (2.18.; Resource ETH).

2.20. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (FPLC, Pharmacia) do Material CEL e do Material 2.

O material com atividade sobre laminarina, liquenana e CMC e denominado CEL, obtido como descrito no item 2.18, ou o Material 2, obtido como descrito no item 2.16, foi passado para tampão EPPS 20mM pH 8,0 com CaCl_2 5mM e CMC 0,5% (p/v) utilizando uma coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, item 2.23). O

material resultante foi então aplicado em uma coluna Resource Q (Pharmacia) ligada a um sistema FPLC e equilibrada com o mesmo tampão. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 5ml do tampão inicial, aplicando-se então um gradiente de 0-1M de NaCl (20ml) e uma lavagem com 5ml do tampão final (1M NaCl).

2.21. Eletroforese em cilindros de gel de poliacrilamida na presença de SDS.

O material CEL (cerca de 15ml), reunido após a cromatografia do Material 2 em Resource ETH (FPLC) foi dessalinizado através de sucessivas diluições e concentrações por centrifugação em membrana AMICON, sendo posteriormente concentrado até atingir um volume de cerca de 1ml. Combinou-se ao concentrado, na proporção 2:1 (amostra:tampão) um tampão Tris HCl 1,5M pH 6,8 contendo glicerol 30% (v/v), SDS 6% (p/v) e azul de bromomofenol 0,365% (p/v). Cerca de 250 µl deste combinado foram aplicados em um sistema eletroforético bifásico cilíndrico (no gel de separação, acrilamida 7,5% (p/v); no gel de empilhamento, acrilamida 4% (p/v), SDS 0,1% (p/v) em ambos). A composição dos géis de empilhamento e separação, como também do tampão de corrida, segue o protocolo original de Laemli (1970). Foram fixos o comprimento do gel de separação (18 cm) e o volume do gel de empilhamento (250 µl), sendo o diâmetro interno do cilindro 6mm. Após a aplicação da amostra, submeteu-se o sistema a uma corrente elétrica constante de 1,5-2 mA por cilindro, mantendo-se o sistema a 4°C. Após cerca de 14 horas de corrida, observa-se a saída da linha de frente (azul de bromofenol) do gel, sendo o sistema desligado uma hora depois.

Os géis são retirados do cilindro, sendo incubados durante três horas em citrato 20mM pH 6,0, com agitação e trocas de tampão a cada 30 min., sendo então fracionados em um fracionador de géis mecânico (Autogeldivider, Savant

Instruments, USA). Coletaram-se frações de cerca de 250 µl cada. Estas, após passarem pelo menos três horas a 4°C para eluição das proteínas dos grãos de poliacrilamida, tiveram alíquotas retiradas para ensaios enzimáticos. As frações contendo atividade β -glucanásica foram reunidas sob os nomes CEL1 e CEL2.

Em outro experimento, o ressuspenso da precipitação com etanol do filtrado do Material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose (ver itens 2.24 e 2.25) foi combinado a um tampão de amostra e submetido a uma eletroforese nos moldes expostos acima.

2.22. Cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12 (FPLC, Pharmacia) das frações CEL1 e CEL2 obtidas após eletroforese.

Utilizaram-se sequencialmente quatro estratégias para o aproveitamento das frações dos materiais CEL1 e CEL2, de forma a contornar o problema da presença de grãos de poliacrilamida na amostra – o que teoricamente inviabiliza a sua aplicação em uma coluna Superose 12 ligada a FPLC.

A primeira consistiu no recolhimento, com uma seringa, de pequenos volumes no sobrenadante de cada fração de interesse. Em um segundo experimento pretendendo aumentar a recuperação do material eluído, as frações obtidas após a eletroforese foram imediatamente diluídas com 1ml de citrato 20mM pH 6,0, sendo, após sua eluição e ensaio de atividade, filtradas através de lã de vidro em um funil e recolhidas em uma proveta. O filtrado (cerca de 100ml) foi concentrado por centrifugação em uma membrana AMICON (ver item 2.24) até cerca de 500µl, sendo então aplicado na cromatografia de filtração em gel.

Posteriormente adotou-se a filtração sem diluição das frações da eletroforese, após a eluição e ensaio. Coletou-se estas uma a uma em uma seringa, sendo então passadas com o auxílio de um filtro de amostras por uma membrana de PVDF (poro

0,45 μ m, 13 mm de diâmetro; Durapore, Millipore, USA). O material filtrado de cada fração foi sendo coletado em um tubo de ensaio e, totalizando 500 μ l, aplicado em Superose 12.

A última estratégia adotada foi a simples reunião das frações ativas da eletroforese em um béquer de 10ml com uma pipeta Pasteur. Desta maneira, pôde-se recolher com uma seringa um volume do sobrenadante consideravelmente maior do que nas frações isoladas. Após aplicar todo o sobrenadante na coluna de filtração em gel com a seringa (cerca de dez corridas), a ponta da seringa foi retirada e mistura de grãos de poliacrilamida foi recolhida, sendo (recolocando-se a agulha) então aplicada e cromatografada. Os grãos de poliacrilamida são retidos pelo filtro da coluna, formando uma camada de gel acima deste que deve ser retirada após a realização das corridas. O filtro da coluna é então retirado, lavado e recolocado (ou trocado, se for o caso), para a realização de um novo ciclo de corridas. Ressalta-se aqui que a pressão do sistema aumenta consideravelmente com o acúmulo de poliacrilamida no topo da coluna – as últimas corridas de cada série (aplicações de CEL1 ou de CEL2), desta forma, foram realizadas com um fluxo menor do que o normal (0,3 ml/min). Este procedimento foi adotado separadamente para CEL1 e CEL2; a aplicação de cada material envolve a realização de uma série de dez a doze corridas, em média, sendo que nas duas últimas é aplicada a mistura de grãos de poliacrilamida.

A coluna Superose 12 (FPLC, Pharmacia) foi equilibrada com tampão citrato 100mM pH 6,0. Após a aplicação de uma amostra de 500 μ l, eluiu-se esta coluna com 25 ml de tampão (fluxo de 0,5 ml/min), recolhendo-se frações para ensaios enzimáticos. As frações com atividade β -glucanásica, nas duas séries de corrida, foram recolhidas para o estudo das propriedades de CEL1 e CEL2.

2.23. Trocas de tampão em coluna Hitrap Desalting (Pharmacia).

Em algumas ocasiões, para retirada de sal ou troca de tampão da amostra, utilizou-se uma coluna de filtração em gel (HiTrap Desalting, Pharmacia) da maneira a seguir: 1,5 ml do material de interesse (em casos de amostras menores, estas são diluídas até atingir este volume) é aplicado em uma coluna HiTrap Desalting equilibrada em água (ou tampão para o qual se deseja transferir a amostra). Após a aplicação são passados 2ml de água (ou tampão), os quais são coletados. A seguir a coluna é lavada e reequilibrada com tampão ou água, para a realização de outra corrida, ou lavada com etanol 20% (v/v), solução na qual é guardada.

2.24. Concentração de diversos materiais por centrifugação em membranas AMICON.

Sendo necessária a redução do volume de uma amostra (caso dos Materiais 2 e CEL, e dos filtrados após diluição de CEL1 e CEL2), esta foi submetida a centrifugação em um sistema de concentração Centriplus modelo 4411 10 (verde) (AMICON, USA; corte aproximado de 12.500 daltons) em ciclos de duas horas a 2500g. Sendo necessária a dessalinização da amostra (caso do material CEL), os ciclos de concentração foram seguidos da diluição do material com água, e depois reconcentrados, até que a concentração salina fosse da ordem de 5 mM.

Sendo necessária a concentração de volumes pequenos, a amostra foi concentrada de forma similar em um sistema Microcon modelo 42406 10 (verde) (AMICON, USA; corte aproximado de 12.500 daltons), sendo centrifugada a 12.000g até atingir o volume desejado.

2.25. Precipitação com etanol 80% (v/v) do filtrado obtido na concentração do Material 2.

Da concentração do Material 2 por centrifugação em membrana AMICON resultam dois materiais: o concentrado, na parte superior da membrana, e o filtrado, na parte inferior do sistema (tubo coletor) correspondente a materiais de menor peso molecular que a atravessam. Este material foi recolhido e misturado com etanol de forma que a concentração deste atingisse o valor 80% (v/v); a mistura foi incubada por uma hora no gelo, após o qual foi centrifugada por 30 min. a 10.000g. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado obtido foi ressuspensionado em água e ensaiado. Parte desse material foi aplicado em uma cromatografia em uma coluna Resource ETH (Pharmacia, FPLC - gradiente de NaCl; item 2.18.) e parte em uma eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida com SDS (item 2.21.).

Em outra situação, o material ressuspensionado após o primeiro ciclo de precipitação foi submetido a mais dois ciclos de precipitação com etanol. O precipitado final foi então ressuspensionado em água, sendo aplicado em uma cromatografia em coluna Resource ETH (Pharmacia, FPLC – gradiente de NaH_2PO_4 , ver item 2.18) e submetido a uma eletroforese em cilindro de poliacrilamida em condições nativas (item 2.26).

2.26. Eletroforese em cilindros de poliacrilamida em condições nativas do ressuspensionado final da precipitação com etanol do filtrado do Material 2.

O ressuspensionado final da precipitação com etanol do filtrado do Material 2 foi combinado com um tampão Tris-HCl 1,5M pH 6,8 contendo 30% (v/v) glicerol e azul de bromofenol 0,375% (p/v), na proporção 2:1 (amostra:tampão). 250µl desta mistura foram então aplicadas em um sistema eletroforético bifásico cilíndrico em géis de poliacrilamida.

Os géis de empilhamento (T=4%; C=2,67%) e separação (T=17,5%; C=2,67%) foram polimerizados respectivamente nos tampões Tris-HCl 125 mM pH 6,8 e Tris-HCl 375 mM pH 8,8, usando TEMED (0,1% e 0,05%, p/v) e persulfato de amônio (0,05%, p/v) como catalizador e inicializador da reação de polimerização. Para a corrida usou-se um tampão Tris (25mM) -Glicina (192mM) pH 8,3. Utilizou-se um gel de separação de 18cm de comprimento, e um gel de empilhamento de volume 250µl, sendo 6mm o diâmetro interno do cilindro. Cada cilindro foi submetido a uma amperagem constante de 2mA, até que a linha de frente (correspondente à migração do azul de bromofenol) chegasse ao fim do gel de separação.

Após a corrida os géis foram retirados do cilindro e incubados em tampão citrato 20mM por três horas, com trocas de tampão a cada 30 minutos, sendo então fracionados em um fracionador mecânico de géis de poliacrilamida (Autogeldivider, Savant Microsystems, USA). Foram recolhidas frações de cerca de 250 µl cada, as quais foram guardadas a 4°C por três horas para eluição das proteínas dos grãos de gel, sendo então retiradas aliquotas para ensaios enzimáticos.

2.27. Eletroforese em placas de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e coloração com prata.

Amostras a serem aplicadas em SDS-PAGE em placas (para coloração com prata), foram dessalinizadas (geralmente passando o material para água em HiTrap Desalting) liofilizadas e suspensas em tampão de amostra contendo tampão Tris-HCl 60mM, SDS 2,5% (p/v), β-mercaptoetanol 0,36mM, EDTA 0,5mM, glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v), sendo as amostras posteriormente aquecidas durante 4 minutos a 95°C. Foram confeccionados géis de poliacrilamida de 7,5% a 20% (p/v), contendo 0,1% (p/v) de SDS (Laemli, 1970).

As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de $0,2\text{mA}/\text{cm}^2$ e coradas com um kit de coloração com prata para géis de poliacrilamida ou agarose da BioRad - USA (Silver Stain Plus).

Valores de massa molecular relativa foram calculados usando-se o plot de $\log M_r$ contra valores de R_m obtidos com proteínas (padrões) de massa molecular conhecida, na faixa de 14.400 a 97.400 Da (Sigma USA e BioRad USA).

2.28. Estabilidade enzimática em diferentes valores de pH.

16 microlitros de LAM e LIQ1 foram misturados a 64 microlitros de um tampão 200mM de um pH definido. Em dois momentos (imediatamente após a mistura e após 4 horas e 20 minutos de incubação a 30°C), retirou-se uma alíquota do material (40 μl), sendo sua atividade sobre laminarina determinada em pH 6,0 (concentração final de citrato pH 6,0 360mM; concentração final do tampão inicial 16mM).

O material LIQ2 foi passado para citrato 20mM pH 6,0 (HiTrap Desalting). 40 μl desse material foram misturados a 40 μl de um tampão 200mM de determinado valor de pH. Em dois momentos (imediatamente após sua preparação e depois de 4,5 horas de incubação a 30°C) alíquotas desta mistura foram misturadas a tampão citrato pH 6 400mM, de forma a levar o pH desta para este valor, e tiveram sua atividade sobre laminarina determinada.

Os materiais CEL1 e CEL2 foram passados para água (HiTrap Desalting). 90 μl desses materiais foram misturados a 90 μl de um tampão 40mM. Em dois momentos (imediatamente após sua preparação e depois de 4 horas e 14 minutos de incubação a 30°C) alíquotas desta mistura foram misturadas a tampão citrato pH 6 400mM, e tiveram sua atividade sobre liquenana determinada.

Os tampões utilizados foram citrato (pH 4,0 a 6,0), BES (pH 6,5 a 7,5), EPPS (pH 8,0 a 8,5) e TAPS (pH 9,0). Uma mistura de reação sem enzima foi preparada para cada tampão e o pH foi determinado na temperatura de incubação (30°C).

2.29. Determinação do pH ótimo de LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2.

Para determinação do pH ótimo destas enzimas, foram realizados ensaios enzimáticos (quatro tempos) com as seguintes misturas de reação: **LAM**, **LIQ1**, **LIQ2**) 5 µl do material LIQ2, 45 µl de tampão 200mM e 50 µl de liquenana 0,25% (p/v) em água; **CEL1**) 25 µl do material CEL1, 25 µl de água, 50 µl de tampão 200mM e 100 µl de liquenana 0,25% em água (p/v); **CEL2**) 50µl do material CEL2, 50 µl de tampão 200mM e 100µl de liquenana 0,25% (p/v) em água. Utilizaram-se os mesmos tampões do item anterior (2.28). Na faixa de pH 2,5 a 3,5, utilizou-se tampão glicina. Uma mistura de reação sem enzima foi preparada para cada tampão e o pH foi determinado na temperatura de ensaio. Essa providência torna-se necessária uma vez que a temperatura afeta a ionização de determinados grupos. Construíram-se plotes da atividade relativa (porcentagem da atividade máxima) em função do pH.

2.30. Determinação de Km, V_{máx} e K_i para a hidrólise de laminarina, liquenana e carboximetilcelulose pelas enzimas purificadas.

Com o material LAM foram utilizadas concentrações de laminarina de 0,01-4% (p/v); os ensaios foram realizados em tampão citrato 90mM pH 5,0 com NaCl 90mM ou BES 90mM pH 7,0 com NaCl 90mM.

Para o material LIQ1 Foram utilizadas concentrações de laminarina de 0,01-4% (p/v) e de liquenana de 0,025-1% (p/v); os ensaios foram realizados em tampão MES 90mM pH 6,0.

Com o material LIQ2 utilizamos concentrações de laminarina de 0,025-8% (p/v) e de liquenana de 0,05-1% (p/v); os ensaios foram realizados em tampão citrato 10mM pH 6,0.

Para determinação dos parâmetros de CEL1 as concentrações de liquenana foram de 0,025-0,5% (p/v) e de carboximetilcelulose de 0,2-4% (p/v); os ensaios foram realizados em tampão citrato 50mM.

Quando o material CEL2 foi utilizado as concentrações de liquenana eram de 0,1-1% (p/v) e de carboximetilcelulose de 0,2-4% (p/v); os ensaios foram realizados em tampão citrato 50mM pH 6.

Em todos os ensaios quantificou-se o aumento de poder redutor pelo método do ácido dinitrosalicílico (ver item 2.3.). Os valores da constante de Michaelis, da constante de dissociação entre enzima e substrato inibidor (K_i) e da velocidade máxima das amostras foram determinados graficamente (plots manuais; ver Segel, 1975 e Cleland, 1979) e por simulações no software Enzfitter (Leatherbarrow, R.J.; Elsevier-Biosoft, 1987).

Quando havia inibição por altas concentrações de substrato os parâmetros foram estimados supondo o modelo cinético exposto na figura 12 (Cleland, 1979).

Figura 12 – Modelo utilizado para cálculo dos parâmetros cinéticos da hidrólise de laminarina por LAM e LIQ1 (Segel, 1975; Cleland, 1979).

2.31. Determinação do grau de polimerização dos produtos da ação de CEL1 e CEL2 sobre liquenana.

50 µl dos materiais CEL1 e CEL2 foram misturados a 50 µl de liquenana 1% (p/v). Após diferentes tempos de incubação a 30°C, parou-se a reação incubando-se a mistura a 100°C por três minutos. 5-25 µl da mistura de reação foram misturados a 45-25 µl de água, 10 µl de H₂SO₄ 1M e 40 µl de HIO₄ 100mM (Jackson, 1944; Dyer, 1956). Esta mistura foi incubada por duas horas a 30°C, e a reação de oxidação é interrompida com 25µl de NaHSO₃ 10% (p/v)(Frissell et al., 1953). São então adicionados 900µl do reagente ácido cromotrópico (ácido cromotrópico 2mg/ml em H₂SO₄ 10M; MacFadyen, 1945; Boyd and Logan, 1942), e a mistura final é incubada a 100°C por 30 minutos. A variação dos valores de absorbância a 570nm em função do volume de alíquota do ensaio enzimático foi comparada com uma curva padrão construída com soluções de concentrações crescentes de formaldeído, obtendo-se o número de pontas redutoras da solução inicial. Sabendo-se a concentração de carboidrato do material, calculou-se o grau de polimerização médio da liquenana da amostra. Submeteu-se o substrato isolado ao mesmo tipo de análise.

2.32. Cromatografia dos produtos de hidrólise de laminarina, liquenana e carboximetilcelulose por LAM, LIQ1 e CEL2 em camada delgada de sílica.

Os materiais LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2 foram passados para citrato 20mM pH 6,0 (HiTrap Desalting). Se necessário, o material resultante da filtração em gel foi concentrado em uma microconcentrador Microcon modelo 42406-10 (AMICON, USA, corte de 12.500 Daltons). 50 µl dos materiais obtidos foram misturados a 50 µl do substrato (laminarina, liquenana ou carboximetilcelulose) 1% (p/v) em água e incubados a 30°C. O ensaio foi interrompido por incubação a 100°C por três minutos. 10 µl do material final obtido foram aplicados em uma placa de

cromatografia em camada delgada de sílica G de 0,25mm de espessura. A fase móvel usada para separação foi butanol:etanol:água 50/30/20, sendo esta realizada em atmosfera saturada com a fase e ao longo de 15 cm da placa cromatográfica. Os carboidratos presentes foram evidenciados pela técnica do fenol-ácido sulfúrico (Stahl, 1969).

