

R 292

MARCELO DE TOFOL

Potencial do Suco Gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* como Fonte de Complexos Hidrolásicos para a Protoplastificação de Células de Vegetais Superiores

Trabalho apresentado ao curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

FLORIANÓPOLIS
1994

AC 280937

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ESTAGIÁRIO: MARCELO DE TOFOL

ORIENTADOR: PROF. M.Sc. MARCELO MARASCHIN

SUPERVISOR: PROF. Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA

LOCAL: LABORATÓRIO DE QUIMIOBIOTECNOLOGIA DE
BIOMASSA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA- UFPR.

PERÍODO: 10 DE JULHO A 15 DE AGOSTO DE 1994.

MARCELO DE TOFOL

POTENCIAL DO SUCO GÁSTRICO DE *Megalobulimus paranaguensis*
COMO FONTE DE COMPLEXOS HIDROLÁSICOS PARA A
PROTOPLASTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE VEGETAIS
SUPERIORES

Trabalho aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Santa Catarina, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: _____

Prof. M.Sc. Marcelo Maraschin

Prof. Dr. Ênio Luiz Pedrotti

Prof^a. Dra. Sônia Gonçalves Carobrez

Florianópolis, 28 de outubro de 1994.

No princípio era o Verbo, e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus. Ele estava no princípio com Deus. Todas as coisas foram feitas por intermédio dele, e sem ele nada do que foi feito se fez. A vida estava nele, e a vida era a luz dos homens. A luz resplandece nas trevas, e as trevas não prevaleceram contra ela. Houve um homem enviado por Deus, cujo nome era João. Este veio como testemunha para que testificasse a respeito da luz, a fim de todos virem a crer por intermédio dele. Ele não era a luz, mas veio para que testificasse da luz a saber: a verdadeira luz que, vinda ao mundo, ilumina a todo homem. Estava no mundo, o mundo foi feito por intermédio dele, mas o mundo não o conheceu. Veio para o que era seu, e os seus não o receberam. Mas, a todos quanto o receberam, deu-lhes o poder de serem feitos filhos de Deus; a saber: aos que creêm no seu nome; os quais não nasceram do sangue, nem da vontade da carne, nem da vontade do homem, mas de Deus. E o Verbo se fez carne, e habitou entre nós, cheio de graça e de verdade, e vimos a sua glória, glória como o unigênito do Pai.

JOÃO 1: 1-14

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana, supervisor deste estágio, pelo seu exemplo de dedicação e amor a pesquisa.
- . Ao meu orientador Prof. Marcelo Maraschin, pela sua confiança na minha capacidade de trabalho e pelo seu apoio na condução deste.
- . Ao doutorando Francisco Deschamps- do CTA- Itajaí - S.C
- . À Novo Industry pelo fornecimento “Celuclast, na pessoa do farmacêutico-bioquímico Éder Bordin.
- . A bibliotecária Maria das Dores da Silveira, pelo auxílio a todo o instante.
- . Aos amigos Sidinei Egon Simon e Annik Silva pela ajuda indispensável na digitação deste trabalho.
- . A minha família pelo apoio recebido durante a minha vida acadêmica.
- . Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram na elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

1- Introdução	08
1.1- <i>Megalobulimus paranaguensis</i>	08
1.2-Cromatografia em coluna de gel	10
1.3-Enzimas	16
1.3.1-Celulases	16
1.3.2-Hemicelulases	17
1.3.3-Pectinases	18
1.4-Protoplastos	19
1.5-Parede celular	20
2-Objetivos	23
3-Materiais e métodos	24
3.1-Vegetais	24
3.2-Coleta do molusco	25
3.3-Manejo em cativeiro	25
3.4-Extração	25
3.5-Clarificação (Pré-purificação)	30
3.6-Purificação (Cromatografia em coluna de gel G-100)	30
3.7-Espectrofotometria do suco gástrico	32
3.8-Preparo da solução digestora	34
3.9-Incubação	34
3.10-Verificação protoplastificação	34
3.11- Registro protoplastificação (Fotomicrografia)	34
3.12-Verificação de digestão de parede celular	35
4.-Resultados e discussões	36
4.1-Característica do animal	36
4.2-Purificação do material	36
4.3-Espectrofotometria do material	37
4.4-Solução digestora	37
4.5-Concentração enzimática	39
4.6-Tempo de incubação x Destruição celular	40
4.7- Registro da protoplastificação	40
4.8-Observação da digestão da parede celular e de estrutura de membrana	49
5-Conclusão	50
Bibliografia	51

LISTA DE ABREVIATURAS

M. p.: *Megalobulinus paranaguensis*
Tab.: Tabela
Fig: Figura
 μ : Micra
BAP: Benzilaminopurina
ANA: Ácido α -naftaleroacético
GA3: Ácido Giberélico
2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Kin: Cinetina
M: Molar
nm: Nanômetro
S10: Suco Gátrico de *Megalobulinus paranaguensis*
DTE- Ditiotreitól.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Megalobulimus paranaguensis*

O molusco *Megalobulimus paranaguensis* Pilsbry & Ihering (1900), de “habitat” natural no litoral paranaense, onde se alimenta da flora local, aproveita-se desta através de um variado e complexo equipamento enzimático que se faz presente no seu sistema digestivo. Neste complexo há, entre outras, enzimas hidrolásicas que efetuam a despolimerização dos polissacarídeos comuns, presentes a nível de parede celular e citoplasma de células vegetais como: celulose, hemicelulose, pectinas e outras glicanas; bem como outros carboidratos mais simples como amido e sacarose (Fontana Feijó & Duarte, 1976).

Hoje já está consolidado a exploração comercial da polivalência enzimática digestiva deste tipo de animais invertebrados; exemplos neste sentido podem ser demonstrados como os produtos obtidos a partir do caracol de jardim europeu, ou *Helix pomatia*, como “Glusulase”(New Research Products - Du Pont) e “Cetohelicase”(IBF/LKB Produkter AB) (Gebara, 1989).

As relações entre as semelhanças existentes na composição do envoltório natural, tanto de células mais simples (leveduras, fungos, algas), quanto vegetais superiores e a polivalência enzimática antes referida, todas envolvendo uma arquitetura basicamente de natureza polissacarídica, explicam a possibilidade da aplicação de preparações enzimáticas também na obtenção de “células nuas” de vegetais superiores, ou seja protoplastos (Fowke & Constabel, 1985).

Através dos dados obtidos por Gebara (1989), pode-se observar convincentemente a conveniência da exploração de M.p como alternativa para a provisão de enzimas hidrolíticas de interesse científico e tecnológico. Nas tabelas 1 e 2 aparecem dados característicos do suco gástrico de M.p e seu conteúdo proteico, respectivamente. Na (tab.3), pode-se observar o elevado teor proteico característico do suco gástrico (140 mg/ml = 14% g) que aliado ao volume que se pode obter de cada animal (Tab.2), tornam-se potencialidades atrativas e economicamente rentáveis a exploração do suco gástrico deste molusco.