2.33. Ensaio de CEL1 e CEL2 sobre celulose cristalina.

400 µl dos materiais CEL1 ou CEL2 foram misturados a 400µl de uma suspensão de celulose microcristalina (AVICEL®; Merck, Alemanha) 1% (p/v) em água. A celulose foi mantida em suspensão incubando-se a mistura de reação em um agitador orbital a 1000rpm em temperatura ambiente (26°C). A cada 2 horas, retirou-se uma alíquota de 200µl, a qual foi incubada a 100°C por 3 minutos e centrifugada por 5 minutos a 15.000g. Foram retirados do sobrenadante 100µl para determinação da quantidade de glicose e de açúcares redutores.

2.34. Ensaio de lise de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Em cada determinação, 100µl dos materiais LAM ou LIQ1 em citrato 20mM pH 6 foram misturados a 100µl de uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* (10mg/ml) em citrato 50mM pH 6,0, NaF 100mM e NaN₃ 10mM. A mistura foi incubada com agitação (250rpm) a 30°C por um total de quatro dias; interrompeu-se o ensaio a cada 24 horas pela adição de 800µl de tampão Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,5M com SDS 1% (p/v) pH 11, sendo então lida a absorbância da suspensão a 420nm.

3.RESULTADOS

3.1. Ensaio de atividades β -glucanásicas em diferentes insetos

Demos início aos trabalhos determinando os níveis de diferentes atividades β -glucanásicas (ver item 2.3) nos insetos *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Atta rubropilosa* (ver item 2.1), com o objetivo de estabelecer qual destas espécies seria o melhor material biológico para o estudo pretendido. Os valores obtidos encontram-se expostos na tabela 5.

Tabela 5 – Atividades de β -glucanases nas frações solúveis dos tubos digestórios de adultos de *Periplaneta americana* e de larvas de *Tenebrio molitor*, e em homogeneizados de larvas inteiras de *Atta rubropilosa* (ver item 2.2). Os números são mU/animal e (mU/miligrama de proteína), obtidos a partir de 1 preparação de *Atta rubropilosa* (larvas grandes: 3,1 animais/ml e larvas pequenas: 10,8 animais/ml), 1 preparação de *Tenebrio molitor* (20,5 animais/ml) e 3 preparações de *P. americana* (4, 2,3 e 1,8 animais/ml).

Animal	Substrato		
	Laminarina	Liquenana	CMC
<i>Atta rubropilosa</i> (1)	31 (48)	5,4 (2,4)	4,3 (1,9)
<i>P. americana</i>	4.160 (850)	13.320 (2.350)	2.400 (430)
<i>T. molitor</i>	45 (48)	11 (16)	3 (3)

(1) Atividade sobre laminarina só foi encontrada nas larvas pequenas (L2). As outras atividades referem-se às larvas grandes (L1).

Os valores obtidos para *Periplaneta americana* mostraram-se os mais elevados, deixando claro tratar-se da melhor fonte dessas enzimas. Os valores elevados de atividade por indivíduo poderiam dever-se simplesmente ao tamanho, mas os altos valores de atividade específica indicam que estas enzimas estão realmente enriquecidas na fração solúvel do tubo digestório do animal. Embora os números correspondentes a *Atta rubropilosa* sejam referentes ao corpo inteiro dos insetos (fato que provavelmente leva à obtenção de valores de atividade específica baixos¹), os números de *T. molitor* correspondem ao tubo digestório isolado – o que torna a comparação direta destes valores de atividade específica com os valores de *P. americana* válida. Dada a maior presença de β -glucanases no tubo digestivo de *P.americana*, concentramos nossos esforços no estudo das enzimas deste animal.

¹ Assim sendo, em um ensaio da fração solúvel do tubo digestivo das larvas esperaríamos valores de atividade específica mais altos – provavelmente maiores do que os encontrados para *T. molitor*.

3.2. Estabilidade das β -glucanases de *P. americana* às proteinases do material.

Antes de proceder a tentativas de purificação das formas enzimáticas de interesse, estimou-se a necessidade de utilização de inibidores de proteases na preparação inicial, através do ensaio deste material antes e após uma incubação de treze horas a 4°C, na ausência e na presença de diversos inativadores / inibidores clássicos de proteinases (ver Material e Métodos 2.6). Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 6 – Atividades relativas sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose na fração solúvel de *P. americana* antes e após incubação, na presença ou ausência de inibidores de proteinases (1).

CONDIÇÃO	SUBSTRATO		
	LAMINARINA	LIQUENANA	CMC
Atividade Inicial (%)	100	100	100
Incubado com inibidores / inativadores	71	108	104
Incubado sem inibidores / inativadores	75	121	174

(1) – As substâncias utilizadas foram TLCK, TPCK, pHMB, Pepstatina A, DAN, EDTA; ver Materiais e Métodos 2.6. A incubação foi realizada por 13h a 4°C.

Os resultados acima deixam claro que as atividades sobre liquenana e carboximetilcelulose não são alvo de nenhum ataque proteolítico ao longo do tempo de incubação considerado. Consideramo-as, assim, resistentes às proteases digestivas do animal. A perda de atividade sobre laminarina parece ser independente da inativação das proteinases no ensaio. O conjunto de resultados acima nos levou a desconsiderar a adição de inibidores de protease durante a purificação das enzimas de *P. americana*.

3.3. Ensaio enzimáticos no alimento (*Hordeum vulgare*) de *Periplaneta americana*

Foram ensaiadas atividades enzimáticas no homogeneizado (sobrenadante final, ver item 2.2) das sementes de *Hordeum vulgare* sobre seis substratos: laminarina, carboximetilcelulose, liquenana, amido solúvel, para-nitrofenil- α -glicosídeo e para-nitrofenil- β -glicosídeo. Os valores de atividade observados em 1 grama desse material (que corresponde ao peso de 1 *P. americana*), como também seus correspondentes no homogeneizado do tubo digestório de *P. americana*, estão relacionados na tabela a seguir:

Tabela 7 – Valores de atividade enzimática nos homogeneizados de *Hordeum vulgare* e *Periplaneta americana*. mU/grama – miliUnidades por grama de aveia fresca. mU/mg – miliUnidades por miligrama de proteína no homogeneizado.

Substrato	<i>Hordeum vulgare</i>		<i>Periplaneta americana</i>	
	mU/grama	mU/mg prot	mU/animal	mU/mg prot
pNØ α -glicosídeo	265,3	213	18830	3203
pNØ β -glicosídeo	0	0	3918	666
amido solúvel	3449	2770	66319	11280
laminarina	0	0	1550	264
liquenana	544	443	4033	686
CMC	0	0	291	50

Os dados obtidos são indicativos de que a atividade sobre β -glucanas de *P. americana* não provêm majoritariamente do alimento ingerido.

3.4. Ponto isoelétrico.

Passamos à caracterização inicial da atividade presente na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. Primeiramente, determinou-se o ponto isoelétrico das β -glucanases presentes no material, através de uma focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (ver item 2.5), na qual obteve-se o resultado exposto na figura 13. Tal experimento foi realizado pois, de posse do ponto isoelétrico de uma enzima, podem-se planejar condições ideais para separação e purificação desta através de cromatografias de troca iônica.

Figura 13 – Determinação do ponto isoelétrico de laminarinases e liquenases do homogeneizado do tubo digestório de *P. americana* por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (ver Materiais e Métodos 2.5). LAM – atividade sobre laminarina; LIQ – atividade sobre liquenana.

Observa-se que a atividade sobre laminarina apresenta um ponto isoelétrico em torno de 4,5, enquanto a atividade sobre liquenana divide-se em no mínimo duas regiões, uma região majoritária com ponto isoelétrico semelhante ao da atividade sobre laminarina e outra constituindo-se num ombro à direita do pico majoritário cujo ponto isoelétrico se estende até pelo menos 5,5. Assim sendo, adotamos como condição ideal para a realização de uma cromatografia líquida de troca iônica em coluna catiônica um pH igual ou superior a 6,5 e, para a realização de cromatografia líquida de troca iônica em coluna aniônica, um pH igual ou inferior a 3,5. A cromatografia em coluna catiônica apresenta-se, a partir deste resultado, como uma técnica mais promissora, dada a sua realização em condições mais amenas.

3.5. Purificação das β -glucanases de *P.americana*.

3.5.1. Tentativas iniciais de purificação das β -glucanases da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Procurou-se de início um primeiro passo de purificação que propiciasse a limpeza rápida da fração solúvel inicial. Esta apresenta uma quantidade considerável de pigmentos e de lipídios que inviabiliza sua aplicação direta em técnicas de alta resolução como FPLC (por causar danos às colunas cromatográficas). Além disso, dado o objetivo de futuramente sequenciar e cristalizar estas enzimas, estávamos interessados nos melhores rendimentos possíveis em massa e recuperação de atividade sobre β -glucanas. Assim sendo, submetemos a fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* às seguintes técnicas de separação de proteínas: fracionamento com etanol, precipitação com liquenana, cromatografia líquida de afinidade em colunas de liquenana e de alfa-celulose, eletroforese em cilindro de poliacrilamida e cromatografias líquidas em colunas de troca iônica (EconoPacHighQ, Bio Rad, USA) ou de interação hidrofóbica (Metil Sepharose, BioRad, USA) em sistema de baixa pressão (EconoSystem, Bio Rad, USA). Os resultados obtidos em cada uma destas técnicas estão expostos nas tabelas 8 a 12 e nas figuras 14 a 17.

Tabela 8 – Recuperações da atividade sobre laminarina da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* após precipitação com laminarina e lavagem com etanol. (ver Material e Métodos 2.7).

Material	mU/ μ l	μ g/ μ l	mU/ μ g	mU total	μ g total	Recuperação (%)	Enriquecimento (x)
fração solúvel	1,78	10,4	0,171	356	2080	100	1
Sob80% etanol	0	0,045	0	0	45	0	0
Sob60% etanol	0,159	0,495	0,321	159	495	44,7	1,88
Sob40% etanol	0,039	0,374	0,105	39,3	374	11	0,61
Sob20%etanol	0	0,016	0	0	16	0	0
Sob0% etanol	0	0,074	0	0	74	0	0
TOTAL				198,3	1004	55,7	

Tabela 9 – Atividade sobre liquenana nas frações obtidas lavando-se com etanol o material do tubo digestório de *P. americana* adsorvido à laminarina (ver Material e Métodos 2.7).

Material	mU/ μ l	μ g/ μ l	mU/ μ g	mU total	μ g total	Recuperação (%)	Enriquecimento (x)
Fração solúvel	5,11	10,4	0,491	1022	2080	100	1
Sob80% etanol	0	0,045	0	0	45	0	0
Sob60% etanol	0,907	0,495	1,832	907	495	88,7	3,7
Sob40% etanol	0,050	0,374	0,134	50	374	4,9	0,3
Sob20% etanol	0,006	0,016	0,375	6	16	0,6	0,8
Sob0% etanol	0	0,074	0	0	74	0	0
TOTAL				963	1004	94,2	

Tabela 10 – Atividades sobre laminarina e liquenana nos diferentes materiais recuperados após precipitação com liquenana da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. Ver Material e Métodos 2.8.1. n.d. – não determinado.

	SUBSTRATO					
	LAMINARINA			LIQUENANA		
Fração	mU	mU/ μ g	Enriquecimento	mU	mU/ μ g	Enriquecimento
FRAÇÃO SOLÚVEL	87	0,104	1x	54	0,491	1x
SOBRENADANTE	84	0,230	2,2x	20	0,055	0,11x
L1 (CP6)	20	2,188	21x	9,9	1,083	2,21x
L2 (ET60%)	16,6	1,414	13,6x	6,7	0,571	1,16x
L3 (ET60%)	5,1	0,313	3x	1,1	0,067	0,14x
L4 (ET60%)	2,2	0,135	1,3x	3,6	0,221	0,45x
L5 (CP6 + NaCl 1M)	10	n.d.	n.d.	20,8	n.d.	n.d.

Tabela 11 –Recuperações e enriquecimentos da atividade sobre laminarina e liquenana da fração solúvel de *P. americana* após precipitação com liquenana e ressuspensão com NaCl 1M. Ver Material e Métodos 2.8.2.

	SUBSTRATO					
	LAMINARINA			LIQUENANA		
fração	mU	mU/ μ g	Enriquecimento	mU	mU/ μ g	Enriquecimento
Fração solúvel	72,5	0,320	1x	27,45	0,352	1x
Sobrenadante	30	0,275	0,86x	21	0,192	0,55x
Ressuspendido (NaCl 1M)	8,3	1,444	4,5x	22	3,826	10,87x

Tabela 12 – Atividades sobre laminarina e liquenana nos diferentes materiais recuperados após precipitação com liquenana da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* e ressuspensões seriadas com tampão de baixa força iônica e pH 8,0, para aplicação em cromatografia de troca iônica. Ver Material e Métodos 2.8.3.

fração	SUBSTRATO					
	LAMINARINA			LIQUENANA		
	mU	mU/ μ g	Enriquecimento	mU	mU/ μ g	Enriquecimento
Fração solúvel	125,5	0,214	1x	325,5	0,554	1x
Sobrenadante	37	0,077	0,36x	175	0,364	0,66x
L1	18,7	0,603	2,82x	89	2,871	5,18x
L2	9	1,034	4,84	60	6,897	12,45x
L3	4,4	11,00	51,50	18	41,86	75,6x

Figura 14- Perfis de atividade sobre laminarina, liquenana e CMC em diversas cromatografias em coluna de liquenana da fração solúvel do tubo digestório de *P.americana*. Ver item 2.9 de Material e Métodos.

Figura 15 – Perfis de atividade sobre laminarina, liquenana, CMC, celobiose e amido em cromatografias em coluna de α -celulose ligada a sistema de baixa pressão (esquerda) ou bomba peristáltica simples (direita). Material utilizado: fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. Ver item 2.10 de Material e Métodos

Figura 16 – Perfis de atividade sobre laminarina e liquenana em cromatografia de troca iônica em coluna EcocoPackHiQ (BioRad, USA) ligada a sistema cromatográfico de baixa pressão (EconoSystem, BioRad, USA, esquerda) e em eletroforese em cilindro de poliacrilamida da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* (direita). ver itens 2.11 e 2.12 de Material e Métodos.

Figura 17 – Perfis de atividade sobre laminarina e liquenana em duas cromatografias de interação hidrofóbica em coluna MetilSepharose (BioRad, USA) ligada a sistema cromatográfico de baixa pressão (EconoSystem) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*, após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ver item 2.13 de Material e Métodos.

A coluna de liquenana (cujos resultados estão apresentados na figura 14), em algumas cromatografias mostrou bom enriquecimento da atividade retida na coluna (2 bandas em SDS-PAGE, dados não apresentados). Contudo, a matriz mostra grande resistência ao fluxo do tampão usado nas cromatografias. Além disso, as enzimas ligadas são eluídas na forma de uma arraste, e não de um pico, o que leva ao recolhimento de um volume muito grande de material eluído e a um tempo de duração muito longo para cada cromatografia (3 a 4 horas). Tais fatores, aliados ao custo da resina, que não pode ser reutilizada, e a irregularidade dos resultados obtidos (comparar as duas corridas realizadas em colunas recém-empacotadas na figura 14), colaboraram para o abandono desta técnica. A coluna de celulose, quando ligada a uma bomba peristáltica simples, apresenta o mesmo tipo de eluição que a coluna de liquenana (ver Figura 15). Quando ligada a um sistema cromatográfico de baixa pressão, retém uma pequena parcela da atividade total do material, mostrando-se, além disso, inespecífica. Foi também abandonada como passo inicial de purificação.

As outras técnicas testadas foram comparadas entre si de acordo com a recuperação e o enriquecimento das atividades sobre laminarina e liquenana em relação à atividade presente na fração solúvel inicial (ver tabela 13).

Tabela 13 – Recuperações e enriquecimentos das atividades sobre laminarina e liquenana submetidas a diferentes técnicas de purificação, em relação à atividade presente na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. n.c. – parâmetro não calculado.

Tratamento	Substrato			
	Laminarina		Liquenana	
	recuperação (%)	enriquecimento (vezes)	recuperação (%)	enriquecimento (vezes)
Precipitação com etanol	45	1,9	8,9	3,7
Precipitação com liquenana (2.8.3)	26	10	51	15
Precipitação com liquenana (2.8.2)	11	4,5	80	11
Precipitação com liquenana (2.8.1)	51	15	31	1,8
Eletroforese em cilindro	46	n.c.	37	n.c.
Troca iônica (EconoPackHighQ)	28	n.c.	14	n.c.
Metil Sepharose	8,4	n.c.	3,3	n.c.

De todas as técnicas testadas, nenhuma apresentou valores altos de recuperação para os dois tipos de atividade enzimática. Na eletroforese em cilindro as atividades de interesse são recuperadas em um número muito grande de frações, observando-se uma separação inicial em diversos picos - o que não é interessante para um passo inicial de uma marcha de purificação para as várias enzimas que tínhamos intenção de purificar.

Do conjunto de técnicas consideradas, a precipitação com liquenana (2.8.3) e a cromatografia em Metil Sepharose mostraram-se as mais adequadas como passo inicial de uma possível marcha de purificação. A precipitação com liquenana apresentou um bom enriquecimento das duas atividades. A preferência da separação em Metil Sepharose sobre a realizada em Econo Pack HiQ se deu com base nos perfis de proteína das duas cromatografias (ver figura 18): apesar de mostrar uma recuperação muito baixa das duas atividades, a cromatografia em Metil Sepharose aparentemente enriquece muito mais as enzimas de

interesse, e as atividades sobre laminarina, liquenana e CMC são eluídas no mesmo conjunto de frações (frações 17 a 30 da figura 17b).

Figura 18 – Perfis de proteína (Abs.280nm) em cromatografias em sistema de baixa pressão (EconoSistem, BioRad, USA) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. a) cromatografia de troca iônica em coluna Econo Pack HiQ da figura 16; b) cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Metil Sepharose da figura 17b. Nos dois perfis, a escala inicial de detecção é de 100%=2 unidades de Absorbância. Na cromatografia a), no momento indicado pela seta, aumentou-se a sensibilidade de detecção, tendo-se 100%=1 Unidade de Absorbância.

3.5.2. Purificação das liquenases e laminarinase presente na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Levando-se em conta as considerações feitas no item anterior, optou-se por dar prosseguimento à marcha de purificação a partir do material obtido pela precipitação com liquenana ou a partir das frações ativas da cromatografia em Metil Sepharose. Nesta cromatografia (ver figura 17b), as frações ativas, eluídas no fim do gradiente salino e após o término deste, foram divididas em dois grupos: frações 18 a 25 (Material A) e frações 27 a 30 (Material B; ver figura 17). Três materiais distintos (lavado da precipitação com liquenana, Material A ou Material B) foram aplicados em cromatografia de troca iônica em coluna

MonoQ ligada a um sistema FPLC (ver Material e Métodos 2.15), obtendo-se os resultados apresentados na figura 19.

Figura 19 – Cromatografias de troca iônica em coluna MonoQ ligada a sistema FPLC (Pharmacia, Suécia, ver Material e Métodos 2.15) do material obtido após precipitação com liquenana (ver Material e Métodos 2.8.3, parte superior) ou cromatografia de interação hidrofóbica (materiais A e B; ver Material e Métodos 2.13) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

O resultado da cromatografia de troca iônica (MonoQ) do material obtido após a precipitação da fração solúvel por liquenana deixa clara a existência de pelo menos cinco β -glucanases distintas no material inicial: três enzimas responsáveis pela hidrólise exclusiva de liquenana, uma enzima capaz de clivar preferencialmente laminarina e duas enzimas capazes de clivar os dois polímeros com eficiências parecidas. Os cinco picos desta cromatografia foram recolhidos separadamente (pico 1, frações 33 a 36; pico 2, frações 40 a 42; pico 3, frações 45-47; pico 4, frações 50-52; pico 5, frações 56-59, pico 6, frações 67-68) e aplicados

em SDS-PAGE, o que demonstrou que apenas a enzima capaz de clivar preferencialmente laminarina encontrava-se pura (massa molecular relativa = 64.000). Considerando a atividade de todas as enzimas do perfil da cromatografia calculou-se uma recuperação total de 15% das atividades β -glucanásicas em relação à fração solúvel inicial. O baixo valor de recuperação, a má resolução das formas capazes de clivar apenas liquenana e o fato de que apenas uma das enzimas de interesse se encontrava pura fizeram com que esta marcha fosse deixada de lado.

A aplicação em SDS-PAGE dos picos obtidos nas cromatografias de troca iônica dos Materiais A e B obtidos após cromatografia em Metil Sepharose revelou que estas duas enzimas se encontravam puras. Denominou-se a enzima capaz de clivar os dois substratos (laminarina e liquenana) de LIQ ($M_r=34.400$) e a enzima capaz de clivar exclusivamente laminarina de LAM ($M_r=56.300$). Esta última aparentemente corresponde à atividade purificada na cromatografia de troca iônica do material proveniente da precipitação com liquenana da fração solúvel, apesar da variação na determinação de peso molecular relativo.

Apesar de propiciar a purificação de duas enzimas, responsáveis pela quase totalidade da atividade laminarinásica da fração solúvel, esta marcha também foi deixada de lado, por resultar na total inativação das formas enzimáticas ativas apenas sobre liquenana. Estas formas haviam sido anteriormente evidenciadas na cromatografia de troca iônica do material proveniente da precipitação com liquenana e na eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida da fração solúvel inicial (ver figuras 19 e 16).

Antes de investir na procura por um segundo passo de purificação que gerasse melhores resultados do que os expostos acima, procurou-se melhorar o rendimento (em termos de recuperação) das técnicas de purificação inicial já testadas. Das duas mais promissoras, a que oferecia mais possibilidades de remodelagem era a cromatografia de interação hidrofóbica em Metil Sepharose, dado que na precipitação com liquenana uma grande variedade de soluções de ressuspensão (baixa força iônica, alta força iônica, alta

concentração de álcool, pH alcalino) já havia sido testada sem a obtenção de resultados mais expressivos.

Seis fatores foram levantados como possíveis responsáveis pela perda de atividade das β -glucanases na cromatografia em Metil Sepharose: 1) Proteinases presentes na fração solúvel, 2) Alta força iônica do tampão inicial, 3) Amônia ou 4) Metais pesados presentes em uma solução concentrada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5) Separação de componentes de um sistema multi-enzimático sinérgico e 6) Mudanças conformacionais nas enzimas ao longo da cromatografia, relacionadas à interação ou dissociação delas com a matriz.

A inativação por proteinases parece-nos improvável, dado o resultado exposto em 3.2, que mostrava a não alteração da atividade enzimática na presença de inibidores de protease. Para testar a hipótese de estarmos separando componentes de um sistema multi-enzimático sinérgico, realizou-se uma cromatografia semelhante à da figura 16, mas sem a precipitação prévia com 1,7M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ver Material e Métodos 2.14), e, após o ensaio das frações, alíquotas de 10 μl de cada fração foram reunidas e o produto ensaiado. O ensaio das frações da cromatografia revelou valores de recuperação de 13,3% (atividade sobre laminarina) e 1,7% (atividade sobre liquenana) – já o ensaio da mistura das alíquotas de cada fração revelou a perda completa da atividade sobre laminarina e a recuperação de 0,14% da atividade inicial sobre liquenana.

O resultado em si deixa claro que o principal fenômeno envolvido na perda de atividade destas enzimas não é a perda de sinergismo. A perda de atividade ao longo do tempo (ou seja, no segundo ensaio) é indicativa de que a inativação das enzimas está relacionada à exposição a condições drásticas durante e após a cromatografia. Foi feita, então, uma cromatografia aonde apenas trocou-se, após a lavagem da coluna, o tampão inicial por outro sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obtendo-se recuperações de 16% (atividade sobre laminarina) e 6% (atividade sobre liquenana). Imaginamos que esta elevação nos valores de atividade recuperada esteja relacionada a uma exposição mais curta a altas concentrações deste sal.

Assim sendo, optou-se por substituir o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por NaCl (2-0M) na confecção do gradiente salino desta cromatografia. Neste caso, estaríamos observando o efeito da retirada de nucleófilos (amônia) e metais pesados do tampão de alta força iônica – que parecem em parte estar relacionados à inativação, dada a elevação observada nos valores de recuperação obtidos (58% para a atividade sobre laminarina e 12,9% para a atividade sobre liquenana) ao usar-se um gradiente de 2-0M de NaCl na cromatografia.

Testamos a seguir a influência da presença de possíveis agentes estabilizantes, como cátions divalentes e trealose durante a cromatografia de interação hidrofóbica. Cálcio e Magnésio apresentaram os melhores resultados (ver tabela 14). Dada a dificuldade de preparação dos tampões cromatográficos com Magnésio (devido à precipitação de seu hidróxido), optamos pela utilização do Cálcio. É preciso ressaltar que nesta série de testes usou-se uma concentração maior de NaCl (5-0M), de forma a obter uma interação mais efetiva entre as enzimas e a matriz da coluna. Assim sendo, consideraram-se satisfatórios os valores de recuperação de 50% (atividade sobre laminarina) e 17% (atividade sobre liquenana), obtidos quando se adiciona NaCl.

Tentando amenizar a possível ocorrência de alterações conformacionais danosas durante a cromatografia, imaginou-se que a adição de um substrato ou de um inibidor competitivo das enzimas de interesse no meio cromatográfico poderia resultar em um aumento da recuperação. Este aumento ocorreria por estes compostos ajudarem a molécula a voltar ao seu estado de conformação original durante as transições entre os estados conformacionais ligado ou não-ligado à matriz da coluna. De fato, adicionando-se CMC aos tampões da cromatografia, obtiveram-se valores de recuperação da ordem de 100%, sendo esta técnica, nestes moldes, adotada, daqui em diante, como passo inicial da marcha de purificação das β -glucanases de *P. americana*. Os resultados referentes à sequência de testes realizada estão resumidos na tabela 14; o perfil de atividade da cromatografia realizada com

NaCl, CaCl_2 e CMC encontra-se na figura 20. Desta cromatografia, recolheram-se os materiais 1 (frações 6 a 10) e 2 (frações 36 a 58).

Tabela 14 – Recuperações de atividade sobre laminarina e liquenana de cromatografias de interação hidrofóbica em Metil Sepharose da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*, em diferentes condições.

Condições da cromatografia		Recuperação (%)	
		Laminarina	Liquenana
Gradiente contínuo	1,7-0M / 0,7-0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,4	3,3
	0,7-0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13	1,7
Gradiente descontínuo	2,0-0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16	6
	2,0-0M NaCl	58	13
	5,0-0M NaCl + 10 μM MnCl_2	37	22
	5,0-0M NaCl + 5mM MgCl_2	51	19
	5,0-0M NaCl + 5mM ZnCl_2	30	13
	5,0-0M NaCl + 5mM trealose	35	13
	5,0-0M NaCl + 5mM CaCl_2	50	17
Gradiente contínuo	5,0-0M NaCl + 5mM CaCl_2 + 0,5% CMC	127	98

Figura 20 – Perfil das atividades sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose nas frações da cromatografia de interação hidrofóbica em Metil Sepharose (BioRad) da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*, em presença de CaCl_2 (5mM) e CMC (0,5%). Ver Material e Métodos 2.16.

Aparentemente, a cromatografia em Metil Sepharose permite a separação de grande parte da atividade β -glucanásica (material 2) da maioria das proteínas presentes na fração solúvel (frações correspondentes ao material 1; ver o perfil de proteína na figura 18. Este se manteve inalterado ao longo das modificações impostas à técnica). Procurou-se, a partir deste ponto, um passo de purificação que permitisse separar as enzimas presentes no material 2 entre si. Foram testadas duas técnicas cromatográficas: troca iônica em coluna MonoQ (FPLC, Pharmacia) e interação hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia).

Contudo, antes de proceder ao exame destas técnicas como segundo passo, foi feito um grande número de cromatografias em Metil Sepharose da fração solúvel inicial. Surpreendentemente, os valores de recuperação das duas atividades (sobre laminarina e liquenana) mostraram-se extremamente variáveis, entre 10 e 800%. Decidiu-se, então, testar a linearidade do ensaio da fração solúvel inicial, realizando ensaios de sua atividade β -glucanásica em diferentes diluições. Obteve-se o resultado exposto na figura 21 e na tabela 15.

Tabela 15 – Valores de atividade enzimática (em mU/ μ l) sobre laminarina, liquenana e CMC estimados a partir de diferentes diluições da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Diluição da fração solúvel	Laminarina	Liquenana	CMC
50x	2,82	1,37	0,53
100x	4,09	3,75	1,52
350x	6,76	19,47	3,49
1225x	6,81	43,4	8,26

Figura 21 – Progressão dos valores de Absorbância ao longo do tempo nos ensaios sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Os resultados expostos acima deixam claro que o ensaio da fração solúvel do tubo digestivo de *P. americana* sobre estes três substratos não é linear. Assim sendo, a partir deste ponto não se deu mais prioridade à recuperação total da atividade β -glucanásica inicial após cada passo de separação, mas sim à obtenção de todas as formas enzimáticas (com diferentes especificidades) evidenciadas na eletroforese da fração solúvel (ver figura 16), como também na cromatografia de troca iônica do material precipitado com liquenana (ver figura 19), em preparações ativas e separadas entre si. Portanto, não foram mais calculados valores de recuperação. Conheciam-se as existências de uma enzima capaz de hidrolisar exclusivamente laminarina, de duas enzimas (uma majoritária e outra minoritária) capazes de hidrolisar laminarina e liquenana com eficiências parecidas, e de cerca de três enzimas responsáveis pela hidrólise preferencial de liquenana.

A primeira tentativa de obtenção destas formas isoladas se deu através da aplicação do Material 2 isolado após cromatografia em Metil Sepharose em uma cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (FPLC, Pharmacia). Para isso o material foi dialisado e colocado em água ou tampão trietanolamina pH 7,0 (ver Material e Métodos 2.17). Adotou-se esta técnica neste momento com o objetivo de combinar a separação e a concentração das enzimas presentes no Material 2 (isolado após cromatografia em Metil Sepharose), obtendo-se os resultados expostos na figura 22.

Figura 22 – Cromatografias de troca iônica em coluna MonoQ do Material 2 isolado após cromatografia em Metil Sepharose (ver Material e Métodos 2.17) passado para água (gráfico superior esquerdo) ou para Trietanolamina (gráfico superior direito e gráficos inferiores). Ensaios sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose.

Na figura 22 estão expostas quatro cromatografias: verifica-se inicialmente que em água grande parte da atividade β -glucanásica não interage com a coluna. Quanto às três cromatografias realizadas a seguir, aonde o material aplicado se encontra em trietanolamina, no que se refere às atividades sobre liquenana e laminarina os resultados são irregulares

(mudança no número e padrão de picos) e não reprodutíveis; e a atividade sobre carboximetilcelulose é completamente perdida. Observa-se também uma diminuição nas atividades sobre laminarina e liquenana. Em face destes resultados, abandonou-se a troca iônica como possível segundo passo na marcha de purificação.

Levando em consideração os bons resultados obtidos com a coluna Metil Sepharose, aplicou-se o Material 2 obtido após essa cromatografia em outra cromatografia de interação hidrofóbica – em coluna Resource ETH (Pharmacia, Suécia) ligada a um sistema FPLC (Pharmacia, Suécia). Este passo apresenta como vantagem a possibilidade de utilização dos mesmos tampões da cromatografia anterior, não sendo necessária a troca do meio no qual o material se encontra. Contudo, em cromatografias de interação hidrofóbica a aplicação de volumes grandes ou a realização de várias aplicações acarreta em uma perda de resolução – o que levou à necessidade, neste momento, de concentrar as enzimas, que se encontravam em um volume de cerca de 50 ml.

Imaginamos trocar as substâncias acompanhantes das enzimas por água e concentrar o material a vácuo em um liofilizador. Das duas técnicas disponíveis para deixar o material em água (diálise e filtração em gel), optou-se por descartar a diálise, dada a natureza celulósica da membrana (interações das enzimas com a membrana poderiam levar a uma diminuição na eficiência do processo). Quanto à filtração em gel (em coluna HiTrap Desalting, Pharmacia, ver Material e Métodos 2.23), observou-se que, ao passar-se o material do tampão MES com NaCl, CaCl₂ e CMC para água, grande parte da atividade β -glucanásica é retida pela coluna, provavelmente devido a alguma interação inespecífica dada pela alta concentração de sal. 35% da atividade inicial é recuperada no material final, passível de concentração. O baixo rendimento deste passo inviabiliza a concentração por liofilização.

Optou-se por concentrar o Material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose através da centrifugação deste em uma membrana Centriplus (AMICOM, ver Material e Métodos 2.24). Apesar deste ser um procedimento demorado, tem a vantagem de manter a

amostra no mesmo tampão em que esta foi recuperada após a cromatografia. Assim sendo, após a centrifugação em Centriplus, o Material 2 foi ressaturado com NaCl e aplicado em uma cromatografia em coluna de interação hidrofóbica Resource ETH (ver Material e Métodos

2.18), obtendo-se o resultado apresentado na figura 23.

Figura 23 – Perfil das atividades sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose em cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia, Suécia) do Material 2 obtido após cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Metil Sepharose.

Da cromatografia em Resource ETH, são recolhidos quatro materiais: CEL (frações 3 a 20 da figura 23), ativo sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose, os materiais LIQ1 (frações 35 a 37 da figura 23) e LIQ 2 (frações 40-42 da figura 23), ativos sobre laminarina e liquenana, e o material LAM (frações 60 a 63 da figura 23), ativo apenas sobre laminarina.

Os materiais LAM e LIQ1 revelaram ambos apenas uma banda de proteína quando aplicados em SDS-PAGE (ver Material e Métodos 2.27). LAM apresenta uma massa molecular relativa de 46.150 Daltons; LIQ1, 24.600 Daltons (ver figura 24).

LIQ1 LAM

Figura 24 – SDS-PAGE dos materiais LAM e LIQ1, obtidos após separação por cromatografia em coluna Resource ETH (Pharmacia, Suécia) do Material 2 obtido na cromatografia em Metil Sepharose. Ver Material e Métodos 2.27.

O material LIQ2 apresentou, em SDS-PAGE, duas bandas de proteína, uma delas com a mesma massa molecular relativa de LIQ1 (24.600) e outra com uma massa molecular relativa de 23.400 (dados não apresentados). Após a cromatografia em Resource ETH, o material LIQ2 foi ressaturado com NaCl, sendo aplicado na mesma coluna, utilizando-se o mesmo protocolo de separação anterior (ver Material e Métodos 2.18). Da cromatografia em Resource ETH do material LIQ2 obteve-se o resultado exposto na figura 25.

Figura 25 – Perfil das atividades sobre laminarina e liquenana em cromatografia de interação hidrofóbica do material LIQ2 em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia, Suécia).

O material LIQ2, recromatografado em Resource ETH (frações 40 a 42 da figura 25), apresenta apenas uma banda de proteína quando aplicado em SDS-PAGE (ver Material e Métodos 2.27), com a mesma massa molecular relativa de uma das bandas anteriormente obtidas na aplicação do material resultante da primeira cromatografia nesta coluna (23.400 Daltons, dados não apresentados).

O material 1, obtido após cromatografia em Metil Sepharose (figura 20), foi recromatografado nessa mesma coluna e continuou sendo eluído na mesma região (resultado não apresentado). Isso indica que o aparecimento desse material não foi devido à saturação da coluna pelo material. Consideramos que esse material corresponde a pelo menos uma outra β -glucanase.

3.5.3. Purificação das celulasas presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Passamos a tentar a purificação das enzimas presentes no material CEL. Este, ao ser aplicado em SDS-PAGE (ver Material e Métodos 2.27), revela duas bandas de proteína, com massas moleculares relativas de 22.260 e 24.000 Daltons (dados não apresentados).

Como o material CEL aparentemente constituía-se de apenas duas proteínas, sendo, na cromatografia em Resource ETH do Material 2, eluído durante a lavagem da coluna e no começo do gradiente salino, tentou-se inicialmente separar estas duas proteínas através da utilização de um fluxo mais lento, após a aplicação da amostra (ver Material e Métodos 2.18). Obteve-se assim o resultado exposto na figura 26.

Figura 26 – Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource ETH do Material 2, utilizando um fluxo mais lento (0,5ml/min) durante a aplicação da amostra. São apresentadas 5 aplicações. Ver Material e Métodos 2.18.

Observa-se ao longo das aplicações uma perda gradativa de resolução. Na primeira aplicação, observam-se nitidamente dois picos de atividade sobre laminarina – os quais, quando aplicados em SDS-PAGE (ver Material e Métodos 2.27), demonstraram a presença de duas (primeiro pico) e apenas uma banda de proteína (segundo pico, massa relativa de 22.260). Como não foi possível purificar a forma de 24.000 observada no material CEL desta maneira, investimos na troca do sal utilizado na confecção do gradiente salino da cromatografia em coluna Resource ETH. Utilizamos, assim, acetato de sódio 5M em vez de cloreto de sódio para os efeitos de salting out (ver Material e Métodos 2.18), obtendo o resultado exposto na figura 27.

Figura 27 – perfil das atividades sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose em cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource ETH (FPLC, Pharmacia, Suécia) do pool Metil 2 utilizando gradiente de concentração de acetato de sódio. Ver Material e Métodos 2.18.

De fato, a presença de um ânion mais cosmotrópico (acetato) resultou em uma interação efetiva entre as enzimas ativas sobre CMC com a matriz Resource ETH, fato que não se verificou nas cromatografias anteriores, aonde estas formas eram eluídas durante a lavagem da coluna. Contudo, não foi possível separar estas enzimas entre si, mesmo com a utilização de um volume maior no gradiente salino (30ml, dados não apresentados). Aparentemente, nestas condições inverte-se a ordem de eluição de LAM e LIQ1, e não é mais possível detectar a forma LIQ2 no perfil cromatográfico.

Assim sendo, com o propósito de isolar as formas presentes no material CEL, tentou-se aplicar este (ou o Material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose) em outros dois tipos de cromatografia: de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (FPLC, Pharmacia, Suécia; ver Material e Métodos 2.19) e de troca iônica em coluna Resource Q (FPLC, Pharmacia, Suécia; ver Material e Métodos 2.20). Destas cromatografias obtiveram-se os resultados expostos na figura 28.

Figura 28 – Perfil das atividades sobre laminarina, liquenana e CMC em cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource PHE (FPLC, Pharmacia, Suécia) do Material 2, obtido após cromatografia em Metil Sepharose (A), e cromatografias de troca iônica em coluna Resource Q (FPLC, Pharmacia, Suécia) dos materiais 2 (B), CEL (recolhido após Resource ETH com gradiente de NaCl) (C) e CEL (recolhido após Resource ETH com gradiente de acetato de sódio) (D). Ver Material e Métodos 2.19 e 2.20.