De acordo com Almeida (1992) que observou o comportamento do M.p em ambiente de cativeiro, relata que estes animais quando adultos são caracteristicamente resistentes e adaptáveis as mais variadas condições.

Tabela 1- Características do molusco terrestre *Megalobulimus paranaguensis**.

Espécime	Dimensões médias (cm) (comprim. x largura)	Peso médio (g)
1. Ovo**	2,6 x 2,0	2,7 - 3,5
2. Animal		
2.1 - Recém eclodido**	3,1 x 1,9	2,4 - 3,1
2.2 - Adulto	15,0 x 6,0	130,0 - 140,0

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

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

Fonte: (Gebara, 1989).

Tabela 2- Características da secreção (suco) gástrica de *Megalobulimus paranaguensis*.

Propriedade	Valor
1. Volume médio ¹	3 a 6 ml
2. pH	5,3 a 5,5
3. Cor	marrom escuro
4. Sólidos totais ²	20 a 22 g/100 ml
5. Densidade ³	1,0836 g/ml
6. Viscosidade ⁴	1,310 cp

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

² em suco clarificado a 10 Krpm por 15 minutos.

³ método do picnômetro; 25 °C.

⁴ viscosímetro de Ostwald, 37,8 °C

Fonte: (Gebara, 1989).

Tabela 3: Determinação do conteúdo proteico do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.

Método	Amostra	mg/ml
Biureto	Suco nativo ¹	185
	Suco fracionado c/TCA ²	133
	Suco fracionado c/etanol ³	148
Lowry	Suco nativo ¹	160
	Suco fracionado c/TCA ²	126
	Suco fracionado c/etanol ³	120
Hartree*	Suco nativo	130
Bradford**	Suco nativo	> 200

* modificação do método de Lowry

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

¹ secreção gástrica total clarificada a 10 Krpm por 15 minutos

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

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

Fonte: (Gebara, 1989).

1.2- Cromatografia em coluna de gel.

A cromatografia em coluna pode ser definida como um método de análise no qual o fluxo de um solvente, ou um gás, promove a separação de substâncias por migração diferencial, a partir de uma zona delgada, em um meio suporte poroso. A importância do método reside, primariamente, no fato deste se constituir em uma ferramenta analítica de grande potencial, servindo como um meio de resolução de misturas, bem como para o isolamento e descrição parcial de substâncias previamente separadas.

O fenômeno básico envolvido na cromatografia vem a ser a migração diferencial dos compostos ao longo do meio suporte. A migração das moléculas é produzida por uma força direcionada não seletiva, qual seja o fluxo do líquido eluente (fase móvel). Assim, a separação dos componentes de uma dada mistura depende sobretudo de sua capacidade de penetração diferencial nos poros existentes no meio da separação, quando estes encontram-se submetidos à uma condição de fluxo direcionado.

Em todas as separações cromatográficas verifica-se a ocorrência de interações entre os elementos constituintes do que se convencionou chamar de sistema cromatográfico, quais sejam a

fase móvel (solvente ou eluente), a fase estacionária e os componentes da mistura amostral. O nível de interação desses elementos define o grau de retenção de uma dada substância no sistema e também a efetividade, ou seletividade, de sua separação. O conceito de seletividade- efetividade, não é completamente entendido, todavia espelha, com maior ou menor grau de precisão, a eficiência do sistema cromatográfico, independentemente do fato de se considerar a análise de uma dada mistura amostral no contexto quantitativo ou qualitativo.

As técnicas cromatográficas diferem quanto à natureza da fase móvel e da fase estacionária e, conseqüentemente, no modo pelo qual as substâncias são separadas pela fase estacionária. Se o retardamento das substâncias ocorre devido à interação destas com a superfície da fase estacionária, a técnica denomina-se cromatografia de adsorção. Por outro lado, se a separação dos compostos decorre da interação das substâncias com o volume da fase estacionária, a técnica é chamada de cromatografia de partição.

A cromatografia em gel enquadra-se dentro do conceito de cromatografia de partição, sendo que o diferencial existente entre esta modalidade e as demais técnicas cromatográficas vem a ser de que nesta, a fase estacionária consiste de um gel embebido no líquido utilizado como fase móvel.

A fase estacionária considerada nos trabalhos de cromatografia em gel consiste, via de regra, de um polímero anidro de glucose gerado por “strains” de *Leuconostoc mesenteroides* em solução contendo sacarose, denominado dextrano. Frações deste polímero “cross linked” quando tratadas com epíclorohidrina geram um composto que apresenta natureza de gel, sendo comercialmente denominado Sephadex® (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden). Em função do alto conteúdo de grupamentos hidroxila nas cadeias polissacarídicas, Sephadex® é fortemente hidrofílico, entumescendo-se na presença de água, ou soluções de eletrólitos. O nível de entumescimento é função da concentração de dextrano na solução e pelo grau de ligações cruzadas presentes no polímero, sendo um dos mais importantes parâmetros de caracterização destes géis. Para tal, expressa-se esta capacidade de entumescimento através do seu potencial de retenção de água- “water regain” Wr -, considerando-se a relação ml H₂O / g Sephadex® seco. Com base neste parâmetro, diferentes tipos de géis de Sephadex ocorrem (Tab.4), cada um apresentando um valor de Wr característico, o qual é indicado, de forma aproximada, pelo número acompanhante do tipo de Sephadex®. Assim, um Sephadex® G-25, e.g., apresenta um valor de

$Wr = 2,5 \text{ ml H}_2\text{O} / \text{g gel seco}$ e, se multiplicarmos esse valor por 2 unidades, teremos o valor aproximado do volume de gel obtido a partir de 1 g de Sephadex® seco.

TABELA 4- Propriedades físicas de tipos de Sephadex.

Tipo de Sephadex	Diâmetro de Partículas μ	Volume de Leite ml/g Sephadex Seco	Limite de Exclusão de Peptídeos e proteínas Globulares
Sephadex G-10	40 -120	2 - 3	- 700
Sephadex G-15	40 -120	2,5 - 3,5	- 1500
Sephadex G-25 Grosso	100 - 300	4 -- 6	1000 - 5000
Sephadex G-25 Médio	50 -150	4 -- 6	1000 - 5000
Sephadex G-25 Fino	20 -80	4 -- 6	1000 - 5000
Sephadex G-25 Super-fino	10 - 40	4 -- 6	1000 - 5000
Sephadex G-50 Grosso	100 - 300	9 - 11	1500 - 30000
Sephadex G-50 Médio	50 -150	9 - 11	1500 - 30000
Sephadex G-50 Fino	20 -80	9 - 11	1500 - 30000
Sephadex G-50 Superfino	10 -40	9 - 11	1500 - 30000
Sephadex G-75	40 -120	12 - 15	3000 - 70000
Sephadex G-75 Superfino	10 - 40	12 - 15	3000 - 70000
Sephadex G-100	40 - 120	15 - 20	4000 - 150000
Sephadex G-100 Superfino	10 - 40	15 - 20	4000 - 150000
Sephadex G-150	40 - 120	20 - 30	5000 - 400000
Sephadex G-150 Superfino	10 - 40	18 - 22	5000 - 400000
Sephadex G-200	40 - 120	30 - 40	5000 - 800000
Sephadex G-200 Superfino	10 - 40	20 - 25	5000 - 800000

Fonte: ("Sephadex-gel filtration in theory and practice", Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)

Adicionalmente, um mesmo tipo de Sephadex® pode apresentar granulometria variada, onde cada classe aplica-se melhor a um determinado uso, fato que deve ser considerado no momento de se definir o tipo de coluna a ser montado (Tab.5).

TABELA 5- Usos recomendados de diferentes granulometria de Sephadex.

Granulometria Gel	Aplicações
Superfino	Cromatografias e coluna de gel de alta resolução e camada delgada
Fino	Cromatografia analítica e preparativa em gel com boa taxa de fluxo e resolução
Médio e Grosso	Cromatografia industrial e preparativa em gel com alta taxa de fluxo

Fonte: (Curling, 1970).

O gel é preparado para a cromatografia por meio do inchamento de suas partículas constituintes na presença de excesso de eluente (água), ao longo de um dado período de tempo característico para cada tipo de gel (Tab.6). Subseqüentemente, um determinado volume de gel é empacotado em uma coluna de vidro (bureta, por exemplo) e estabilizado sob condição de fluxo constante de eluente, normalmente igual a 3x o volume de gel considerado.

Quando uma amostra qualquer contendo compostos de pesos moleculares discrepantes é aplicada à coluna, as moléculas de maior tamanho em relação aos poros do gel serão excluídas deste, ocorrendo somente no ambiente líquido que envolve tais partículas. No entanto, as moléculas de menor tamanho em relação aos poros do gel serão capazes de penetrá-los ocorrendo, portanto, no ambiente líquido circundante das partículas e no interior de seus poros (Figura 1). Esse fato gera o estabelecimento de uma condição de equilíbrio dinâmico entre as moléculas presentes na fase móvel e aquelas que encontram-se retidas nos poros do gel. Quando uma molécula deixa o ambiente do poro, é arrastada pelo fluxo da fase móvel em direção a base da coluna, até penetrar no poro de uma outra partícula, de modo que as moléculas de pequeno tamanho são estericamente retardadas em sua movimentação pela fase estacionária. Esse processo gera uma separação de compostos com base em um parâmetro de natureza física, qual seja o tamanho molecular, sendo que os compostos de maior tamanho serão primeiramente eluídos em relação aqueles de menor tamanho. Moléculas de tamanho intermediário serão retardadas em maior ou menor grau, de acordo com a extensão de disponibilidade de gel para estas. A velocidade de fluxo para o material amostral é função da pressão operacional empregada ao longo da sua eluição na coluna de gel. A pressão operacional é um parâmetro variável de acordo com o tipo de gel em uso (Tab.7), sendo que a não observância desse aspecto pode levar ao entupimento da coluna ao longo da eluição das amostras ("overpressure") ou, de modo contrário, a uma

velocidade de eluição reduzida, determinando um maior período de tempo para a separação dos compostos e/ou uma baixa resolução destes.

TABELA 6- Tempo de inchamento para tipos de Sephadex.

Tipo de Sephadex	Tempo mínimo de inchamento	
	a temperatura ambiente	água a 100°C
G-10, G-15, G-25, G-50	3 h	1 h
G-75	24 h	3 h
G-100, G-150, G-200	3 dias	5 h
LH-20	3 h	-

Fonte: (Curling, 1970).

Figura 1. Três estágios de uma separação simples em um leito de Sephadex. Os círculos abertos representam as gotas de Sephadex, os pontos maiores representam as moléculas maiores e os pontos menores as moléculas menores.

Fonte: (“Sephadex”- Gel Filtration in Theory and Practice”Pharmacia Fina Chemicals AB, Uppsala, Sweden).

De forma ideal, até porque envolve apenas aspectos estéricos, espera-se este tipo de comportamento para a interação entre os vários constituintes do sistema cromatográfico. Todavia, é importante considerar a possibilidade de ocorrência de outras formas de interação dentro do sistema, do tipo troca iônica, exclusão iônica e adsorção aromática, as quais modificarão, em maior ou menor intensidade, o padrão de eluição do sistema. Essas formas de interação poderão

ser empregadas com vantagem para a separação de espécies moleculares de tamanhos semelhantes, porém com natureza química distinta.

TABELA 7- Ótimo de pressão operacional recomendado para tipos de Sephadex.

Tipo de Sephadex	Ótimo de Pressão operacional recomendado, % de altura de leito
G-10 até G-75	100
G-100	30
G-150	15
G-200	10

Fonte: (Curling, 1970).

O sistema cromatográfico em gel apresenta parâmetros que o caracterizam sob o aspecto quantitativo, quais sejam: o volume da fase estacionária (V_s), o volume da fase móvel, também denominado volume morto, (V_o), o volume eluído (V_e) e o volume total (V_t). A relação matemática existente entre alguns destes parâmetros define o surgimento de um novo parâmetro que também caracteriza, de modo específico, o comportamento de um dado sistema cromatográfico em gel, sendo esse denominado coeficiente de partição (K_{av}). Matematicamente, o coeficiente de partição de uma coluna de gel pode ser expresso como segue:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

O intervalo de amplitude assumido para os valores do coeficiente de partição fica definido por: $0 < K_{av} < 1$, de forma ideal. Se um dado composto é totalmente excluído de uma coluna de gel, então, $V_e = V_o$ e $K_{av} = 0$, todavia, se $V_e = V_t$, o coeficiente de partição assumirá um valor igual a 1. Valores de coeficiente de partição superiores a 1 podem ser encontrados em cromatografia em gel e são indicadores da existência de interação(ões) entre a fase estacionária e os compostos amostrais em eluição, conforme já comentado anteriormente.

Adicionalmente, dois outros parâmetros podem ser considerados para uma melhor caracterização de um sistema cromatográfico em coluna de gel, a amplitude de fracionamento e o limite de exclusão (Tab.4). O primeiro diz respeito à variação de tamanho, ou peso do material amostral que pode ser eficientemente separado em um gel, enquanto o limite de exclusão refere-se ao maior valor de tamanho (ou peso) dessa amplitude. É importante considerar ainda que ambos

os parâmetros são absolutamente influenciados pela densidade do gel, e que todos os compostos que possuam valores de tamanho/peso superiores ao limite de exclusão expressarão $K_{av} = 0$, enquanto aqueles que ocorrem abaixo do valor mínimo de amplitude de fracionamento apresentarão $K_{av} = 1$ (Curling, 1970).