Como pode ser observado na figura 28, a cromatografia em Resource PHE não resolve nenhuma das formas encontradas no Material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose e não ocorre nenhuma interação das formas ativas sobre CMC com a coluna Resource Q, independentemente do material de origem.

Tentou-se então aplicar o material CEL proveniente da cromatografia do Material 2 em Resource ETH (gradiente de NaCl) em uma eletroforese em cilindros de gel de poliacrilamida na presença de SDS (ver Material e Métodos 2.21). Para aplicar o material CEL em uma eletroforese, é necessária a remoção do sal nele presente. Como já era conhecida a inviabilidade das aplicações deste tipo de material em uma filtração em gel (HiTrap Desalting) ou em uma diálise, optou-se por dessalinizar o material CEL através de ciclos de

centrifugação em concentrador Centriplus (AMICON, USA, ver Material e Métodos 2.24) e diluição com água.

Da eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS do material CEL dessalinizado e concentrado obteve-se o resultado exposto na figura 29.

Figura 29 – Perfil de atividade sobre liquenana nas frações de eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida em presença de SDS do material CEL. Ver Material e Métodos 2.21.

De eletroforeses semelhantes à apresentada na figura 29, foram recolhidas as amostras CEL1 (frações 105 a 111 da figura 29) e CEL2 (frações 123 a 128 da figura 29), que, ao serem aplicadas em SDS-PAGE (ver Material e Métodos 2.27), revelaram a presença de diversos contaminantes em cada preparação. Devido a isso, decidiu-se submeter os dois materiais a uma cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12 (FPLC, Pharmacia, Suécia; ver Material e Métodos 2.22), recolhendo-se parte do sobrenadante de cada fração da eletroforese com uma seringa, de forma a evitar os grãos de poliacrilamida da amostra. Obteve-se assim o resultado exposto na figura 30.

Figura 30 – Perfis de atividade sobre liquenana em cromatografias de filtração em gel em coluna Superose 12 (FPLC, Pharmacia, Suécia) do sobrenadante das frações de eletroforese CEL1 e CEL2. Ver Material e Métodos 2.22.

As frações ativas das cromatografias em coluna Superose 12 dos materiais CEL1 e CEL2 foram reunidas e aplicadas em SDS-PAGE, revelando que estas duas proteínas encontravam-se purificadas, apresentando massas moleculares relativas aproximadas de 71.600 (CEL1) e 72.700 (CEL2).

Procurou-se uma maneira de aproveitar melhor as frações de eletroforese correspondentes aos materiais CEL1 e CEL2, de forma a poder aplicar a maior quantidade possível destes materiais, livre de grãos de poliacrilamida, em Superose 12.. A primeira tentativa se deu através da diluição das frações com tampão citrato 20mM pH 6,0 e filtração do produto em lã de vidro (ver Material e Métodos 2.22). O filtrado foi centrifugado em concentrador Centriplus e aplicado na coluna de filtração em gel, sendo que nenhuma atividade foi detectada após este passo (dados não apresentados). Tentou-se então filtrar diretamente as frações da eletroforese em uma membrana de PVDF, através de um filtro de amostras (Durapore, Millipore, USA). A aplicação do filtrado das frações provenientes de CEL2 em Superose 12 resultou em uma série de corridas idênticas à exposta na figura 30. Contudo, para a cromatografia de filtração em gel em Superose 12 do filtrado das frações CEL1, obteve-se uma série completamente irregular de perfis de eluição, aonde observaram-se corridas sem atividade alguma, corridas com picos de atividade em posições próximas à da figura 30, e corridas com diversos picos e arrastes da atividade enzimática.

Solucionou-se o problema do aproveitamento das frações de eletroforese CEL1 através da aplicação total das frações (tanto de CEL1 como de CEL2) na coluna Superose 12. Os grãos de poliacrilamida são retidos pelo filtro da coluna, sendo este, após uma série de cromatografias (do filtrado de CEL1 ou do filtrado de CEL2), lavado ou trocado, e a camada de poliacrilamida granulada retirada do topo da coluna. Pôde-se, assim, contar com o aproveitamento integral dos produtos da eletroforese em cilindro de poliacrilamida em presença de SDS do material CEL, obtendo-se as enzimas CEL1 e CEL2 puras e em quantidade suficiente para o estudo de sua especificidade.

Embora não tenham sido mais calculados valores de recuperação da atividade enzimática ao longo da marcha de purificação, nitidamente a soma das atividades purificadas até o momento mostra-se menor do que a atividade da fração solúvel inicial. Levantou-se a hipótese de perda de parte considerável da atividade dos materiais B e CEL durante sua centrifugação em membrana Centriplus (ver Material e Métodos 2.24). O filtrado resultante da centrifugação do Material 2 no concentrador foi precipitado com etanol 80% (ver Material e Métodos 2.25) e ensaiou-se a atividade sobre liquenana antes e após a precipitação. Os resultados obtidos encontram-se expostos na tabela 16.

Tabela 16 – Recuperação de atividade sobre liquenana no filtrado da centrifugação do Material 2 obtido após cromatografia em Metil Sepharose em concentrador Centriplus, antes e após sua precipitação com etanol 80%.

Material	mU total	% atividade inicial
Material 2	587	100
Filtrado	531	90,4
Precipitado ressuspenso	676	115

Surpreendentemente, grande parte da atividade liquenásica do Material 2 é recuperada no filtrado. Consideramos duas hipóteses para explicar o fato: 1) as enzimas já isoladas e

purificadas (LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2) de alguma forma estariam atravessando a membrana de concentração, apesar das suas massas moleculares relativas (SDS-PAGE) serem mais altas do que a massa correspondente ao valor de corte da membrana (12.500); 2) estaríamos medindo a atividades de enzimas diferentes das mencionadas acima, não visualizadas anteriormente.

Aplicamos o ressuspendido da precipitação com etanol em cromatografias de interação hidrofóbica em Resource ETH, em duas condições distintas: utilizando NaCl ou NaH_2PO_4 para confecção do gradiente salino e efeitos de salting out (ver Material e Métodos 2.18). Nos dois casos não observou-se interação da atividade sobre liquenana com a coluna (dados não apresentados).

O ressuspendido da precipitação com etanol também foi aplicado em uma eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida em presença de SDS, nos mesmos moldes da eletroforese do pool CEL (ver Material e Métodos 2.21). Neste caso não foi detectada nenhuma atividade enzimática nas frações (dados não apresentados). Contudo, ao aplicar-se este material em SDS-PAGE (20%), observam-se duas bandas de proteína, com massas moleculares relativas de cerca de 15.000 e 17.000. Estas enzimas foram respectivamente nomeadas como CELBP1 e CELBP2.

Este material ressuspendido também foi aplicado em uma eletroforese nativa em cilindro de gel de poliacrilamida (17,5%; ver Material e Métodos 2.26), obtendo-se o resultado exposto na figura 31. Pode-se observar uma incipiente separação de duas atividades, mas não foram realizados mais esforços de forma a purificar estas enzimas até a homogeneidade.

Figura 31 – Perfil de atividade sobre liquenana nas frações de eletroforese nativa em cilindro de gel de poliacrilamida do ressuspenso após precipitação com etanol do filtrado do Material 2 em Centriplus. Ver Materiais e Métodos 2.26.

3.5.4. Esquema geral da marcha de purificação e rendimentos

Ao longo dos trabalhos puderam ser separadas 8 atividades distintas, sendo 5 destas purificadas até a homogeneidade. A marcha utilizada na purificação das β -glucanases da fração solúvel de *Periplaneta americana* encontra-se esquematizada abaixo:

Figura 32 – Marcha de purificação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*. Enzimas purificadas até a homogeneidade em azul.

O rendimento obtido para cada enzima na marcha foi estimado medindo-se a quantidade de proteína presente nos materiais LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2. A quantidade de enzima obtida a partir de 10 animais está apresentada na tabela 17.

Tabela 17 – Rendimento em massa das β -glucanases purificadas a partir da fração solúvel do tubo digestório de 10 exemplares de *Periplaneta americana*.

Enzima	Quantidade de proteína	% Proteína inicial
LAM	5,32 μ g	0,009
LIQ1	0,91 μ g	0,002
LIQ2	7,70 μ g	0,013
CEL1	0,54 μ g	0,0009
CEL2	0,49 μ g	0,0008

3.6.Caracterização parcial das β -glucanases de *P. americana* purificadas.

Até o presente momento foram purificadas as enzimas LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2. Deu-se início a sua caracterização através do estudo das atividades relativas destas enzimas sobre as três β -glucanas utilizadas neste estudo – laminarina, liquenana e carboximetilcelulose. Os resultados referentes a estes ensaios encontram-se expostos na tabela 18.

Tabela 18 – Atividades relativas sobre laminarina, liquenana e carboximetilcelulose de LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2. (Atividade máxima = 100).

	LAM	LIQ1	LIQ2	CEL1	CEL2
Laminarina	100	100	100	-	-
Liquenana	1,1	64,1	93	100	100
CMC	1,1	1,3	-	11,4	19

Após a determinar qual o substrato melhor hidrolisado para as cinco enzimas – laminarina para LAM, LIQ1 e LIQ2 e liquenana para CEL1 e CEL2 – estudou-se a estabilidade destas frente a diferentes valores de pH (ver Material e Métodos 2.28). Os resultados deste experimento estão expostos na figura 33.

Figura 33 – Perfis da atividade remanescente sobre laminarina (LAM, LIQ1 e LIQ2) e liquenana (CEL1 e CEL2) após incubação por 4 horas em diferentes valores de pH. Ver Material e Métodos 2.28.

Cada uma das enzimas estudadas apresenta um perfil diferente de estabilidade ao pH. Enquanto LAM aparentemente perde cerca de 10% da atividade entre os pHs 5 e 9, LIQ1 parece ser estável na faixa 5,7-7,5, assim como LIQ2 entre os pHs 6 e 8. CEL1 provavelmente é estável apenas em uma faixa estreita, de 5,5 a 7, enquanto CEL2 mostra uma constante perda de cerca de 15% da atividade inicial em valores de pH acima de 5,5. Tais comportamentos foram levados em conta na idealização dos experimentos a seguir.

Deu-se continuidade à caracterização destas enzimas através do estudo da influência do pH em sua eficiência catalítica. O resultado deste experimento (determinação de pH ótimo; ver Material e Métodos 2.29) encontra-se na figura 34.

Figura 34 – Influência do pH nas atividades de LAM, LIQ1, LIQ2 sobre laminarina e nas atividades de CEL1 e CEL2 sobre liquenana. Ver Material e Métodos 2.29.

Tendo-se em vista os dados da figura 34, adotaram-se para LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2 os respectivos pH ótimos de 6,0 , 5,8 , 5,7 e 5,7, enquanto para LAM observou-se uma faixa de atuação máxima entre os pHs 6 e 7.

Passamos então ao estudo de algumas características cinéticas das enzimas purificadas. Determinaram-se parâmetros cinéticos básicos (constante de Michaelis e constante de catálise) para as cinco enzimas, sobre seus dois melhores substratos (ver Material e Métodos 2.30). No caso de LAM, estes parâmetros foram determinados apenas para laminarina, em dois valores de pH. Os resultados referentes a esta série de experimentos estão expostos nas figuras 35 a 39; o resumo dos dados obtidos encontra-se na tabela 19.

Figura 35 – Obtenção de parâmetros cinéticos de LAM para hidrólise de laminarina em pH 5,0 e 7,0. Ver Material e Métodos 2.30.

Figura 36 – Obtenção de parâmetros cinéticos de LIQ1 para hidrólise de laminarina e lichenana. Ver Material e Métodos 2.30.

Figura 37 – Obtenção de parâmetros cinéticos de LIQ2 para a hidrólise de laminarina e lichenana. Ver Material e Métodos 2.30

Figura 38 – Obtenção de parâmetros cinéticos de CEL1 para a hidrólise de liquenana e carboximetilcelulose. Ver Material e Métodos 2.30.

Figura 39 – Obtenção de parâmetros cinéticos de CEL2 para a hidrólise de liquenana e carboximetilcelulose. Ver Material e Métodos 2.30.

As enzimas LAM e LIQ2 (ensaio sobre laminarina) encontram-se inibidas em altas concentrações de substrato. Os dados obtidos foram ajustados a um modelo aonde a inibição se dá pela ligação sequencial, após a formação do complexo ES, de uma segunda molécula de laminarina, formando um complexo ES_2 improdutivo (Cleland, 1979; ver figura 12 de Material e Métodos). Obtiveram-se, assim, valores de K_i – constante de dissociação do complexo improdutivo entre a enzima e a molécula de substrato inibidora. Estes valores também estão expostos na tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos de LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2 sobre seus principais substratos. ciclo – duração do ciclo catalítico, em milissegundos.

Enzima	substrato	K_m (%)	K_{cat} (s^{-1})	ciclo (ms)	K_i (%)	K_{cat}/K_m relativo
LAM	laminarina pH 5	$0,128 \pm 0,015$	$83,4 \pm 3,9$	$12,0 \pm 0,6$	$9,271 \pm 2,685$	60
	laminarina pH 7	$0,074 \pm 0,008$	$80,9 \pm 4,7$	$12,4 \pm 0,7$	$2,067 \pm 0,28$	100
LIQ1	laminarina	$0,160 \pm 0,010$	745 ± 11	$1,34 \pm 0,02$	-	100
	liquenana	$0,360 \pm 0,040$	1050 ± 56	$0,95 \pm 0,05$	-	63
LIQ2	laminarina	$0,359 \pm 0,072$	$4,63 \pm 0,82$	$216 \pm 39,5$	$4,448 \pm 1,775$	100
	liquenana	$0,567 \pm 0,091$	$3,58 \pm 0,29$	279 ± 26	-	49
CEL1	liquenana	$0,124 \pm 0,011$	370 ± 11	$2,69 \pm 0,09$	-	100
	CMC	$1,048 \pm 0,211$	280 ± 21	$3,57 \pm 0,27$	-	10
CEL2	liquenana	$0,339 \pm 0,067$	458 ± 34	$2,18 \pm 0,17$	-	100
	CMC	$1,350 \pm 0,243$	316 ± 24	$3,16 \pm 0,24$	-	17

À determinação dos parâmetros cinéticos básicos de cada uma destas enzimas seguiu-se a sua caracterização quanto ao tipo de produto formado durante a hidrólise de seus substratos. Esta foi realizada através da separação dos produtos de reação em cromatografia em camada delgada de sílica (ver Materiais e Métodos 2.32). Os resultados referentes aos ensaios de LAM e LIQ1 estão expostos na figura 40. LIQ2, CEL1 e CEL2 não revelaram a produção de nenhuma espécie de carboidrato de baixo grau de polimerização que pudesse ser visualizado com esta técnica.

Figura 40 – Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de hidrólise de LAM e LIQ1 sobre laminarina e liquenana. Raia 1 – Glicose e Maltodextrinas (grau de polimerização de 2 a 7); Raia 2 – Produtos de reação de LIQ1 sobre liquenana; Raia 3 – Produtos de reação de LIQ1 sobre laminarina; Raia 4 – Produtos de reação de LAM sobre laminarina; Raia 5 – Laminaribiose; Raia 6 – Glicose.

LAM produz um amplo espectro de produtos de grau de polimerização variável. As taxas de migração dos produtos de hidrólise de laminarina por LAM seguem uma tendência linear, de acordo com um hipotético grau de polimerização, o que é indicativo de que se trata de uma série de oligossacarídeos homóloga (ver figura 41). Assim sendo, os produtos principais da ação de LAM sobre laminarina provavelmente são glicose, laminaribiose, laminaritriose e laminaritetraose.

LIQ1, atuando sobre laminarina, produz oligossacarídeos correspondentes aos graus de polimerização 1 (glicose), 2 (laminaribiose) e 4 (laminaritetraose). Os produtos de

hidrólise de liquenana por LIQ1, de baixo grau de polimerização, parecem limitar-se a um oligossacarídeo de grau de polimerização próximo a quatro.

Figura 41 – Migrações relativas em cromatografia em camada delgada de sílica (ver Material e Métodos 2.32) de maltodextrinas e dos produtos de hidrólise de laminarina por LAM.

De posse destas informações, realizou-se um ensaio com o objetivo de conhecer a importância relativa da glicose no espectro dos produtos liberados por LAM e LIQ1. Para isso determinou-se o aparecimento de glicose e de poder redutor ao longo do tempo, para as duas enzimas (ver Material e Métodos 2.3). A glicose consiste em 41% do poder redutor liberado durante o ataque de LAM à laminarina, e 38,5% do poder redutor liberado durante o ataque de LIQ1 ao mesmo polímero. O monossacarídeo constitui apenas 1,6% por cento do poder redutor liberado durante a hidrólise de liquenana por LIQ1.

Em outro experimento, determinou-se o grau de polimerização médio dos produtos formados durante a ação de CEL1 e CEL2 sobre liquenana (ver Material e Métodos 2.31), obtendo-se o resultado exposto na figura 42.

Figura 42 – Variação do grau de polimerização de liquenana durante ensaio de atividade com as enzimas CEL1 e CEL2 purificadas. Ver Material e Métodos 2.31.

Observa-se que a hidrólise segue um padrão semelhante para as duas enzimas, e que por alguma razão estas não conseguem abaixar o grau de polimerização médio da mistura para valores inferiores a 14. Paralelamente, realizaram-se ensaios destas duas enzimas sobre celulose cristalina (ver Material e Métodos 2.33), obtendo-se os resultados expostos na tabela 20. Para nenhuma destas enzimas pôde-se registrar a produção de glicose a partir deste substrato; as atividades calculadas na tabela 20 referem-se apenas à produção de poder redutor no sobrenadante da suspensão final.

Tabela 18 – Atividades de preparações de CEL1 e CEL2 sobre liquenana, CMC e celulose cristalina. Em todos os ensaios, a concentração do substrato é 1%. Ver Material e Métodos 2.33.

enzima	substrato	mU/ μ l	U/mg	Atividade relativa (%)
CEL1	liquenana	$8,95 \cdot 10^{-3}$	27,80	100
	CMC	$3,52 \cdot 10^{-3}$	10,93	39
	AVICEL	$2,44 \cdot 10^{-4}$	0,76	2,7
CEL2	liquenana	$8,16 \cdot 10^{-3}$	25,3	100
	CMC	$3,68 \cdot 10^{-3}$	11,4	45
	AVICEL	$7,77 \cdot 10^{-5}$	0,24	0,95

A fim de verificarmos a possibilidade das enzimas serem capazes de lisar células de *Saccharomyces cerevisiae*, LAM e LIQ1 foram incubadas por vários tempos com essas células, e a turbidez da amostra determinada (ver Material e Métodos 2.34). Obteve-se o resultado exposto na figura 43.

Figura 43 – Ensaio de lise de células de *Saccharomyces cerevisiae* expostas a LIQ1 e LAM através da medida da turbidez (Abs. 420nm) da suspensão. O desvio apresentado no gráfico é o desvio padrão de uma média de 4 experimentos. Ver Material e Métodos 2.34.