1.3-Enzimas.

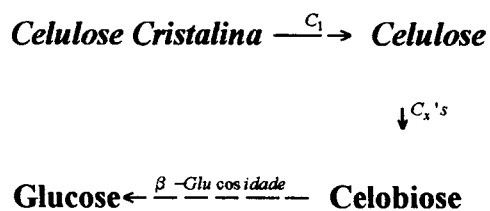
As enzimas constituem a maior e mais altamente especializada classe de proteínas, que catalisam reações químicas que perfazem no conjunto o metabolismo intermediário das células (Lehninger, 1980).

A composição estrutural de parede celular indica que a mistura de enzimas na digestão seria capaz de degradar celulose, hemicelulose e pectinas, devido a variações na natureza de paredes, esta mistura de enzimas se mostra necessária, bem como concentrações e tempo de exposição para cada tecido em particular, pois cada enzima e seus eventuais contaminantes podem influenciar na liberação de protoplastos e no nível de dano a membrana celular (Bengochea & Dodds, 1986).

1.3.1-Celulases

A natureza cristalina e altamente insolúvel da celulose faz com que haja uma resistência a hidrólise enzimática. Segundo Reese et al. (1950), a celulose é degradada por um complexo multienzimático que envolve componentes que permitem a degradação de formas altamente ordenada de celulose que envolve enzimas como: 1,4-β-exocelobiohidrolase chamada de enzima C_1 ; 1,4-β-D-glucanase: enzima C_x e uma β-glucosidase.

Conforme este esquema a hidrólise enzimática de celulose procede como a seguir:



onde: C_1 - enzima cuja ação se dá em substratos altamente cristalinos.

C_x - é um grupo de β -1,4-endoglucanases que atuam na cadeia de celulose, preferencialmente nas ligações internas antes das ligações terminais que são favorecidas pelas exoglucanases.

β -glucosidases- atuam especificamente em oligômeros de celobiose para celohexose (Goldstein, 1981).

A aplicação futura da hidrólise enzimática de celulose para glicose em escala comercial dependerá da grande disponibilidade de celulase de alta atividade e de baixo custo.

Embora celulases sejam produzidas por insetos, moluscos, protozoários, bactérias e milhares de fungos, só os organismos da última categoria é que parecem gerar convenientemente produção de celulases em grande escala. Insetos e moluscos crescem devagar e o isolamento de suas celulases é uma prática difícil. Protozoários e bactérias são de crescimento lento e as celulases, serão extraídas associadas com as células. De qualquer forma, os fungos celulolíticos crescem rapidamente em meio simples e secretam suas celulases para o meio, de maneira que as enzimas podem ser separadas facilmente por filtração (Goldstein, 1981).

Células fúngicas são comercialmente disponíveis com variados nomes, tais como: “celulase Onozuka”, “Meicelase P”, “Driselase”, “Rhozyme” mostrando tanto atividade celulásica como hemicelulásica. Pectinases também produzidas por fungos, algumas espécies do gênero *Rhizopus* são conhecidas comercialmente como “Macerozyme” e “Pectinol R 10”. O suco gástrico obtido do caramujo *Helix pomatia* utilizado na digestão de parede celular é disponível comercialmente sob a forma líquida (“glucanase”) ou pó (“Helicase”) (Thomas & Dave, 1975).

1.3.2-Hemicelulases

Sendo as hemiceluloses materiais de importância como componente de estrutura de parede de células vegetais, bem como o processo degradativo da mesma, convém que façamos uma evidência das enzimas capazes de hidrolisar tais compostos.

Estas enzimas são produzidas por uma ampla variedade de microorganismos incluindo espécies usadas em produção industrial de enzimas. Na tab.8, pode-se observar as hemiceluloses encontradas em madeira, bem como, enzimas capazes de degradar as mesmas (Ward & Young, 1989).

TABELA 8: Hemiceluloses normalmente encontradas em madeira e as enzimas capazes de provocar sua degraçação.

Hemicelulose	Fonte	Enzimas degradantes
<i>O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana</i>	Madeira pesada	1,4- β -endoxilânase β -Xilosidase
<i>Glucomanana</i>	Madeira pesada	1,4- β -endomannânase β -Manosidase
<i>Arabino-4-O-metilglucuronoxilana</i>	Madeira Leve	1,4- β -endoxilânase β -Xilosidase α -Arabinosidase
<i>O-acetilgalactoglucomanana</i>	Madeira Leve	1,4- β -endomannânase β -Manosidase α -Galactosidase
<i>Galactana</i>	Madeira compressada	1,4- β -endogalactânase β -Galactosidase

Fonte: (Ward & Young, 1989)

1.3.3-Pectinases

As substâncias pécticas são um grupo de polissacarídeos de parede primária de célula e regiões intercelulares de plantas superiores.

A característica dominante de pectinas, é a cadeia linear de unidades de ácido *D*-galacturônico que em proporções variadas de grupos ácidos estão presentes.

Raramente as pectinas são polímeros simples de ácido poligalacturônico, mas normalmente contém açúcares neutros, como: *D*-galactose, *L*-arabinose, *L*-ramnose, *D*-xilose, *L*-fucose e *D*-apiose.

Uma série de enzimas pectinolíticas ocorrem na natureza. A distribuição de enzimas pectinolíticas no meio de microorganismos usados na produção de enzimas industrial são apresentados na tab. 9 (Ward & Young, 1989).

Tabela 9- Produção de Pectinases pela indústria microbiológica a partir de espécies produtoras de enzimas.

	<i>A. niger</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Rhizopus spp</i>
Pectina esterase	+		+	
Poligalacturonase	+		+	+
Poligalacturonase liase		+		
Polimetilgalacturonase	+		+	
Polimetilgalacturonase liase	+		+	
Oligogalacturonase	+	+		

Fonte: (Ward & Young, 1989).

1.4- Protoplastos

Um fato de importância na intensificação de pesquisa da formação da parede celular é o estudo de protoplastos. O termo protoplasto foi inicialmente utilizado por Heinstejn em 1880, para designar a matéria viva envolta por parede celular das plantas (Constabel, 1975). Protoplastos isolados de plantas são “células nuas” que tiverem sua parede celular removida por ação mecânica ou digestão enzimática, (Bengochea & Dods, 1986).

Com o apropriado tratamento enzimático é possível isolar protoplastos virtualmente de alguma espécie de planta ou algum tipo de tecido de planta. De qualquer modo, a habilidade de isolar protoplastos capazes de sustentar a divisão celular com subsequente regeneração de calos ou plantas, depende basicamente de estudos de diferentes espécies.