Aparentemente LIQ1 apresenta capacidade lítica. Embora as médias das absorbâncias das suspensões expostas a LAM sejam sempre menores do que as observadas nos brancos, não é possível diferenciar um conjunto de valores do outro, dada a grande variação intrínseca aos resultados obtidos no ensaio. Os valores de LAM também não apresentam a tendência de queda observada no ensaio de LIQ1. Assim sendo, uma possível atividade lítica de LAM não pôde ser observada nestas condições experimentais - ou simplesmente inexistente.

4.DISSCUSSÃO

4.1. Considerações a respeito das propriedades e da marcha de purificação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Ao longo dos trabalhos puderam ser separadas entre si 8 atividades distintas, sendo 5 destas purificadas até a homogeneidade.

A primeira característica deste grupo de enzimas que se sobressai durante a marcha de purificação é a sua hidrofobicidade. Excetuando-se a atividade denominada Material 1 (ver figura 20), todas as outras enzimas interagem com a coluna Metil Sepharose através de um salting out proporcionado por um sal pouco cosmotrópico, o cloreto de sódio. Além disso, todas estas enzimas são eluídas da coluna ao fim do gradiente salino – o que sinaliza uma interação hidrofóbica forte, além de facilmente induzível.

Observando o comportamento de domínios de ligação a celulose, verificou-se que a interação entre estes e o substrato cristalino se dá de duas formas: pelo emparelhamento de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (triptofanos, fenilalaninas ou tirosinas) alinhados com os anéis piranosídicos de resíduos de glicose de uma mesma cadeia e pela formação de ligações de hidrogênio com hidroxilas de cadeias paralelas à primeira (Tormo et al., 1996). Assim sendo, o reconhecimento e clivagem de cadeias β -glucanásicas (pelo menos em substratos cristalinos) requeriria a exposição de resíduos hidrofóbicos. Em geral, nas glicosil-hidrolases resíduos hidrofóbicos também estão envolvidos na hidrólise de substratos solúveis, ajudando a enzima a reconhecer e ligar resíduos monossacarídicos do substrato (como ocorre, por exemplo, em xylanases; ver Harris et al., 1994).

Assim sendo, os resíduos envolvidos no reconhecimento e ligação de cadeias piranosídicas podem ser importantes na interação destas enzimas com a resina hidrofóbica. A estabilização destas enzimas ao longo da cromatografia com carboximetilcelulose seria, a princípio, um contrasenso, pois este substrato competiria com a coluna pelos sítios hidrofóbicos das enzimas ligantes. A ligação destas enzimas com a coluna em presença de

CMC pode ser interpretada de duas maneiras. Em muitas glucanases, observa-se a presença de sítios de reconhecimento de cadeias de β -glucana (nos estados cristalino ou amorfo) acessórios ao sítio aonde se dá a ligação e clivagem da cadeia glicosídica (Tormo *et al*, 1996). O sítio de ligação de CMC que leva a uma maior estabilidade da enzima, pode, assim, ser diferente do sítio de interação da enzima com a coluna. Outra possibilidade é de que a interação com a coluna seja muito mais forte do que a interação com este substrato, este interagindo com as enzimas (e estabilizando-as) somente após a liberação destas da coluna. Deve-se ter em mente, entretanto, que no momento da aplicação na cromatografia as enzimas não se encontram em presença de CMC, não havendo, portanto, competição direta. Pode-se imaginar um papel da CMC na eluição das enzimas ligadas à coluna, ao longo de toda a cromatografia.

A estabilização por cátions divalentes (Manganês, Cálcio e Magnésio) observada no início da marcha de purificação levanta a possibilidade destas enzimas também possuírem um sítio de ligação para um íon desta natureza. Diversas β -glucanases possuem um íon divalente de Cálcio coordenado em sua estrutura (Keitel *et al.*, 1993). É interessante observar que para a atividade sobre laminarina obtem-se efeitos de estabilização similares utilizando-se Magnésio e Cálcio e, para a atividade sobre liquenana o mesmo se dá com os íons Manganês, Magnésio e Cálcio.

Outra singularidade observada durante a marcha de purificação é a recuperação de CEL1 e CEL2 após eletroforese em cilindros de poliacrilamida na presença de SDS. Tal fato pode resultar de uma estabilidade às condições utilizadas durante a separação ou de uma capacidade de renaturação das duas enzimas após a exposição ao detergente. Estas enzimas, assim, provavelmente apresentam uma estrutura compacta, estável a condições extremas, ou apresentam elementos estruturais estáveis, ou regeneráveis, como pontes dissulfeto, que permitem a sua renaturação. Estes elementos são comuns em proteínas de baixo peso

molecular (Stryer, 1988). Contudo, neste caso, temos enzimas de alto peso molecular (CEL1 e CEL2, ~70kDa).

De uma forma geral, observam-se rendimentos em massa muito pequenos para as enzimas purificadas. Dada a inviabilidade do cálculo de recuperações a partir do material inicial, é difícil saber se realmente estas enzimas encontram-se em tão pouca quantidade no tubo digestório de *P.americana*, ou se estamos observando a perda destas atividades ao longo de sua separação. É importante ressaltar que a marcha desenvolvida caracteriza-se pela exposição a altas concentrações de sal, o que pode levar à denaturação, e pela concentração de diversos materiais em membranas de centrifugação, técnica aonde podem ser observados proeminentes efeitos de adsorção. Além disso, aparentemente as enzimas CELBP1 e CELBP2 (15 e 17 kDa, respectivamente; SDS-PAGE 20%) são obtidas em quantidades consideráveis no filtrado do Material 2, podendo constituir grande parte da atividade glucanásica original (90% da atividade do Material 2). É interessante observar que, no material CEL, são observadas apenas duas bandas de proteína cujas massas moleculares relativas (22.260 e 24.000, SDS-PAGE 12%) não correspondem às massas moleculares relativas de CEL1 (71.600) e de CEL2 (72.700). Imaginamos que estas duas bandas correspondam à parte de CELBP1 (15 kDa) e CELBP2 (17 kDa) que não atravessou a membrana de concentração durante a centrifugação do Material 2. Isto indicaria a abundância destas duas proteínas, além de um comportamento ligeiramente anômalo em SDS-PAGE, correspondente a uma taxa de ligação de SDS menor que a dos padrões. Essas enzimas de baixo peso molecular provavelmente são perdidas ao longo da eletroforese (em cilindro, na presença de SDS) utilizada para separar CEL1 de CEL2.

Valores de massa molecular relativa conflitantes foram determinados para LAM (46.150, 56.300 e 64.000) e LIQ1 (24.600 e 34.400). Contudo, nestas diversas determinações não foram usadas concentrações diferentes de poliacrilamida nas determinações (SDS-PAGE). Estas diferenças poderiam estar relacionadas a diferenças no material aplicado na

eletroforese – em cada determinação aplicou-se um material proveniente de uma marcha distinta. Diferenças pequenas relativas a presença de sal (em amostras provenientes de cromatografia de troca iônica) ou de CMC (em amostra proveniente de cromatografia em Resource ETH) na amostra poderiam ter levado, nestes casos, a interações diferentes com o SDS e a migrações anômalas.

A não linearidade na formação de produtos ao longo do tempo no ensaio da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana* sobre os três substratos normalmente utilizados (laminarina, liquenana e carboximetilcelulose) pode dever-se à presença de um inibidor competitivo na fração solúvel, à existência de heterogeneidades na população inicial de moléculas de substrato, ou ao fato do substrato ser modificado ao longo da reação, resultando em moléculas que não são processadas pelas enzimas com a mesma eficiência.

Dada a presença de alimento não digerido na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*, é possível que as β -glucanases ensaiadas neste material se encontrem inibidas por dissacarídeos ou oligossacarídeos presentes na dieta. Conforme esta preparação de enzima e inibidor competitivo é diluída, observa-se um aumento relativo na atividade medida no ensaio, devido ao maior deslocamento do inibidor (em menor concentração) por uma solução de substrato com a mesma concentração (ver Material e Métodos 2.3; Segel, 1975).

Pode-se imaginar, para os três substratos utilizados, a existência de populações de moléculas diferenciadas quanto a tamanho de cadeia, número e posições de ramificações (laminarina), proporções e distribuição de tipos de ligação ao longo da cadeia (liquenana) e distribuição de grupos substituintes (carboximetilcelulose). Assim, se alguma destas populações é atacada mais eficientemente pelas enzimas presentes na fração solúvel, o seu esgotamento resultará em uma queda nos valores de velocidade. Mesmo para uma população inicial de moléculas homogêneas, pode-se observar este efeito – no caso, relacionado ao aparecimento de novas populações de moléculas de substrato, menos suscetíveis ao ataque enzimático.

4.2. Efeito do pH na atividade das β -glucanases de *P. americana*.

De uma forma geral, todas as enzimas caracterizadas apresentam um pH ótimo ligeiramente ácido, em torno de 6,0. Esta faixa de pH ótimo é comum à maioria das β -glucanases conhecidas (Okada, 1985; Kundu et al., 1988; Mori, 1992; Liu et al., 1992; Yoshigi et al., 1988), e condiz com os valores de pH encontrados no tubo digestório de *P. americana*: ao longo de todo o tubo encontramos valores de pH ligeiramente ácidos, como pode ser observado na tabela 21.

Tabela 21 – Valores de pH do conteúdo de diferentes porções do tubo digestório de *P. americana*. Dados de Greenberg et al. (1970).

Porção	Valor
Papo	5,4-6,5
Intestino Médio Anterior	6,5
Intestino Médio Posterior	6,7
Intestino Posterior (1º parte)	6,7
Intestino Posterior (2º parte)	6,4
Intestino Posterior (3º parte)	6,5

Os dados apresentados na tabela 21 correspondem a animais alimentados com três dietas distintas, daí a grande variação observada no pH do conteúdo do papo. Nós não observamos nenhuma das β -glucanases no intestino posterior de *P. americana*. A comparação das curvas de pH ótimo das enzimas purificadas com os valores da tabela 21 resultou nos dados da tabela 22, aonde estão relacionadas as eficiências relativas de cada enzima nas diferentes partes do tubo digestório de *P. americana*.

Tabela 22 – Valores de pH ótimo e eficiências relativas de LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2 nas diferentes partes do tubo digestório de *P. americana*.

Eficiência relativa (*)	Enzima (pH ótimo)				
	LAM (6-7)	LIQ1 (6,0)	LIQ2 (5,8)	CEL1 (5,7)	CEL2 (5,7)
Papo (pH 5,4-6,5)	85-100%	80-100%	50-100%	85-100%	80-100%
Intestino Médio Anterior (pH 6,5)	100%	90%	50%	85%	80%
Intestino Médio Posterior (pH 6,7)	100%	65%	40%	80%	80%

(*) – A maior atividade de uma enzima em uma determinada região foi chamada de 100%

Pode-se ver que cada uma das enzimas apresenta um comportamento distinto de acordo com os valores de pH de cada região: LAM aparentemente exerce sua atividade máxima nas três partes do tubo digestório consideradas; LIQ1 tem sua atividade máxima no papo e no intestino médio anterior, sendo consideravelmente afetada pela variação de pH ao longo do tubo; LIQ2 apresenta sua eficiência reduzida no intestino médio, podendo exercer sua atividade máxima apenas no papo; CEL1 e CEL2 são pouco afetadas pela variação de pH ao longo do tubo, exercendo ao longo do intestino médio eficiências de cerca de 80%. LIQ1 e LIQ2 apresentam espectros de ação semelhantes entre si, embora LIQ2 seja mais restrita ao papo. Da mesma forma, CEL1 e CEL2 comportam-se de formas parecidas uma à outra.

Comparando-se os perfis de estabilidade frente a diferentes valores de pH com os valores de pH do tubo digestivo, observa-se que LIQ1 e LIQ2 são completamente estáveis na faixa de valores pH considerada. Surpreendentemente, a estreita faixa de valores de pH correspondente à estabilidade completa de CEL1 coincide com a faixa de variação de pH no intestino médio. LAM e CEL2 perdem cerca de 10% da atividade quando expostas a estas condições por quatro horas.

Sabe-se que o tempo de trânsito do alimento ao longo do tubo digestório de *P. americana* é de aproximadamente 20 horas (Bell & Adiyodi, 1982). Considerando um decaimento exponencial, isto significa que, ao término da digestão, contaríamos com cerca de

60% das atividades iniciais de LAM e CEL2. Contudo, devemos considerar possíveis efeitos de estabilização dados pela presença do alimento (substrato). Além disso, não se conhece o tempo exato de trânsito do alimento somente nos intestinos anterior e médio, que são as regiões aonde estas enzimas aparentemente atuam sobre o alimento. Também deve ser considerado o reaproveitamento destas enzimas, durante a passagem do bolo digestivo, através da circulação endo-ecto peritrófica de enzimas (Terra e Ferreira, 1994).

4.3. Tipos de especificidade e comportamento cinético das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

O espectro de substratos hidrolisados pelas cinco enzimas purificadas até o momento permite a divisão das β -glucanases de *Periplaneta americana* em três tipos básicos:

- 1) Enzimas responsáveis pela hidrólise exclusiva de laminarina (LAM);
- 2) Enzimas capazes de hidrolisar eficientemente laminarina e liquenana (LIQ1 e LIQ2);
- 3) Enzimas capazes de hidrolisar eficientemente liquenana e carboximetilcelulose (CEL1 e CEL2).

LAM e LIQ2 mostram cinéticas de inibição pelo substrato (para hidrólise de laminarina), enquanto as outras enzimas exibem uma cinética Michaeliana simples (ver Material e Métodos 2.30). É interessante notar que a enzima LIQ2, embora seja inibida por laminarina, não o é por liquenana. Tal fato pode ser interpretado de duas maneiras: ou a molécula de liquenana não é capaz de ligar-se ao segundo sítio de ligação, ou a ligação de uma molécula de liquenana no primeiro sítio impede a ligação da segunda molécula que seria inibidora. Os dois fenômenos podem estar relacionados ao tamanho da molécula de liquenana, ou mesmo à diferença nos tipos e na distribuição de ligações glicosídicas que esta apresenta.

A variação na eficiência de hidrólise de laminarina por LAM com a mudança do pH de 7 para 5 (ver figura 35 e tabela 19) parece estar relacionada apenas à alteração do valor de

K_m para este substrato, provavelmente refletindo a protonação de algum grupo envolvido em seu reconhecimento e ligação. Os grupos envolvidos diretamente em catálise aparentemente não sofrem alteração com esta mudança, dado que o valor da constante de catálise não se altera. Observa-se também uma variação significativa no valor da constante de dissociação entre a enzima e a molécula de substrato inibidora (ver valores de K_i na tabela 19), possivelmente relacionada à protonação de grupos envolvidos na ligação do substrato a esse outro sítio.

Entre as enzimas estudadas capazes de hidrolisar laminarina (LAM, LIQ1 e LIQ2), notam-se três níveis de eficiência relativa bastante distintos. Comparando-se as razões K_{cat}/K_m das três enzimas, verifica-se que LIQ1 é a mais eficiente do grupo (100% da eficiência máxima sobre o substrato), enquanto que LAM tem uma eficiência intermediária (~25%) e LIQ2 uma muito baixa (~0,3%).

No grupo de enzimas capazes de hidrolisar liquenana (LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2) observa-se que LIQ1 e CEL1 apresentam eficiências relativas semelhantes, sendo as maiores do conjunto (respectivamente 100 e 99% da eficiência máxima), seguidas por CEL2, que apresenta uma eficiência intermediária (46%) e por LIQ2, que apresenta uma eficiência muito baixa (0,2%).

Apenas duas das enzimas estudadas são capazes de hidrolisar CMC (CEL1 e CEL2). As duas apresentam eficiências semelhantes sobre este substrato – enquanto CEL2 apresenta uma constante de catálise um pouco maior do que a de CEL1, esta possui um valor de K_m para o substrato um pouco menor do que o da primeira. Os parâmetros cinéticos determinados para essas duas enzimas usando CMC como substrato são muito semelhantes. Entretanto, o K_m para liquenana é suficientemente diferente para nos certificarmos de que estamos frente a duas enzimas com características cinéticas distintas.

Os baixos valores das constantes de catálise de LAM e LIQ2 podem dever-se a problemas experimentais ou a características intrínsecas destas duas enzimas. No primeiro

caso, os valores reduzidos dever-se-iam ao estudo da atividade catalítica em uma amostra que sofreu uma significativa inativação ou devido ao fato de que o substrato ideal destas enzimas, na verdade, não seja nenhuma das β -glucanas utilizadas ao longo do estudo. Podem-se imaginar, como candidatos, polissacarídeos aparentados (outros tipos de laminarina ou $\beta(1-3)(1-4)$ glucanas mistas) aonde apenas a disposição de ligações ao longo da cadeia seja diferente, como a $\beta(1-3)(1-4)$ -glucana de *Hordeum vulgare* ou a β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*. LAM e LIQ2 poderiam também ser enzimas responsáveis pela hidrólise de outros tipos bastante diferentes de polissacarídeos, formados por outro monossacarídeo. São conhecidos diversos casos de glicosil-hidrolases capazes da hidrólise de glucanas e xilanas, muitas vezes hidrolisando estas últimas até 40 vezes mais eficientemente do que as primeiras (Notenboom et al., 1998).

4.4. Padrão de ação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

LIQ2 (ensaio sobre laminarina e liquenana), CEL1 e CEL2 (ensaio sobre liquenana e CMC) não formam nenhum produto de baixo grau de polimerização que pudesse ser observado por cromatografia em camada delgada de sílica (ver Resultados). Esse é um padrão de clivagem do substrato típico de endo-hidrolases sem processividade. Contudo, é preciso tomar cuidado ao generalizar este tipo de padrão de ação para outros substratos.

A produção de substâncias de baixo peso molecular por LAM e LIQ1 (a partir de laminarina por LAM e de liquenana e laminarina por LIQ1) pode corresponder a uma exo-glucanase ou a uma endo-glucanase com processividade. A presença de um amplo espectro de produtos com diferentes graus de polimerização sobre laminarina pode ser considerada como um indício de mecanismo exo, dado que endo-glucanases com processividade geralmente produzem um espectro reduzido (um ou dois tipos) de produtos de baixo peso molecular (p.ex. Benen et al., 1999).

A produção de laminaritetraose por LIQ1 agindo sobre laminarina é indicativa da presença de pelo menos 4 subsítios de reconhecimento de glicose adjacentes ao sítio de clivagem da ligação glicosídica. A produção de laminaritetraose aliada a não produção de triose pode estar associada à uma alta afinidade para um resíduo de configuração $\beta(1-3)$ no quarto subsítio, aliada a uma baixa afinidade no terceiro subsítio para o mesmo tipo de ligação (Ver figura 44).

A produção exclusiva de um único oligossacarídeo a partir de liquenana por LIQ1 significa que a enzima, ao ligar-se ao substrato, reconhece sempre o mesmo tipo de unidade estrutural. Gagnaire *et al.* (1975) propuseram que a liquenana apresenta uma estrutura regular, composta por celotriosos ligadas em série através de ligações $\beta(1-3)$ (ver figura 44b). Considerando o não reconhecimento de uma ligação $\beta(1-3)$ no terceiro subsítio do sítio ativo, o ataque de LIQ1 à molécula de liquenana pode corresponder apenas ao reconhecimento de duas das três unidades estruturais repetidas ao longo da cadeia (ver figura 44b). De qualquer forma, a ação da enzima parece ser extremamente específica ao atuar sobre liquenana. Dada a hidrólise de laminarina, é provável que esta enzima esteja hidrolisando a ligação $\beta(1-3)$, situação que corresponde à hidrólise representada pela seta azul na figura 44b, e que o oligossacarídeo liberado seja então celotriose. No caso de LIQ1 estar hidrolisando a ligação $\beta(1-4)$ passível de lise (clivagem representada pela seta vermelha na figura 44b), o oligossacarídeo seria a 4-O- β -D-glicopiranosil-laminaribiose, e esta seria uma enzima com uma especificidade bastante ampla quanto à ligação clivada, pois também seria responsável pela hidrólise de ligações $\beta(1-3)$ em laminarina. A não hidrólise de CMC poderia advir dos grupos substituintes presentes nessa molécula. As informações obtidas não permitem, contudo, afirmar de forma inequívoca que esta enzima é uma endo ou uma exo-glucanase.

Figura 44 - Representação gráfica do ataque de LIQ1 sobre laminarina e liquenana. a) Hidrólise de laminarina, com a formação de laminaritetraose, laminaritriose, laminaribiose e glicose. A seta indica o ponto de clivagem da cadeia nos quatro modos de ligação enzima-polímero; os números indicam os subsítios de reconhecimento (representados abaixo das cadeias). b) Hidrólise de liquenana. Os números indicam o tipo de ligação ($\beta(1-3)$ ou $\beta(1-4)$). Cada seta indica um dos três pontos de ataque possíveis; na mesma cor da seta encontra-se o elemento reconhecido pelo subsítio 3. Os tipos de ataque não apresentados por LIQ1 sobre laminarina e liquenana estão em cinza.

A variação observada no grau de polimerização da liquenana ao longo da sua hidrólise por CEL1 e CEL2 (figura 42) nas fases iniciais do ensaio indica que essas enzimas agem mudando drasticamente o tamanho da molécula do substrato, correspondendo portanto à endo-glucanases. Como não são observados produtos de baixo grau de polimerização estas

enzimas não devem apresentar processividade. Aparentemente estas duas enzimas não conseguem hidrolisar eficientemente uma cadeia polissacarídica com 14 resíduos de glicose. Ou seja, as enzimas deixam de reconhecer alguma característica presente em um substrato de cadeia longa, quando este substrato passa a ter um comprimento médio de 14 glicoses.

A interpretação imediata deste fenômeno estaria relacionada à simples alteração no comprimento da cadeia polissacarídica. Entretanto, é difícil imaginar que a ligação ao substrato por estas enzimas passe pelo reconhecimento de um número tão elevado de resíduos da cadeia, o que corresponderia à presença de no mínimo quatorze subsítios de ligação de glicose no sítio ativo. Endo-glucanases não costumam ter mais do que sete ou nove subsítios deste tipo (Hiromi, 1972). Assim sendo, a explicação deste comportamento de CEL1 e CEL2 em relação à liquenana passa pela existência de alguma propriedade conformacional em cadeias longas do polissacarídeo, propriedade esta que seria fundamental ao reconhecimento da molécula do substrato. A tal situação corresponde a existência nestas enzimas de um domínio de reconhecimento deste caráter macroestrutural. Desta forma, é provável que estas duas enzimas possuam algum domínio similar em função aos domínios de ligação de celulose (CBDs) extensivamente caracterizados em diversas famílias de glicosil-hidrolases (ver Introdução).

4.5. Classificação das β -glucanases presentes na fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

A inserção das enzimas purificadas em um sistema classificatório mais amplo enfrenta uma série de dificuldades. O pequeno rendimento em massa destas enzimas a partir da fração solúvel impediu a obtenção de informações sobre sua sequência e estrutura. Isso impediu-nos de classificar as enzimas estudadas em alguma família de glicosil-hidrolases.

Mesmo a colocação inequívoca dessas enzimas em uma classe enzimática apresenta problemas relativos a sua caracterização incompleta e a ambiguidades no sistema de

classificação da IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Comitee, 1992). LAM, por exemplo, poderia ser colocada na classe 3.2.1.58 (Glucan (1-3) β -glucosidase – hidrólise sucessiva de unidades de β -D-glicose da ponta não redutora de β (1-3) glucanas, liberando o anômero α da glicose). Entretanto, não sabemos a configuração anomérica do resíduo redutor liberado após a catálise. Além disso, a colocação de LAM na classe 3.2.1.58 apresenta problemas quanto à amplitude do espectro de produtos gerados a partir do polissacarídeo. Enquanto na classe 58 colocam-se enzimas cujo ataque ao polissacarídeo produz predominantemente glicose, LAM produz em quantidades semelhantes oligossacarídeos de tamanho variado (1 a 4 unidades de glicose).

A classificação de LIQ1 também é problemática. Como esta enzima é capaz de clivar tanto laminarina (β (1-3) glucana) como liquenana (β (1-3)(1-4) glucana), pareceria razoável colocar esta enzima na classe 3.2.1.6. (Endo(1-3(4)) β -D-Glucanase – hidrólise interna de ligações (1-3) ou (1-4) em β -glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é ligado à unidade glicosídica anterior pelo carbono 3), pois, na definição das outras classes aonde se relata a hidrólise de laminarina (3.2.1.39 – Glucan Endo (1-3) β -D-Glucosidase – hidrólise de ligações glicosídicas do tipo (1-3) em β (1-3) glucanas) e 58 (ver definição acima), não se observa uma menção clara à hidrólise de polissacarídeos mistos. De fato, para a classe 3.2.1.39 relata-se, em comentário à definição da classe, que estas enzimas em geral apresentam uma pequena capacidade de hidrólise de glucanas mistas – o que não corresponde ao comportamento de LIQ1, a qual apresenta uma atividade sobre liquenana correspondente a 63% de sua atividade sobre laminarina. Contudo, o padrão de ação e o tipo de ataque da enzima não são conhecidos, o que impede-nos de encaixá-la definitivamente à descrição de qualquer uma das classes acima.

A classificação de LIQ2 sofre dos mesmos problemas expostos para a classificação de LIQ1, com a distinção de que seu padrão de ação já é razoavelmente conhecido – sendo esta uma endo enzima sem processividade, pode-se excluir a classe 58 (exo- β -(1-3)-glucanases),

tendo-se que decidir entre as classes 6 (Endo-(1-3(4))- β -Glucanase) e 39 (Glucan Endo (1-3) β -D-Glucosidase).

As duas únicas enzimas que poderiam ser classificadas com um pouco mais de segurança são CEL1 e CEL2, sendo colocadas na classe 3.2.1.4 (Cellulase – hidrólise interna de ligações glicosídicas β (1-4) em celulose, liquenana e β -glucanas cereais). As outras classes para as quais se relata a hidrólise de ligações β (1-4) possuem características que não condizem com o comportamento de CEL1 e CEL2, que são a liberação de glicose a partir do polissacarídeo (classe 74 – Glucan (1-4) β -D-Glucosidase: hidrólise de ligações em β (1-4) glucanas de maneira a remover unidades sucessivas de glicose) e a liberação de celobiose a partir de celulose (classe 91 – Cellulose (1-4) β -D-Cellobiosidase: hidrólise de ligações glicosídicas β (1-4) em celulose e celotetraose, liberando celobiose da ponta não redutora das cadeias). Além disso, nas classes 74 e 91 não há referência à hidrólise de polissacarídeos mistos, referência existente na classe 4.

A classificação mais provável, até este momento, de cada uma destas enzimas está exposta na tabela 23. É importante ressaltar que esta é uma tentativa inicial de classificação, podendo estar sujeita a alterações. Sem dúvida, para que se tenha uma colocação inequívoca destas enzimas no sistema da IUBMB, é necessário um estudo mais detalhado da especificidade e do mecanismo de cada uma delas.

Tabela 23 – E.C.s das β -glucanases purificadas a partir da fração solúvel do tubo digestório de *P. americana*.

Enzima	E.C.
LAM	3.2.1.39.
LIQ1	3.2.1.6.
LIQ2	3.2.1.6.
CEL1	3.2.1.4.
CEL2	3.2.1.4.

4.6. Funções dos sistemas β -glucanásicos de *P. americana*.

Um ataque enzimático eficiente a substratos complexos como as β -glucanas deve levar em consideração as heterogeneidades intrínsecas ao substrato, já descritas e consideradas na Introdução. Nos sistemas β -glucanásicos de *P. americana* verificaram-se três tendências principais quanto a constituição de sistemas β -glucanásicos eficientes:

- 1) A presença de diversas enzimas com espectros de atuação diferenciados. Esse fato proporciona a hidrólise abrangente de uma grande gama de substratos, pela sobreposição de especificidades ligeiramente distintas. A presença de três tipos de especificidade (laminarina (LAM); hemiceluloses (LIQ1 e LIQ2) e celulose (CEL1 e CEL2)) proporciona o ataque a todas as glucanas presentes na dieta do inseto, lineares e mistas. Por outro lado, um mesmo substrato pode ser hidrolisado por diversas enzimas com diferentes especificidades.
- 2) A presença de endo (LIQ2, CEL1 e CEL2) e exo-glucanases (LAM e LIQ1, classificação tentativa), enzimas com padrões de ação e tipos de ataque diferenciados, permite a hidrólise eficiente do polissacarídeo. A atuação conjunta destes dois tipos de enzimas leva invariavelmente a um incremento das atividades originais de cada tipo isolado, fenômeno conhecido como sinergismo cinético (Suga et al., 1975). Uma interpretação simples é a formação, por parte das endo-enzimas, de um número de sítios de ligação para as exo-enzimas maior do que o inicial.
- 3) Podem ser encontrados tipos de atividade em concordância com aspectos estruturais macromoleculares do substrato, como no caso de CEL1 e CEL2, que aparentemente reconhecem a conformação de uma glucana de cadeia longa, provavelmente associada a outras cadeias polissacarídicas. Considerando que as glucanas ingeridas pelo inseto invariavelmente se encontram em agregados polissacarídicos insolúveis, a necessidade de enzimas capazes de lidar com substratos complexados ou insolúveis é notória.

Contudo, a existência de duas lacunas no estudo aqui apresentado impede a generalização e confirmação das três tendências acima para os sistemas β -glucanásicos de *P. americana*.

1) Não se observa, ou não foi demonstrada, a presença de uma exo-enzima capaz de hidrolisar celulose. Contudo, este papel pode ser desempenhado pelas enzimas presentes no Material 1, CELBP1 ou CELBP2, os quais não foram purificados ou caracterizados.

2) Não se comprovou a capacidade de hidrólise de laminarina ou liquenana em seu estado insolúvel. Neste sentido, seriam necessários mais estudos da especificidade de LAM, LIQ1 e LIQ2.

Os sistemas β -glucanásicos de *P. americana* mostram-se, a princípio, capazes de exercer as três funções delineadas para a digestão de β -glucanas em insetos em diferentes extensões: aproveitamento celulose e hemiceluloses como fonte de energia, desarranjo estrutural do alimento e defesa do epitélio. Entretanto, algumas considerações devem ser realizadas quanto ao cumprimento de cada um destes papéis fisiológicos.

Sistemas de hidrólise de recursos lignocelulósicos são classificados como completos ou incompletos, de acordo com sua capacidade de hidrólise de celulose cristalina. Três elementos básicos parecem ser essenciais para a constituição de um sistema celulásico completo (Klesov, 1991):

- 1) A presença de uma celobiohidrolase;
- 2) A presença de uma endoglucanase fortemente aderida à celulose cristalina e
- 3) A presença de uma endoglucanase cujo produto principal de hidrólise seja glicose.

Nenhuma das três características acima pôde ser demonstrada para as enzimas estudadas até o momento. CEL1 e CEL2 não produzem glicose a partir de celulose cristalina, embora possam preencher os requisitos 1 e 3. O requisito 2 poderia ser preenchido por alguma das formas não estudadas, do Material 1, CELBP1 ou CELBP2.

Com os dados obtidos até agora, o sistema celulásico de *P. americana* seria um sistema incompleto. Em se demonstrando os requisitos 1 e 3 para algum dos componentes do sistema, poderíamos imaginar a utilização deste sistema celulásico na obtenção de glicose a partir das paredes celulares ingeridas pelo animal. É possível que isso ocorra, uma vez que já foi demonstrado que as β -glicosidases de insetos apresentam ampla especificidade, podendo clivar dissacarídeos resultantes de várias β -glucanas (Scrivener *et al.*, 1997; Scrivener *et al.*, 1998). Entretanto, nenhum dos componentes do sistema de hidrólise de hemiceluloses teve a capacidade de ataque a substratos insolúveis avaliada.

A melhora na performance de animais de criação (geralmente porcos e galinhas) alimentados com dietas suplementadas com diferentes tipos de glucanases e xilanases é um fato extensamente documentado (Thacker and Campbell, 1999). A suplementação enzimática de frangos é uma prática comum na Europa e nos Estados Unidos. Recentemente, demonstrou-se que a suplementação permite a criação destes animais com dietas altamente refratárias, que de outra forma não poderiam ser aproveitadas como alimento (Onilude and Oso, 1999). As β -glucanases de *P. americana* podem estar atuando neste sentido, permitindo o aproveitamento de materiais refratários, através do desarranjo de estruturas celulósicas e hemicelulósicas. A digestão de hemiceluloses (no caso, liquenana em cereais) pode ter um papel fundamental neste tipo de desarranjo das estruturas alvo, dado que é este tipo de carboidrato o responsável pela coesão entre celulose e lignina observada em tecidos vegetais. A ruptura do envoltório de lignina é reconhecidamente o passo limitante no ataque de material de origem vegetal por sistemas celulásicos de fungos e bactérias (Fan *et al.*, 1987). Assim sendo, os sistemas laminarinásico, liquenásico e celulásico atuariam em conjunto na digestão do inseto; a presença isolada de qualquer um destes sistemas seria incapaz de atingir o objetivo de ruptura da parede celular vegetal. Esta conjuntura provavelmente explica a alta diversidade de tipos β -glucanásicos encontrados no animal.

Ao considerar a imunidade do epitélio digestório de insetos ao ataque de agentes infecciosos, devemos considerar que a superfície exposta a micróbios ingeridos com o alimento ou presentes na flora é a membrana peritrófica, de natureza quitinoproteica. Contudo, apesar da natureza não tecidual e nutritiva desta membrana, esta não é, em condições normais, foco de fixação e crescimento bacteriano. Imaginamos duas hipóteses para explicar esta aparente imunidade:

- 1) A renovação constante (por síntese e descamação) e excreção pelas fezes da membrana peritrófica renovaria a superfície exposta à população bacteriana, diminuindo a possibilidade de infecção pela eliminação de superfícies em fases iniciais de colonização;
- 2) A presença de algum fator inibitório ao crescimento microbiano ajudaria a manter os microrganismos da flora e do alimento ingerido em níveis populacionais reduzidos.

A primeira das hipóteses acima possui o embasamento das observações relativas à síntese e renovação da membrana peritrófica em diversas ordens de insetos; contudo, para a segunda hipótese, não se conhecem evidências experimentais contundentes. Diversos mecanismos de defesa contra patógenos em insetos já foram descritos, sendo a maioria absoluta destes localizada na hemolinfa. Os exemplos mais conhecidos são peptídeos antimicrobianos (Hultmark *et al.*, 1980), proteínas ligantes de elementos estruturais definidos (Minnick *et al.*, 1986), presentes em paredes fúngicas ou bacterianas, e até mesmo lisozimas (Mulnix and Dunn, 1994; Russel and Dunn, 1991). Contudo, ao considerar a imunidade do tubo digestório ao longo da vida do adulto, não se encontram menções expressivas a nenhum destes três mecanismos. Uma exceção talvez seja o estudo de lisozimas nos Diptera Cyclorrapha. Entretanto, neste caso, as enzimas possuem uma função eminentemente digestória, associada ao aproveitamento dos conteúdos celulares das grandes quantidades de bactérias ingeridas pelo inseto, sendo esta sua principal fonte de proteínas (Regel *et al.*, 1998).

A capacidade de LIQ1 de lisar células de *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciada no ensaio da figura 42, pode ser um indicio de que algumas das β -glucanases presentes no tubo digestório de insetos tenham um papel de controle da população bacteriana. Contudo, é difícil saber até que extensão este papel poderia prevalecer sobre a sua função digestória, ou qual seria de fato a sua função original. A utilização de lisozimas como proteção ao epitélio possui eficiência limitada ao ataque de bactérias, enquanto que a utilização de uma quitinase para o controle fúngico é claramente incompatível com a natureza quitino-proteica da membrana peritrófica. Além disso, deve-se considerar que em geral a quitina é um elemento minoritário na parede de fungos, ausente em diversas categorias deste reino (Farkaš, 1979); o exemplo clássico são as leveduras, aonde a localização deste polímero se limita a pequenas quantidades encontradas nos brotos reprodutivos (Farkaš, 1979). A parede das células vegetativas é constituída majoritariamente por uma $\beta(1-3)(1-6)$ glucana pouco ramificada e por fosfomananas ligadas a proteínas diversas. A glucana é responsável pelo retículo estrutural e pela rigidez da parede celular; a fosfomanana parece ser o meio de fixação (através de interações com a glucana) de proteínas cujo endereçamento é o próprio envoltório da célula. Fosfomananases de origens diversas não são capazes de lisar células de levedura, enquanto que tanto exo como endo- $\beta(1-3)$ -glucanases o são. A quitina é um elemento predominante apenas em se tratando da parede de alguns fungos filamentosos, os quais, em diversos casos também podem ter suas paredes degradadas por uma β -glucanase (Farkaš, 1979).

Este é o primeiro relato da capacidade lítica de uma glucanase presente no tubo digestório de um inseto, como também uma indicação de que as próprias enzimas digestórias podem ser um fator importante no estabelecimento da imunidade do epitélio digestório. O ensaio de LAM não mostra uma capacidade lítica de forma conclusiva; contudo, este resultado pode ser uma consequência da utilização de condições não-ideais de ensaio, como pequena quantidade de enzima, pH ou mesmo força iônica.

Aparentemente, LIQ1 assemelha-se às $\beta(1-3)$ glucanases líticas de *Bacillus* (Rombouts and Phaff, 1976). De fato, LIQ1 apresenta uma série de similaridades com a β -glucanase lítica I de *Bacillus circulans*: esta apresenta uma massa molecular de 40kDa, gera um espectro amplo de produtos de baixo grau de polimerização a partir de laminarina e pachyman, apresenta um pH ótimo de 5,7 e um Km de 0,01% para laminarina solúvel (*Laminaria cloustoni*), além de clivar eficientemente β -glucanas mistas. Rombouts and Phaff (1976) imaginam que a capacidade lítica desta enzima esteja relacionada ao seu baixo valor de Km para este substrato. Embora LIQ1 apresente um Km para laminarina solúvel 16 vezes maior que o da enzima de *Bacillus*, deve-se considerar a utilização de polissacarídeos distintos na determinação deste parâmetro (o utilizado em nossos ensaios provém de *Laminaria digitata* e possui um grau de ramificação maior).