Primeiramente, protoplastos foram isolados a partir de métodos mecânicos, porém os protoplastos isolados por este método não são uniformes; e o uso de enzimas degradantes de parede celular foi logo aceita^o como melhor método para realizar o isolamento de protoplastos uniformes de plantas. Preparações com enzima bruta que contém muitos compostos contaminantes indefinidos, que sem dúvida tem um efeito deletério na viabilidade das células, e a acumulação de produtos metabólicos em meio de cultura de protoplastos que afetam de certa forma a viabilidade da célula. Estes efeitos deletérios na cultura de protoplastos podem ser refletidos na ressíntese anormal, acumulação de compostos fenólicos e eventual morte da célula.

Por isso, deve-se levar em conta fatores essenciais para o sucesso de regeneração de protoplastos, onde se inclui:

- tipo e concentração de enzimas usadas no isolamento

- condições ambientais durante o isolamento
- componentes do meio de cultura de protoplastos (Evans & Bravo, 1983)

Exemplos importantes de técnicas utilizando protoplastos, são vistos nos estudos de patologia vegetal (Agrios, 1986).

- 1) Inoculação de um ou mais vírus ao protoplasto para estudo dos vários estágios e compostos que surgem na replicação viral, além de mudança na fisiologia celular frente à infecção viral;
- 2) Inoculação de vetores geneticamente engenheirados nos protoplastos, como *Agrobacterium* e vírus do mosaico, através de lipossomos, obtendo-se a inserção de genes de resistência em plantas agronomicamente importantes;
- 3) Seleção de protoplastos oriundos de plantas resistentes à infecções; toxinas patogênicas e outras substâncias, com posterior acompanhamento por cultura de tecido vegetal;
- 4) Avaliação de compostos antivirais, através do tratamento dos protoplastos-vírus infectados, podendo-se suspender a utilização de antivirais inativos ou altamente tóxicos;
- 5) Fusão de protoplastos para transmissão de genes de resistência entre hospedeiros sexualmente incompatíveis, ou seja, através de híbridos somáticos.

1.5- Parede celular

As paredes das células de plantas são fundamentalmente envolvidas em muitos aspectos da biologia destas, incluindo a morfologia, crescimento e desenvolvimento e as interações entre hospedeiro e seus patógenos (Junqueira, 1983).

Paredes de célula vegetal são estruturas semirrígidas, circulantes da membrana citoplasmática da célula. Em um tecido de planta, a parede celular de cada célula une-se com as paredes das células adjacentes, dando ao tecido coerência e resistência física (Esaú, 1960).

Esse envoltório celular causa uma barreira que protege as células de invasão de vírus, bactérias e fungos patogênicos (Albersheim, 1965).

Sua espessura varia de 0,1 μ a vários micrômetros de espessura, sendo formada, basicamente, por fibrilas rígidas de celulose embebida em uma substância hidrofílica constituída basicamente por hemicelulose, pectina ácida e neutra e glicoproteínas em proporções variáveis, de

acordo com a fase de desenvolvimento da planta e o tecido vegetal analisado. As células recém formadas formam uma parede celular chamada primária que poderá espessar-se e permanecer como tal na célula adulta ou então, em certos casos, deposita-se outra camada mais rígida de composição diferente, denominada parede secundária. Os compostos altamente hidrofílicos (pectina, glicoproteína e hemicelulose) servem de ponte de associação entre as fibrilas de celulose, formando uma rede tridimensional hidrofílica, responsável pela permeabilidade da parede celular que permite, em maior ou menor intensidade, a troca de nutrientes e catabólitos entre as células e o meio ambiente, bem como a ação de sinais químicos (fitormônios, e.g.), um modelo simplificado de componentes de parede celular é mostrado na figura 2 (Junqueira, 1983).

Os componentes de parede celular descritos acima são intimamente associados em seu ambiente natural e, como uma consequência, suas propriedades e respostas ao processo são influenciadas pela proximidade aos outros componentes, assim como possível combinação química entre eles, (Goldstein, 1981).

Carboidratos são os materiais mais abundantes produzidos por plantas e os processos na eficiência de sua conversão e utilização são de grande importância na área biotecnológica.

Processos para conversão enzimática podem ser sistematicamente otimizado utilizando-se de enzimas apropriadas, de acordo com sua atividade degradativa.

Esta proposição tem sido adotada para complexos polissacarídicos tal como o amido e celulose, onde a variedade de ligações que precisam ser hidrolizadas é menor, o que não acontece com as pectinas e hemiceluloses onde a estrutura de carboidratos e composição de açúcares são mais variadas, requerendo uma mistura de enzimas degradativas para substancialmente acabar com a estrutura polissacarídica.

Dentre os polissacarídeos que fazem parte da estrutura da parede celular podemos citar: xiloglucanas, xilanas, mananas, galactoglucanas, fructanas, celulose, hemicelulose e substâncias pécnicas, estas três últimas de importância em relação a proporção na constituição da parede celular (Ward & Young, 1989).

Figura 2 - Estrutura simplificada de parede celular vegetal (Kratzl & Billek, 1959).

2-OBJETIVOS

- Determinação de protocolo básico de extração e purificação do complexo celulolítico de suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.
- Avaliar a concentração de proteínas no suco gástrico como fator amostral da quantidade de hidrolases do material.
- Obtenção de protoplastos de vegetais de importância para estudos a nível bioquímico, utilizando-se de enzimas presentes naturalmente no suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*.
- Protoplastificação de células de vegetais superiores, com o intuito de se prover material biológico de alta confiabilidade para estudos posteriores de identificação de determinantes antigênicos em ambiente de superfície celular.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Vegetais

. *Acroceras macrum* - plântulas “in vitro” com 40 dias de cultivo

Meio de cultura para a multiplicação:

Meio MS(Murashige-Skoog) + 5,0 ppm BAP + 1,0 ppm ANA + 0,5 ppm GA3 + sacarose 3% + ágar 0,7%.

Fonte: LCTV-EPAGRI-CTA-Itajaí - S.C

. *Araucária angustifolia*- folhas de plantas jovens (5 anos), mantidas nos canteiros do LQBB, sendo escolhidas para o experimento as folhas das extremidades apicais dos ramos mais jovens.

. *Lactuca sativa* - folhas mais novas de plantas que se encontravam em estágio de colheita.

. *Mandevilla velutina* - calos com 1 mês de cultivo em meio Mc24.

Meio Mc24 : Meio MS (Murashige & Skoog) + 2,0 ppm 2,4-D + 2,0 ppm BAP + 3,0 ppm KIN + sacarose 3% + ágar 0,8%.

Fonte: LCTV-CCA-UFSC.

. *Musae sp*- plântulas “in vitro” com 50 dias de cultivo..

Meio de cultura para a multiplicação: Meio MS (Murashige & Skoog) + 0,1 ppm Tiamina + 0,5 ppm piridoxina + 0,5 ppm ácido nicotínico + 2,0 ppm glicina + 100 ppm mio-inositol + 2,5 ppm BAP + sacarose 3% + ágar 0,7%.