4.7. Origem das β -glucanases de *P. americana*.

A presença significativa de microorganismos no intestino posterior, aliada à presença de simbiontes intimamente ligados às células do epitélio do intestino médio de *P. americana* (Bell and Adiyodi, 1982) levanta a possibilidade de que estas enzimas não estejam sendo secretadas propriamente pelo inseto. A observação de semelhanças entre as enzimas purificadas e algumas enzimas bacterianas (por exemplo, pH ótimos, especificidade de CEL1 e CEL2, o comportamento lítico de LIQ1) poderia apenas resultar da secreção de algumas das formas purificadas a partir da fração solúvel do tubo digestório por alguma bactéria cujo habitat seja o intestino do inseto. Sempre é necessário também descartar a possibilidade da enzima ser proveniente do alimento que o animal ingere.

Contudo, algumas evidências experimentais indicam que as celulasas e hemicelulasas envolvidas nos processos digestórios em *P. americana* (intestinos anterior e médio) podem realmente ter sua origem nos próprios tecidos do animal:

- 1) A fração solúvel de *Hordeum vulgare* ingerida pelo inseto não apresenta atividade sobre laminarina ou CMC. Para que a atividade sobre liquenana encontrada no

tubo digestório de *P. americana* fosse proveniente deste material, o inseto teria que concentrar as enzimas presentes em cerca de 7,5 gramas do alimento, o que corresponde a 7,5 vezes o peso médio do animal.

- 2) As formas enzimáticas estudadas (LAM, LIQ1, LIQ2, CEL1 e CEL2) podem ser isoladas apenas do intestino anterior e do intestino médio, não sendo encontradas no intestino posterior. Este último é a região aonde se encontra a maioria absoluta dos microorganismos da flora intestinal do inseto (Bell and Adiyodi, 1982), e, de uma forma geral, não se observa a passagem de enzimas desta parte do tubo digestivo para o intestino médio.
- 3) Recentemente, celulases de naturezas distintas têm sido demonstradas em diferentes ordens de insetos; em besouros (*Ergates faber*), cupins (*Nasutitermes walkeri*, *Macrotermes mulleri*, *Reticulitermes speratus*) e baratas (*Paneshia cribrata*)(Terra & Ferreira, 1994; Watanabe et al., 1997; Watanabe et al., 1998; Scrivener and Slaytor, 1994). Especialmente significativa é a imunocitocalização e clonagem da celulase de *R. speratus*, um térmita inferior, caracterizado por possuir uma abundante flora associada ao intestino posterior. Além disso, a imunocitocalização de celulases sendo secretadas pelas glândulas salivares em *Paneshia cribrata* indica que membros de Blattodea (ordem de *P. americana*) também podem secretar este tipo de enzima (Scrivener, Zhao, Slaytor, 1997).

Apesar das considerações acima, não é possível afirmar categoricamente que *P. americana* secreta qualquer tipo de β -glucanase. O baixo rendimento na purificação das formas estudadas indica que a obtenção de anticorpos para estas enzimas (não considerando as enzimas CELBP1 e CELBP2, não purificadas até a homogeneidade) é inviável. Sendo assim, provas irrefutáveis de secreção ficam limitadas à clonagem e hibridização de genes relacionados (e de seus produtos de transcrição) no genoma do inseto.

4.8. β -Glucanases de *P. americana* e de outros insetos.

No que se refere a β -glucanases de insetos, os esforços da comunidade científica se concentraram mais no estudo de celulases. Invariavelmente, o foco de interesse é uma espécie de inseto cuja maior parte da dieta constitui-se de madeira. Mesmo assim, o número de trabalhos é bastante reduzido: até o presente momento, apenas cinco insetos tiveram algum tipo de atividade celulásica purificada e caracterizada em mais detalhe. Algumas características das celulases isoladas a partir de insetos até o presente momento encontram-se listadas na tabela 24.

Tabela 24 – Resumo de algumas propriedades das celulases purificadas a partir de insetos até o presente momento. MMr – Massa Molecular relativa.

Inseto	Ordem	Nome	MMr	pH ótimo	Referência
<i>Ergates faber</i>	Coleoptera (besouros)	A	25.000	4,5	Chararas et al., 1983
<i>Ergates faber</i>	Coleoptera (besouros)	B	57.000	5,2	Chararas et al., 1983
<i>Ergates faber</i>	Coleoptera (besouros)	C	70.000	5,2	Chararas et al., 1983
<i>Macrotermes mulleri</i>	Isoptera (cupins)	II	52.000	4,4	Rouland et al., 1988
<i>Reticulitermes speratus</i>	Isoptera (cupins)	YEG1	42.000	6,0	Watanabe et al., 1997
<i>Reticulitermes speratus</i>	Isoptera (cupins)	YEG2	41.000	6,0	Watanabe et al., 1997
<i>Panesthia cribrata</i>	Dictyoptera (baratas)	EG1	53.600	n.d.	Scrivener and Slaytor, 1994
<i>Panesthia cribrata</i>	Dictyoptera (baratas)	EG2	48.800	n.d.	Scrivener and Slaytor, 1994
<i>Periplaneta americana</i>	Dictyoptera (baratas)	CEL1	71.600	6,0	este trabalho
<i>Periplaneta americana</i>	Dictyoptera (baratas)	CEL2	72.700	6,0	este trabalho

Todas as enzimas da tabela 24 são capazes de hidrolisar CMC e celulose cristalina. É importante destacar o estudo do componente I_T em *M. mulleri* (Rouland et al., 1988) e de duas enzimas capazes de hidrolisar celulose cristalina em *Nasutitermes walkeri*, não

purificadas até a homogeneidade: uma libera glicose como principal produto e a outra apenas cliva ligações internas do polímero (Schulz et al., 1986).

Apenas em *Reticulitermes speratus* e em *P. cribrata* obteve-se uma prova conclusiva da secreção de celulasas pelo animal (imunocitocalização). Nos dois casos, as celulasas purificadas e estudadas são secretadas pelas glândulas salivares (Watanabe et al., 1997; Scrivener et al., 1997). Em *Reticulitermes speratus* o gene referente a uma das duas celulasas purificadas foi clonado e caracterizado (Watanabe et al., 1998). Além disso, a proximidade taxonômica entre *Paneshia cribrata* e *P. americana* torna especialmente interessante a comparação entre os sistemas celulásicos presentes nos tubos digestórios dos dois insetos.

A diferença entre os rendimentos das marchas de purificação das enzimas de *R. speratus*, *P. cribrata* e *P. americana* é considerável. Enquanto a purificação de 1mg de cada enzima dos dois primeiros insetos aparentemente é um procedimento trivial, a purificação de 1µg de cada uma das formas presentes em *P. americana* mostra-se um procedimento experimental extremamente trabalhoso. As massas moleculares relativas das enzimas de *R. speratus* (~40.000) e de *P. cribrata* (~50.000) são mais parecidas entre si do que com as das enzimas de *P. americana* (~70.000). Contudo, deve-se considerar que alguns destes valores foram obtidos através de SDS-PAGE, técnica que muitas vezes não retrata com fidelidade a massa molecular de uma proteína.

Os valores de pH ótimo das celulasas de *R. speratus* e *P. americana* encontram-se em estreita concordância – surpreendentemente, tais parâmetros ainda não foram determinados para EG1 e EG2. Contudo, é bom ter em mente que estes valores podem variar um pouco em outros insetos, como mostra a tabela 24, mesmo obtendo-se sempre um valor de pH ótimo ligeiramente ácido.

As enzimas dos três insetos (*P.americana*, *R. speratus*, *P. cribrata*) são capazes de clivar CMC e celulose cristalina, sendo mais ativas sobre este primeiro substrato. Não foi estudada uma possível atividade das enzimas de *R. speratus* e *P. cribrata* sobre liquenana. As

enzimas de *P. americana* (CEL1 e CEL2) diferem radicalmente das enzimas dos outros dois insetos quanto à relação entre suas capacidades de hidrólise de celulose cristalina e de hidrólise de CMC, como pode ser observado na tabela 25. Aparentemente, a enzima de *P. americana* possui uma capacidade de ligar-se a AVICEL comparativamente maior. Deve-se ter em mente, contudo, que enzimas de outros insetos mostram atividades hidrolíticas sobre o substrato cristalino muito maiores que as das enzimas de *P. americana*. Considerando que no ensaio das enzimas de *P. americana* foram quantificados apenas os produtos solúveis da ação enzimática, talvez CEL1 e CEL2 tenham uma boa capacidade de hidrolisar celulose cristalina, como observado em *E. faber* e *M. mulleri* (ver tabela 25).

Tabela 25. Razões entre a taxa de liberação de poder redutor a partir de CMC e a partir de AVICEL (microcelulose cristalina).

Inseto	Enzima	CMC/AVICEL	Referência
<i>E. faber</i>	A	2	Chararas et al., 1983
<i>M. mulleri</i>	I _T	17	Rouland et al, 1988
	II	7,6	Rouland et al, 1988
<i>R. speratus</i>	YEG1	3.100	Watanabe et al, 1997
	YEG2	7.600	Watanabe et al, 1997
<i>P. cribrata</i>	EG1	5.200	Scrivener and Slaytor, 1994
	EG2	3.500	Scrivener and Slaytor, 1994
<i>P. americana</i>	CEL1	37	este trabalho
	CEL2	105	este trabalho

Através da comparação dos parâmetros cinéticos relativos à hidrólise de CMC pelas enzimas dos três insetos (tabela 26) verifica-se que enquanto CEL1 e CEL2 apresentam valores de K_m mais próximos de EG1 e EG2. Seus valores de k_{cat} são mais próximos aos de YEG1 e YEG2. É interessante ressaltar que para todas as enzimas o valor de K_m é bastante

alto, comparando-se aos valores obtidos para $\beta(1-3)$ glucanases. Tal fato pode ser um reflexo da presença dos grupos substituintes na cadeia de carboximetilcelulose.

Tabela 26 – Parâmetros cinéticos relativos à hidrólise de CMC por celulasas de diferentes insetos.

Inseto	Enzima	K_m (%)	k_{cat} (seg ⁻¹)	Referência
<i>P. cribrata</i>	YEG1	0,94	19,6	Scrivener and Slaytor, 1994
	YEG2	0,68	72	Scrivener and Slaytor, 1994
<i>R. speratus</i>	EG1	0,18	367	Watanabe et al, 1997
	EG2	0,15	369	Watanabe et al, 1997
<i>P. americana</i>	CEL1	1,05	280	este trabalho
	CEL2	1,35	316	este trabalho

Como a caracterização inicial do padrão de ação de CEL1 e CEL2 se deu utilizando apenas liquenana e CMC como substratos, a comparação com os resultados obtidos para enzimas de outros insetos, relativos aos produtos de ação sobre celulose cristalina, não é possível. É importante ressaltar que as classificações propostas para estas glucanases de insetos se dão invariavelmente com base no espectro de produtos de baixo grau de polimerização formado, ou no padrão de ação da enzima sobre oligossacarídeos de cadeia curta (até 5 glicoses), e não no comportamento do polissacarídeo inicial ao longo do ensaio. Os dados obtidos até o momento encontram-se resumidos na tabela 27.

Tabela 25 –Padrão de ação de celulasas de diferentes insetos sobre celulose cristalina ou CMC, segundo a classificação dada por cada autor. Os produtos formados apontados são os detectados em cromatografia de camada delgada de sílica. G1-glicose; G2-celobiose; G3-celotriose; n.d.-nenhum produto detectado.

Enzima	Padrão de ação	Produtos formados	Referência
YEG1 (<i>R. speratus</i>)	endo	G1-G2	Watanabe et al, 1997
YEG2 (<i>R. speratus</i>)	endo	G1-G2	Watanabe et al, 1997
II (<i>M. mulleri</i>)	exo	G1	Rouland et al, 1988
A (<i>E. faber</i>)	exo	G1	Chararas et al., 1983
<i>Nasutitermes walkeri</i>	exo	G1-G2-G3	Schulz et al., 1986
<i>Nasutitermes walkeri</i>	endo	n.d.	Schulz et al., 1986
EG1 (<i>P. cribrata</i>)	endo	G2-G3	Scrivener and Slaytor, 1994
EG2 (<i>P. cribrata</i>)	endo	G2-G3	Scrivener and Slaytor, 1994

Observando-se a tabela 25, verifica-se que enzimas com um espectro muito parecido de produtos têm classificações diferentes. EG1 e EG2 são classificadas como endoenzimas, enquanto uma das enzimas de *N. walkeri* é classificada como exoenzima. Os experimentos realizados não são suficientes para indicar qual parte da cadeia do polissacarídeo está sendo atacada pela enzima.

A classificação destas enzimas dentro do sistema de classes enzimáticas da IUBMB sofre, assim, dos mesmos problemas expostos anteriormente em relação aos dados obtidos para as enzimas de *P. americana*. Parece proceder apenas a classificação da endo enzima de *N. walkeri* – uma endo glucanase sem processividade. Não é possível dizer até o presente se há sistemas celulásicos completos em insetos, embora eles tenham sido classificados como incompletos.

O estudo do sistema celulásico de *P. cribrata* resultou na verificação de um sistema multi-enzimático bastante complexo, com pelo menos seis atividades distintas. O mesmo parece ocorrer em *P. americana*, aonde puderam ser separadas cinco diferentes enzimas

capazes de hidrolisar CMC. Estes dois sistemas, à primeira vista, parecem ser bastante distintos do sistema de *R. speratus*, o qual compõe-se, de acordo com os dados obtidos até o presente momento, de apenas duas atividades. Contudo, o trabalho realizado a partir de espécimes de *R. speratus* pode consistir em uma caracterização incompleta do conjunto de enzimas do inseto, pois algumas β -glucanases podem ter ficado retidas no papel aonde é filtrado o homogeneizado dos animais antes da purificação das enzimas.

Em *Rhagium inquisitor* (Coleoptera) há uma laminarinase semelhante à encontrada em *P. americana*. Ela não é capaz de clivar liquenana, apresenta pH ótimo ligeiramente ácido (5,5) e padrão de ação com classificação incerta (no caso, de endo-glucanase). Esta enzima apresenta uma massa molecular de cerca de 100kDa (Chipoulet and Chararas, 1984), enquanto a laminarinase de *P.americana* tem um Mr de 46.000. Entretanto, a dimerização de β -glucanases é um fenômeno bastante conhecido na literatura (Sanchez et al., 1982).

Só encontra-se uma enzima semelhante a LIQ2 no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Orthoptera), sua laminarinase digestiva. Purificada e caracterizada em nosso laboratório (dados não publicados), cliva laminarina e liquenana com eficiências relativas de 100 e 85%, e é inibida pelo substrato (laminarina). Até o momento nenhuma atividade exclusiva sobre liquenana foi isolada a partir de insetos; em *Rhagium inquisitor*, há evidências eletroforéticas da existência deste tipo de enzima (Chipoulet and Chararas, 1985).

A resposta a várias questões remanescentes quanto à natureza, papel fisiológico e evolução das β -glucanases de insetos só poderá ser alcançada com outros estudos sobre estas enzimas. Por exemplo, refinamentos na detecção do padrão de ação e da organização do sítio ativo, mecanismo de catálise e de expressão de cada enzima, além da verificação do sinergismo entre enzimas. O advento e utilização de ferramentas de biologia molecular pode vir a ser uma perspectiva bastante promissora, dado que estas enzimas são geralmente obtidas em quantidades muito reduzidas.

RESUMO

Periplaneta americana apresenta em seu tubo digestivo pelo menos oito atividades β -glucanásicas distintas. Destas, cinco puderam ser purificadas até a homogeneidade e parcialmente caracterizadas. LAM ($M_r=46.000$) apresenta atividade exclusiva sobre laminarina, é inibida por altas concentrações de substrato e gera oligossacarídeos de baixo grau de polimerização (1 a 4) a partir de laminarina solúvel. LIQ1 ($M_r=24.600$) é capaz de hidrolisar laminarina e liquenana, produzindo oligossacarídeos de grau de polimerização 1, 2 e 4 a partir de laminarina solúvel e um único oligossacarídeo (grau de polimerização entre 3 e 4) a partir de liquenana. LIQ 2 ($M_r= 22.300$) é capaz de clivar laminarina e liquenana e é inibida por laminarina, clivando apenas ligações internas ao polímero. CEL1 e CEL2 ($M_r=71.600$ e 72.700) clivam liquenana e carboximetilcelulose, também atacando apenas ligações internas destes polissacarídeos. CEL1 e CEL2 também são capazes de atacar celulose cristalina. Todas as β -glucanases purificadas apresentam um pH ótimo em torno de 6,0, próximo ao pH luminal, e são relativamente estáveis em condições fisiológicas. Estas enzimas são purificadas a partir da fração solúvel do tubo digestivo do inseto em quantidades muito pequenas (até $7\mu g$), o que inviabiliza sua caracterização estrutural refinada. Além destas proteínas, o sistema β -glucanásico de *P. americana* conta com duas celulasas de baixo peso molecular ($M_r=15.000$ e 17.000), e uma atividade ainda não caracterizada.

Aparentemente, estas enzimas estão envolvidas na digestão incompleta da celulose e hemiceluloses ingeridas pelo inseto. LIQ1 possui capacidade lítica sobre células de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo estar envolvida na defesa do epitélio contra agentes infecciosos.

ABSTRACT

P. americana midgut has at least eight β -glucanases. Five were purified and partially characterized. LAM (Mr=46,000) is active only upon soluble laminarin, is inhibited by high amounts of substrate, and releases small oligosaccharides (1 to 4 glucoses). LIQ1 (Mr=24,600) is active upon laminarin and lichenan, releasing oligosaccharides with 1,2 and 4 glucosyl residues from soluble laminarin and only one oligosaccharide, with a degree of polymerization between 3 and 4, from lichenan. LIQ2 (Mr=22,300) is active upon laminarin and lichenan and hydrolyzes only internal bond. CEL1 and CEL2 are active upon lichenan and carboxymethylcellulose, hydrolyzing internal bonds in these substrates. CEL1 and CEL2 also attack AVICEL. All β -glucanase activities have an optimum pH around 6.0 (near luminal pH) and are stable under physiological conditions. These enzymes are purified in very low amounts (up to 7 μ g from 10 animals). *P. americana* β -glucanasic system also has two cellulases of low molecular weight (Mr=15,000 and 17,000), and another not yet characterized.