Fonte: LCTV- EPAGRI - CTA-Itajaí-S.C

As folhas foram maceradas e centrifugadas (Centrifuga Excelsa Baby II - Modelo 206-R-FANEM®), durante 10 minutos a 3 Krpm.

As folhas dos materiais acima citados foram submetidos a retirada da cutícula subaxial com auxílio de lâmina de barbear ou bisturi. Todos os materiais antes de serem colocados em solução digestora passaram por um processo que consistiu de uma incubação em agitador ("Shaker"- Coler Parmer Instyument Company), em banho-maria 25°C- 50 rpm, em solução de manitol 0,5M, com o objetivo de equilibrar a molaridade interna e externa do material.

3.2-Coleta do molusco

Exemplares adultos (Fig.3) foram capturados nas cercanias do município paranaense de Antonina, transportados até o local de trabalho (UFPR), sendo distribuídos em um viveiro de alvenaria, recoberto com telagem metálica para circulação de ar e isolamento.

3.3-Manejo em cativeiro

A cada três dias, proveu-se alimentação farta de verduras (alface, couve e repolho), suplementado com folhagens locais (chuchu e hortelã) e observava-se concomitantemente o desenvolvimento dos animais (Fig.4).

3.4-Extração

Separou-se 12 animais, escolhidos entre os mais desenvolvidos (dimensões da concha), submetidos a lavagem (remoção de terra, dado o hábito de se enterrarem para fins de abrigo do excesso de sol), e a uma dieta reforçada por dois dias, seguida de jejum absoluto nas 24 horas antes de ocorrer a extração.Efetuuou-se a ruptura mecânica da concha para a exposição das partes moles totais.Com auxílio de instrumentos cirúrgicos (pinças, bisturi e tesoura), procedeu-se a

exposição da peça estomacal (Fig.5) e com auxílio de agulha hipodérmica fez-se a punção estomacal e coleta do suco gástrico (Fig.6), colocado em recipiente em banho de gelo.

Figura 3. Exemplar adulto de *Megalobukimus paranaguensis*

Figura 4. Manutenção em cativeiro de *Megalobulimus paranaguensis*

Figura 5. Exposição da peça estomacal de *Megalobulimus paranaguensis*

Figura 6. Coleta do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*

3.5-Clarificação(Pré-purificação)

Após a coleta, o suco gástrico bruto foi centrifugado a 10 Krpm, durante 20 minutos, sendo realizado duas vezes este processo em centrífuga refrigerada Hitachi- Himac CR20B2 (rotor 17,5 Krpm), retirando-se o sobrenadante e descartando-se o precipitado (flora microbiana mais densa, restos alimentares). O material clarificado através deste processo foi mantido em freezer a -18°C, em frascos de 10ml ,com glicerol.

3.6-Purificação (Cromatografia em coluna de gel G - 100)

Objetivos:- Separação de espécies químicas de acordo com suas dimensões moleculares;

- Determinação dos parâmetros de uma coluna de gel, quais sejam V_0 , V_s e V_t
- Dessalificação de uma solução de um polímero.

Materiais:

- Coluna de vidro (2,5 x 60 cm),
- Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden),
- Bomba de vácuo,
- Espectofotômetro UV/Visível,
- Balança de Precisão (Sartorius),
- Erlemeyers (100 e 250 ml),
- Tubos de ensaio,
- Frascos de Penicilina (15 ml),
- Pipetas graduadas e Pipetas Pasteur,
- Pipeta Micrométrica (1000 μ l),
- Balão Volumétrico (50 ml),
- Azida sódica 0,02%,
- NaCl 0,9% e 3 M,
- Água destilada,
- Amostras: 2 ml de Blue Dextran 2000 (2 mg/ml) e S_{10} (2 ml).

A montagem foi feita calculando-se inicialmente, o volume de gel teórico e prático necessário para a coluna em função da área da base da coluna e altura do gel requerida. Para tal, deve-se considerar o valor Wr (water regain) característico de cada gel e o tempo de inchamento necessário para que este alcance o máximo volume. Para a situação em questão, o utilizado já se encontrava totalmente hidratado, de modo que esta etapa não foi efetuada ao longo dos trabalhos.

O empacotamento da coluna foi realizado conforme as instruções contidas no manual "Gel Filtration: theory and practice" (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden, abril, 1979). A extremidade inferior da coluna de vidro foi bloqueada com uma rolha de borracha contendo uma agulha que perfurava totalmente, a qual acoplou-se um tubo plástico para coleta do material. Sobre essa rolha foi colocada uma pequena camada de lã de vidro com a finalidade de atuar como filtro, impedindo que partículas de gel sejam eluídas com o solvente e os solutos de interesse. Cuidados foram tomados nessa fase para se evitar a formação de espaço morto nessa região da coluna, o qual poderia atuar como uma câmara de mistura para as substâncias já separadas pelo gel. Na extremidade superior da coluna, mostrou-se um sistema de rolha perfurada com agulha e tubo plástico acoplado de modo semelhante àquele existente em sua extremidade inferior. Ao término da montagem, a coluna recebeu o volume de gel respectivo, através de uma aplicação homogênea deste, evitando-se a formação de bolhas, estratificação, ou de canais de gel. Foi utilizada uma pressão operacional de 30 % para a coluna de Sephadex G-100. A coluna assim montada foi eluída com volume de água destilada igual a três vezes o volume de gel para que se alcançasse um perfeito empacotamento dos leitos, utilizando-se para tal um sistema contínuo de fluxo de eluente em cada coluna. Em seguida regulou-se o fluxo da coluna para uma vazão de aproximadamente 1 ml/min, utilizando-se a solução eluente neste momento ($NaCl$ 0,9%).

Após a estabilização do gel e a regulação do fluxo com o eluente, interrompeu-se o fluxo da coluna e removeu-se o excesso de líquido acima da superfície do gel por meio da sucção por pipeta Pasteur acoplada a uma pera de aspiração, deixando-se apenas um pequeno filme de eluente sobre o leito de gel. Em seguida, fez-se a determinação do volume morto da coluna, através da aplicação de uma amostra de Blue Dextran 2000 (2 ml), composto esse que, por apresentar um tamanho (2.000.000 PM) bastante maior que os poros existentes nos grânulos de gel, não consegue ser retido naqueles espaços, permanecendo apenas na fase móvel e sendo, portanto, eluído totalmente. Essa determinação foi realizada mantendo-se inicialmente o fluxo da coluna

fechado e aplicando-se 2 ml da amostra de Blue Dextran 2.000 ao gel. O fluxo foi então aberto para permitir que a amostra penetrasse no gel tão somente, e imediatamente fechado, quando foi completado o volume da coluna com a solução eluente, conectando-se esta ao frasco do reservatório. O volume do eluato foi coletado para a coluna em proveta graduada até o momento inicial de exclusão do elemento indicador (observação visual), sendo que esse volume representa o volume morto (V_0) para a coluna em estudo. Um aspecto adicional da utilização de Blue Dextran 2000 é que este permite a observação de irregularidades no empacotamento do gel, fator que pode dificultar e/ou impedir uma correta resolução de uma amostra qualquer.

Com o sistema cromatográfico montado e estabilizado, procedeu-se à aplicação da amostra S_{10} (2 ml) no gel. Utilizando-se uma micropipeta (1000 μ l) e tomando-se o cuidado de permitir o escoamento lento do material amostral pela parede da coluna, mais próximo possível da superfície do gel, para evitar a danificação desta (Fig.7). De modo semelhante de V_0 , a aplicação da amostra se deu com o fluxo de eluente bloqueando, inicialmente, sendo esta condição alterada somente para permitir a penetração do material amostral do gel. O volume foi então completado com o eluente e esta conectada ao frasco reservatório, formando um sistema contínuo e estável.

3.7-Espectrofotometria do suco gástrico

Com o intuito de se observar a ocorrência do complexo enzimático de interesse na fração proteica cromatografada foram retiradas 36 alíquotas (1,0 ml) através de um coletor de frações (FRACSIL-100-Incibrás), efetuando-se em seguida a espectrofotometria do material através da análise dos dados de absorbância (280 nm) em espectrofotômetro (SPECTOPHOTOMETER - U.V/ visible- Pharmacia-LKB-UltrospecIII)-(Anexo 1).

Realizou-se também a observação de algumas alíquotas(n°01,05,08e17) em espectrofotometria de varredura (200-600 nm), (SPECTROPHOTOMETER DU® 7400 BECKMAN), a fim de identificar a existência de entidades bioquímicas outras, além do componente proteico no material amostral.(Anexo 2, 3, 4 e 5).

Figura 7. Purificação do suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis*
(Cromatografia em coluna de gel G- 100)

3.8-Preparo da solução digestora

Diferentes soluções digestoras de enzimas foram utilizadas para cada espécie, sendo utilizados, manitol, S10, D.T.E e celulase fúngica (Celluclast-Novo Nordisk®) em frascos de vidro com capacidade para 15 ml; recobertos com papel alumínio para evitar-se penetração de luz.

Neste trabalho, adicionou-se celulase de origem fúngica (Celluclast- Novo Nordisk®) com o objetivo de auxiliar o processo no sentido de acelerar a degradação, já que em experimento controle, contendo apenas celulase como enzima digestora não obteve-se protoplastificação.

3.9- Incubação

Nas frações contendo solução digestora foram adicionados os fragmentos de folhas de acordo com o volume da solução (Tab.10), onde estão presentes as condições de temperatura de incubação em banho-maria (“Shaker”- Cole-Parmer Instrument Company), além do período de incubação que variou de espécie para espécie. Periodicamente (30 minutos) se fez o monitoramento do material em estudo retirando-se alíquotas para observação, em microscópio da formação de protoplastos.

3.10- Verificação protoplastificação (microscopia)

Exames sucessivos foram realizados para observar a formação de protoplastos, utilizando-se lâminas e lamínulas em microscópio Leitz DFU- SMLUX em aumentos de 4,10 e 40 vezes. As lentes da objetiva eram Leitz Wetzear Germany e a ocular com aumento de 10 vezes, da Periplan.

3.11-Registro protoplastificação (Fotomicrografia)

Para registro dos experimentos, foram feitas fotomicrografias, utilizando-se filme Kodak-ASA- 100-Gold, retratadas em microscópio invertido Labophot Nikon, com máquina fotográfica acoplada Nikon FX-35, apresentando monitor AFX II e transformador para U.V. As lentes oculares de 10x FW Nikon do microscópio serviram para a escolha do campo e para fotografia a

lente da máquina foi de aumento de 15 vezes. As objetivas Nikon de 4, 10 e 40 vezes faziam parte do microscópio Nikon.

3.12- Verificação de digestão de parede celular

Utilizou-se solução de Calcofluor - White (0,01%) da Ciba-Geigy e Coomassie Blue G-250 (Sigma Co.) na verificação da presença ou ausência, de parede celular e da presença de estrutura de membrana respectivamente. Utilizando lâmpada de U.V. a fluorescência é nítida em parede celular nas células banhadas em solução Calcofluor - White. As estruturas de membranas coradas com Coomassie Blue G-250 foram visualizadas em luz visível. O Calcofluor se liga aos polissacarídeos como celulose de parede primária, dando indicação fluorescente de sua presença (visível em microscopia com dispositivo para U.V- 256 nm).

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Características do animal

O molusco mediante observações mostrou-se ser rústico durante o período que foi instrumento de análises, pois sendo nativo do litoral, suportou muito bem a diferença de clima, principalmente as geadas que ocorreram no decorrer do experimento.

4.2- Purificação do material

Realizada através de cromatografia em coluna de gel; tendo a coluna utilizada (1,6 x 24,9) apresentou um volume teórico (V_t) de 50,1 cm³ e um volume prático (V_p) igual a 50 cm³. O volume morto (V_o) obtido com a eluição de Blue Dextran 2000 foi de 17,0 ml.

Os calculos efetuados revelam os valores que seguem para os parâmetros V_e , V_t , V_{av} e F_d , segundo o composto cromatografado.

Blue Desxtran 2000

$$V_e = 2 + 17 = 19 \text{ ml}$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad K_{av} = 0,06$$

$$V_{et} = 6 + 17 = 23 \text{ ml}$$

$$V_o = 17 \text{ ml}$$

$$V_t = 50 \text{ ml}$$

$$F_d = V_{et} / \text{Vol. amostra} \quad F_d = 23\text{ml} / 2\text{ml}$$

$$F_d = 11,5$$

S₁₀

$$V_e = 2 + 17 = 19 \text{ ml}$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad K_{av} = 0,06$$

$$V_{et} = 17 + 18 = 35\text{ml}$$

$$V_o = 17\text{ml}$$

$$V_t = 50\text{ml}$$

$$F_d = V_{et} / \text{Vol. amostra} \quad F_d = 35\text{ml} / 2\text{ml}$$

$$F_d = 17,5$$

O comportamento de eluição dos compostos, em termos de tempo de retenção no gel e sequência de eluição foi o esperado considerando-se os seus referenciais de peso molecular, demonstrando ser um protocolo eficiente na medida em que se quer realizar principalmente a separação de espécies químicas de acordo com suas dimensões moleculares.

4.3- Espectrofotometria do material

Os valores e a curva de absorvância (280nm) em espectrofotometro, encontrados para a amostra de S₁₀ cromatografadas se encontram no anexo nº1 onde pode-se observar que até a alíquota nº17 há um pico de absorvância de concentração de substâncias de entidade bioquímica de importância no sistema de protoplastificação.