Probably these enzymes are involved in incomplete digestion of cellulose and hemicellulose ingested by the insect. LIQ1 lyses *Saccharomyces cerevisiae* cells, and may be involved in epithelium defense against microorganisms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aspinall, Gerald O. (ed) (1982) The Polysaccharides – volume 1. New York: Academic Press. 340p.
- Bairoch, Amos (2000) Classification of glycosyl hydrolase families and index of glycosyl hydrolase entries in SWISS-PROT in <http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>. Release 38.0 (Jan).
- Barras, D.R., Stone, B.A (1969b) β -1,3-glucan hydrolases from *Euglena gracilis*. II. Purification and properties of the beta-1,3-glucan exo-hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 191: 342-353.
- Barras, D.R., Stone, B.A. (1969a) β -1,3-Glucan Hydrolases from *Euglena gracilis*. I. The Nature of Hydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta* 191: 329-341.
- Barret, A.J., Salvesen, G. (eds.) (1986) Proteinase Inhibitors. Amsterdam: Elsevier.
- Bauer, L.S. (1995) Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* Florida Entomology 78:414-443.
- Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* 8:548-557.
- Bell, William J., Adiyodi, K. G. (1982) The American Cockroach. London, New York: Chapman and Hall. 529p.
- Benen, J.A.E., Kester, H.C.M., Visser, J. (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *European Journal of Biochemistry* 259 (3): 577-585.
- Bochkov, A.F., Sova, V.V., Kirkwood, S. (1972) The study of the action pattern of an exo- β -(1-3)-D-glucanase. *Biochimica et Biophysica Acta* 258: 531-540.
- Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. (1998) *Pseudomonas* cellulose-binding

- domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal* 331: 775-781.
- Boyd, M.J., Logan, M.A. (1942) Colorimetric determination of Serine. *Journal of Biological Chemistry* 146: 279-287.
- Bradford, Marion M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Breznak, J.A., Brune, A. (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulosic by termites. *Annual Review of Entomology* 39: 453-487.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., Osborn, R.W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16 (3): 297-323.
- Brune, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Tibtech* 16: 16-21.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. (1990) *Invertebrates*. 1^{ed}. (7^{reimpressão}) Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers. 922p.
- Bull, A.T., Chesters, C.G.C. (1966) The Biochemistry of Laminarin and The Nature of Laminarinase. *Advances in Enzymology* 28: 325-364.
- Chapman, R.F. (1982) *The Insects – Structure and Function*. 3^{ed}. London: Hodder and Stoughton. 919p.
- Chararas, C., Chipoulet, J.M. and Courtouis, J.E., and Petek, F. (1983) Purification of three cellulases from the xylophagous larvae of *Ergates faber* (Coleoptera: Cerambycidae). *Insect Biochemistry* 13: 213-218.
- Chipoulet, J.M., Chararas, C. (1984) Purification and partial characterization of a laminarinase from the larvae of *Rhagium inquisitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 77B: 699-706.

- Chipoulet, J.M., Chararas, C. (1985) Survey and electrophoretical separation of the glycosidases of *Rhagium inquisitor* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 80B: 241-246.
- Ciruela, A., Gilbert, H., Ali, B.R.S., Hazlewood, G.P. (1998) Synergistic interaction of the cellulosome integrating protein (CipA) from *Clostridium thermocellum* with a cellulosomal endoglucanase. *FEBS Letters* 422: 221-224.
- Cleland, W. W. (1979) Substrate Inhibition. *Methods in Enzymology* 63:500-513.
- Coutinho, P. and Henrissat, B. (2000) Tables of Glycoside Hydrolase Families. in: http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf_table.htm
- Dalqvist, A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical biochemistry* 22: 99-107.
- Dänicke, S., Dusel, G., Jeroch, H., Kluge, H. (1999) Factors affecting efficiency of NSP-degrading enzymes in rations for pigs and poultry. *Agribiological Research* 52 (1): 1-24.
- Davies, G., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
- Ding, Q., Jiang, S., Zhang, L., Wu, C. (1998) Laser light-scattering studies of pachyman. *Carbohydrate Research* 308:339-343.
- Dixon, R.A. and Harrison, M. (1990) Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics* 28: 165-234.
- Dyer, J.R. (1956) Use of periodate oxidations in biochemical analysis. In: *Methods of Biochemical Analysis*, volume III.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H. (1987) *Cellulose Hydrolysis*. Berlin: Springer-Verlag. 202p.
- Farkaš, V. (1979) Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. *Microbiological Reviews* 43 (2): 117-144.
- Felton, G.W. and Gatehouse, J.A. (1996) Antinutritive plant defense mechanisms. In: Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (eds.) *The Insect Midgut*. London: Chapman and Hall. p.373-418.

- Freund, J.N., Gossé, F., Raul, F. (1991) Derivatives of plant β -glucans are hydrolysed by intestinal lactase-phlorizin hydrolase of mammals. *Enzyme* 45: 71-74.
- Freund, J.N., Jost, B., Lorentz, O., Duluc, I. (1997) Identifications of homologies of the mammalian intestinal lactase gene in non-mammals (birds and molluscs). *Biochemical Journal* 322: 491-498.
- Frissell, W.R., Meech, L.A. and Mackenzie, C.G. (1954) A simplified photometric analysis for serine and formaldehyde. *Journal of Biological Chemistry* 207:709-717.
- Gagnaire, D., Marchessault, R.H., Vincendon, M. (1975) Nuclear Magnetic Resonance of Lichenin. *Tetrahedron Letters* 45: 3953-3956.
- Gal, L., Gaudin, C., Belaich, A., Pages, S., Tardif, C., Belaich, J.-P. (1997) CelG from *Clostridium cellulolyticum*: a multidomain endoglucanase acting efficiently on crystalline cellulose. *Journal of Bacteriology* 179 (21): 6595-6601.
- GonzalezTello, P., Camacho, F., Jurado, E., Guadix, E.M. (1996) A simple method for obtaining kinetic equations to describe the enzymatic hydrolysis of biopolymers. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 67 (3): 286-290.
- Greenberg, B., Kowalski, J. and Karpus, J. (1970) Micro-potentiometric pH determination of the gut of *Periplaneta americana* fed three different diets. *J. econ. ent.* 63: 1795-1797.
- Harris, G.W., Jenkins, J.A., Commerton, I., Cummings, N., LoLeggio, L., Scott, M., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Gilbert, H.J., Pickersgill, R.W. (1994) Structure of the catalytic core of the family F xylanase from *Pseudomonas fluorescens* and identification of the xylopentaose binding sites. *Structure* 2: 1107-1116.
- Hayashi, N., Sugiyama, J., Okano, T., Ishihara, M. (1998) Selective degradation of the cellulose I α component in *Cladophora* cellulose with *Trichoderma viride* cellulase. *Carbohydrate Research* 305: 109-116.

- Hedrick, J.C. & Smith, A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel electrophoresis. *Archives of Biochemistry* 126: 155-164.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280: 309-316.
- Hilder, V.A., Boulter, D. (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection* 18: 177-191.
- Hiromi, K. (1972) Subsite affinities and action patterns of amylases. In: Funatsu, M. (ed.) *Proteins: Structure and Function*. New York: Halsted.
- Hiromi, K., Nitta, Y., Numata, C., Ono, S. (1973) Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory. *Biochimica et Biophysica Acta* 302: 362-375.
- Hogan, M.E., Schulz, M.W., Slaytor, M., Czolij, R.T. and O'Brien, R.W. (1988) Components of termite and protozoal cellulases from the lower termite *Coptotermes lacteus* Froggatt. *Insect Biochemistry* 18: 45-51.
- Howell, J.A., Stuck, J.D. (1975) Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnology and Bioengineering* XVII: 873-893.
- Huang, A. A. (1975) Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system. *Biotechnology and Bioengineering* XVII: 1421-1433.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G. (1980) Insect Immunity – purification and properties of 3 inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 106 (1): 7-16.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Nomenclature Comitee. (1992) *Enzyme Nomenclature*. San Diego: Academic Press. 863p.
- Irwin, D., Shin, D., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A., Wilson, D.B. (1998) Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domanis of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology* 180 (7): 1709-1714.

- Jackson, E.L. (1944) Periodic acid oxidation. In: Adams, R. (ed.) Organic Reactions, vol. II. New York: Wiley.
- Jaroni, D., Scheideler, S.E., Beck, M., Wyatt, C. (1999) The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation. 1. Late egg production efficiency, egg yields, and egg composition in two strains of leghorn hens. Poultry Science 78: 841-847.
- Jeffries, T.W., Macmillan, J.D. (1981) Action Patterns of (1-3)- β -D-glucanases from *Oerskovia xanthineolytica* on laminaran, lichenan, and yeast glucan. Carbohydrate Research 95: 87-100.
- Jones, D., Gordon, A.H., Bacon, J.S.D. (1974) Co-operative Action by Endo- and Exo- β -(1-3)-glucanases from Parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotium* (Lib.) de Bary. Biochemical Journal 140: 47-55.
- Kataeva, I., Guglielmi, G., Béguin, P. (1997) Interaction between *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD and polypeptides derived from the cellulosome integrating CipA: stoichiometry and cellulolytic activity of the complexes. Biochemical Journal 326: 617-624.
- Keitel, Thomas, Simon, Ortwin, Borriss, Rainer, Heinemann, Udo (1993) Molecular and active-site structure of a Bacillus 1,3-1,4-beta-glucanase. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 90: 5287-5291.
- Klesov, A.A. (1991) Biochemistry and Enzymology of Cellulose Hydrolysis. Biokhimiya 55:1295-1318.
- Koshland, D.E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society 28: 416-436.
- Krystal, Gerald, MacDonald, Chris, Munt, Brad, Ashwell, Stephen. (1985) A method for Quantitating Nanogram Amounts of Soluble Protein Using the Principle of Silver Binding. Analytical Biochemistry 148: 451-460.

- Kundu, R.K., Dube, S., Dube, D.K. (1988) Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 3. Isolation, purification and characterization of multiple forms of endoglucanase. *Enzyme Microbiological Technology* 10: 100-109.
- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lehninger, Albert L. (1990) *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 725p.
- Liu, X., Gao, P., Cheng, Y. (1992) Purification and characterization of 1,4- β -D-Glucan glucanohydrolase from *Paecilomyces* sp. S28. *Biotechnology Applied Biochemistry* 16: 134-143.
- Mac Fadyen, D.A. (1945) estimation of formaldehyde in Biological mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 158: 107-133.
- Maleck, K. and Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science* 4 (6):215-219.
- Maleck, K. and Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science* 4(6): 215-219.
- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C. (1973) The Structure of a β -(1-3)-D-Glucan from Yeast Cell Walls. *Biochemical Journal* 135: 19-30.
- Marana, S.R., Ferreira, C. and Terra, W.R. (1992) Consumption of sugars, hemicellulose, starch, pectin and cellulose by the grasshopper *Aracris* (sic) *flavolineata*. *Entomol. exp. appl.* 65: 113-117.
- McCleary, B.V. (1988) Lichenase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology* 160: 572-575.
- McGaughey, W.H., Whalon, M.E. (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258:1451-1455.
- Minnick, M.F., Rupp, R.A., Spence, K.D. (1986) A bacterial-induced lectin wich triggers hemocyte coagulation in *Manduca sexta*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137 (2): 729-735.

- Mishima, T., Hisamatsu, M., York, W.S., Teranishi, K., Yamada, T. (1998) Adhesion of β -D-glucans to cellulose. *Carbohydrate Research* 308: 389-395.
- Mori, Y. (1992) Purification and characterization of an endoglucanase from the cellulosomes (multi-component cellulase complexes) of *Clostridium thermocellum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1198-1203.
- Mulnix, A.B., Dunn, P.E. (1994) Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24 (3): 271-281.
- Murao, S., et al. (1993) *Journal of Biological Chemistry* 268: 349.
- Nanjo, F., Usui, T., Suzuki, T. (1984) Mode of action of an exo- β -(1-3)-D-glucanase on the laminaran from *Eisenia bicyclis*. *Agricultural Biological Chemistry* 48 (6): 1523-1532.
- Nelson, T.E. (1975) The attack mechanism of an exo-1,3- β -glucosidase from *Basidiomycete* sp. QM 806. *Biochimica et Biophysica Acta* 377: 139-145.
- Nelson, T.E., Lewis, B.A. (1974) Separation and Characterization of the Soluble and Insoluble Components of Insoluble Laminarin. *Carbohydrate Research* 33: 63-74.
- Noelting, G. and Bernfeld, P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques. III. La beta-amylase: dosage d'activité at contrôle de l'absence d'alfa-amylase. *Helv. Chim. Acta* 31, 286-290.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) (1983) Symbolism and terminology in Enzyme kinetics. Recommendations 1981. *Biochemical Journal* 213: 561-571.
- Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R.A.J., Withers, S.G., Rose, D.R. (1998) Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry* 37: 4751-4758.
- O'Brien, G.W., Veivers, P.C., Mc Ewen, S.E., Slaytor, M. and O'Brien , R.W. (1979) The origin and distribution of cellulase in the termites *Nasutitermes exitiosus* *Insect Biochemistry* 9: 619-625

- Okada, G. (1985) Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 1257-1265.
- Onilude, A.A., Oso, B.A. (1999) Effect of fungal enzyme mixture supplementation of various fibre-containing diets fed to broiler chicks – 1: Performance and carcass characteristics. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15 (3):309-314.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23473-23476.
- Perlin, A.S., Suzuki, S. (1961) The Structure of Lichenin: Selective Enzymolysis Studies. *Canadian Journal of Chemistry* 40: 50-56.
- Ravindran, V., Selle, P.H., Bryden, W.L. (1999) Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Science* 78: 1588-1595.
- Rees, D.A. (1977) Polysaccharide shapes. London: Chapman and Hall. 80p.
- Regel, R., Matioli, S.R., Terra, W.R. (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 309-319.
- Rombouts, F.M., Phaff, H. J. (1976) Lysis of yeast cell walls. Lytic β -(1-3)-Glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *European Journal of Biochemistry* 63: 121-130.
- Rouland, C., Civas, A., Renoux, J. and Petek, F. (1988) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mulleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B: 449-458.
- Russell, V.W., Dunn, P.E. (1991) Lysozyme in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 17 (2-3): 67-80.
- Sánchez, A., Nebreda, A.R., Villa, T.G. (1982) Self-associating properties of yeast exo- β -glucanases are dependent on the ionic strength. *FEBS Letters* 145 (2): 213-216.

- Sangseethong, K., Meunier-Goddik, L., Tantasucharit, U., Liaw, E.-T., Penner, M.H. (1998) Rationale for particle size effect on rates of enzymtic saccharification of microcristaline cellulose. *Journal of Food Biochemistry* 22: 321-330.
- Schomburg, D., Salzmann, M. (1991) *Enzyme Handbook 3*. Berlin, New York, Tokyo: Springer-Verlag. Folhas soltas.
- Schulz, M.W., Slaytor, M., Hogan, M., O'Brien, R.W. (1986) Components of cellulase from the higher termite, *Nasutitermes walkeri*. *Insect Biochemistry* 16: 929-932.
- Scrivener, A.M. and Slaytor, M. (1994) Properties of the Endogenous cellulase from *Panesthia cribrata* Saussure and purification of Major endo- β -1,4-glucanase components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24(3): 223-231.
- Scrivener, A.M., Watanabe, H., Noda, H. (1997) Diet and Carbohydrate Digestion n the Yellow-spotted Longicorn Beetle *Psacothaea hilaris*. *Journal of Insect Physiology* 43 (11): 1039-1052.
- Scrivener, A.M., Watanabe, H., Noda, H. (1998) Properties of digestive carbohydrase activities secreted by two cockroaches, *Panesthia cribrata* and *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118B (4): 837-843.
- Scrivener, A.M., Zhao, L., Slaytor, M. (1997) Biochemical and Immunological Relationships between endo- β -1,4-glucanases from cockroaches. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118B (4): 837-843.
- Segel, I. (1975) *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1^oed. 957p.
- Seiboth, B., Hakola, S., Mach, R.L., Suominen, P.L., Kubicek, C.P. (1997) Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *Journal of Bacteriology* 179 (17): 5318-5320.
- Shaw, E. (1967) *Methods in Enzymology* 11: 677.
- Shaw, E. et al. (1965) *Biochemistry* 4: 2219.

- Spiridonov, N., Wilson, D.B. (1998) Regulation of Biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *Journal of Bacteriology* 180(14): 3529-3532.
- Stahl, Egon (Ed.) (1969) *Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. Berlin: Springer-Verlag. 2^oed. 1046p.
- Suga, K., van Dedem, G., Moo-Young, M. (1975a) Degradation of Polysaccharides by endo and exo enzymes: a theoretical analysis. *Biotechnology and Bioengineering* XVII: 433-439.
- Suga, K., van Dedem, G., Moo-Young, M. (1975b) Enzymatic breakdown of water insoluble substrates. *Biotechnology and Bioengineering* XVII: 185-201.
- Terra, W. R., Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B (1): 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C. & Baker, J.E. (1996) Compartmentalization of digestion. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (eds.) *Biology of the Insect Midgut*. p.206-235. London: Chapman and Hall.
- Terra, W.R., Ferreira, C., & de Bianchi, A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25: 487-494.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Bianchi, A.G. de (1978) Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochimica et Biophysica Acta* 524: 131-141.
- Thacker, P.A., Campbell, G.L. (1999) Performance of growing finishing pigs fed untreated or micronized hullless barley-based diets with or without beta-glucanase. *Journal of Animal and Feed Sciences* 8 (2):157-170.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., Steitz, T.A.(1996) Crystal Structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO Journal* 15:5739-5751.

- Väljamäe, P., Sild, V., Pettersson, G., Johansson, G. (1998) The initial kinetics by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. *European Journal of Biochemistry* 253: 469-475
- Watanabe, H., Nakamura, M., Tokuda, G., Yamaoka, I., Scrivener, A., Noda, H. (1997) Site of secretion and properties of endogenous endo- β -1,4-Glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese Subterranean Termite. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27 (4): 305-313.
- Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N. (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature* 394: 330-331.
- Wood, T.M. (1985) Properties of cellulytic enzyme systems. *Biochem. soc. Trans.* 13: 407-410.
- Yamamoto, M., Ezure, T., Watanabe, T., Tanaka, H., Aono, R. (1998) C-Terminal domain of β -1,3-glucanase H in *Bacillus circulans* IAM1165 has a role in binding to insoluble β -1,3-glucan. *FEBS Letters* 433: 41-43.
- Yamaoka, I., Nagatani, Y. (1975) Cellulose digestion system in the termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe). I. Producing sites and physiological significance of two kinds of cellulase in the worker. *Zool. Mag.* 84: 23-29.
- Yoshigi, N., Taniguchi, H., Sasaki, T. (1988) Purification and properties of a new endo-cellulase from *Robillarda* sp. Y-20. *Agricultural Biological Chemistry* 52: 1389-1396.
- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.V., Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Kellermann, J., Staudebauer, W.L. (1998) Multidomain structure and cellulossomal localization of the *Clostridium thermocellum* Cellobiohydrolase CbhA.

CURRICULUM VITAE

Nome: Fernando Ariel Genta

Local e data de nascimento: São Paulo/SP – 29 de julho de 1976

EDUCAÇÃO

Colégio Arquidiocesano de São Paulo (1983-1988)

Colégio Anglo Latino (1989)

Colégio Arquidiocesano de São Paulo (1990-1991)

EEPSG Major Arcy (1992)

Colégio Objetivo (1993)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1994-1997

Bacharelado em Ciências Biológicas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998-2000

Mestrado em Bioquímica

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS

Marana, S.R., Genta, F.A., Terra, W.R. e Ferreira, C. (1996) *Abracris flavolineata* laminarinase.

Apresentado na XXV^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

Marana, S.R., Genta, F.A., Terra, W.R. e Ferreira, C. (1997) Kinetic characterization of *Abracris flavolineata* (Orthoptera) digestive laminarinase. Apresentado na XXVI^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

Genta, F.A., Paninka, R.M., Terra, W.R. e Ferreira, C. (1998) Purification of *Periplaneta americana* amylase. Apresentado na XXVII^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

Genta, F.A., Marana, S.R., Terra, W.R. e Ferreira, C. (1998) Active groups and lytic activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera) laminarinase. Apresentado na XXVII^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

Genta, F.A., Terra, W.R. e Ferreira, C. (1999) *Periplaneta americana* β -glucanases. Apresentado na XXVIII^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

OCUPAÇÃO

Bolsista: FAPESP, nível mestrado.