Resultados da espectrofotometria de varredura, em anexo (nº2,3,4 e5), nos demonstra a ocorrência de entidades bioquímicas (ácidos nucleicos, vitaminas entre outros), além do componente proteico no material amostral.No anexo nº3, ocorre um pico na faixa de (420nm), que chama a atenção, podendo indicar nesta faixa a presença de pigmento na amostra colocada na cubeta para a determinação espectrofotométrica.

4.4 - Solução digestora

Na (tab.10), encontram-se os dados de material, tempo e temperatura de incubação (banho-maria) e agitação que foram submetidas as amostras de vegetais com o propósito de formação de protoplastos.

Tabela 10- Condições para obtenção de protoplastos utilizando suco gástrico de *M.p.*

Planta	Meio de Digestão		pH	Agitação	Período
<i>Acroceras macrum</i>	Manitol	0,5 M	5,6	30°C - 70 rpm	3 horas
	DTE	16 µl			
	Celucast®	0,8%			
	S ₁₀	5%			
	Volume final	2 ml			
<i>Musae sp. Banana</i>	Manitol	0,5 M	5,8	30 °C 70 rpm	8 horas
	DTE	8 µl			
	Celucast®	0,6 %			
	S ₁₀	6 %			
	Volume final	2 ml			
<i>Araucaria augustifolia</i>	Manitol	0,5 M	5,6	30 °C 70 rpm	4 horas
	DTE	8 µl			
	Celucast®	0,8 %			
	S ₁₀	5 %			
	Volume final	2 ml			
<i>Mandevilla velutina</i>	Manitol	0,5 M	5,6	30 °C 70 rpm	2 horas
	DTE	8 µl			
	Celucast®	20 µl			
	S ₁₀	4 %			
	Volume final	2 ml			
<i>Lactuca sativa</i>	Manitol	0,5 M	5,6	30 °C 70 rpm	2 horas
	DTE	8 µl			
	Celucast®	0,6 %			
	S ₁₀	6 %			
	Volume final	2,0 ml			

Cada espécie vegetal estudada apresenta características intrínsecas de constituição de parede celular, portanto, a obtenção de protoplastos, em diferentes espécies, necessita da

definição, ou da adaptação de um sistema específico de degradação de parede celular. Para que ocorra degradação da parede celular primária, constituída basicamente de celulose, hemicelulose e pectina é necessária uma mistura de enzimas capazes de agir nas ligações das moléculas, de acordo com a exposição destas, à ação da solução digestora enzimática.

4.5-Concentração enzimática

Ao comparar alguns resultados de plastificação obtidos com o suco gástrico de *M.p.*, com algumas combinações de enzimas usadas em isolamento de protoplastos de plantas, como as observadas por:

Espécie: *Brassica oleracea*

Fonte de protoplastos: mesófilo

Enzimas e concentração(% P/V): Macerozyme- 0,4

Driselase - 0,5

Meicelase - 4,0

Total: - 4,9

Referência : Gatenby & Cocking, 1977.

Espécie: *Lactuca sativa*

Fonte de protoplastos: raiz

Enzimas e concentração(% P/V): Rhozyme HP 150 - 2,0

Macerozyme - 0,3

Meicelase -4,0

Total - 6,3-

Referência: Berry et al., 1982.

Evidencia-se a proporção enzimática superior utilizada nestas combinações em relação ao utilizado na (tab.10); permitindo-nos salientar o potencial hidrolásico do S₁₀.

No processo de protoplastificação utilizando suco gástrico de *M.p.*, verificamos que celulase fúngica foi requerida para acelerar o processo de degradação. Partindo-se do pressuposto que S₁₀, possui todas as enzimas necessárias para a total despolimerização da parede celular

vegetal. A celulase fúngica teria função suplementadora e aceleradora do processo de protoplastificação, visto que em sua ausência, o tempo requerido para se alcançar níveis de protoplastificação é bastante longo, fato que induz a utilização de antibióticos e fungicidas ao meio de cultura para evitar-se a contaminação

4.6- Tempo de incubação x Destruição celular

O período de incubação relativamente curto para obtenção de protoplastos se compararmos com os exemplos de protoplastificação a seguir;

Fonte: *Pinus contoria*- suspensão de células

Tempo de incubação: "Overnight"

Referência: Hakman & Von Arnold, 1983.

Fonte: *Pinus taeda* - suspensão de células

Tempo de incubação: 9 horas

Referência: Teasdale & Rugini, 1983.

Este curto período se mostra satisfatório pelo fato de não precisar utilizar antibióticos (efeito mutagênico) para a obtenção de protoplastos, bem como com o tempo excessivo o S_{10} pode provocar a destruição da membrana plasmática devido a ação de proteases e lipases.

4.7- Registro da protoplastificação

Através da utilização de solução digestora e submetidos aos dados da tabela.10, obteve-se resultados de protoplastificação, os quais podem ser observados nas Figuras 8-9-10-11-12-13-14 e 15.

Figura 8 - Fotomicrografia de Protoplastos em ruptura de *Acroceras macrum*
(Aumento 100x)

Figura 9- Fotomicrografia de Protoplasto em ruptura de *Lactuca sativa*
(Aumento 400x)

Figura 10- Fotomicrografia de Protoplasto de *Musae sp.*
(Aumento 100x)

Figura 11 - Fotomicrografia de Protoplasto de *Araucária angustifolia*.
(Aumento 400x)

Figura 12- Individualização de elementos anatômicos foliares de
Araucária angustifolia por ação de solução digestora.

(Aumento 100x)

Figura 13- Fotomicrografia de Protoplastos de *Mandevilla velutina*.

(Aumento 100x)

Figura.14-Fotomicrografia de Protoplasto de *Mandevilla velutina* com
solução Calcofluor - White- digestão de parede celular.
(Aumento 400x)

Figura 15- Fotomicrografia de Protoplasto de *Mandevilla velutina*
Estruturas de membranas coradas
com Coomassie Blue G-250.

4.8- Observação da digestão da parede celular e de estrutura de membrana

Solução a 0,01% de Calcoflúor utilizando luz U.V. no microscópio foi suficiente para verificar digestão da parede, por ausência de células fluorescentes e solução de Coomassie Blue G-250 se mostrou eficiente para corar estruturas de membrana, visualizados em luz visível.

5 - CONCLUSÃO

- A purificação com base na centrifugação cromatográfica em coluna de gel demonstrou ser um procedimento adequado para a obtenção de complexo enzimático de interesse na protoplastificação.
- Através dos experimentos realizados, o suco gástrico de *Megalobulimus paranaguensis* demonstrou ser uma fonte rica de enzimas degradativas de estruturas polissacarídicas, constituintes de parede celular.
- A ação do suco gástrico como complexo enzimático, proporcionou a liberação de protoplastos de vegetais constituídos de diferentes estruturas de parede celular, caracterizando-o como uma ferramenta de grande utilidade no sentido de desenvolvimento de pesquisa básica e biotecnológica na área da enzimologia.

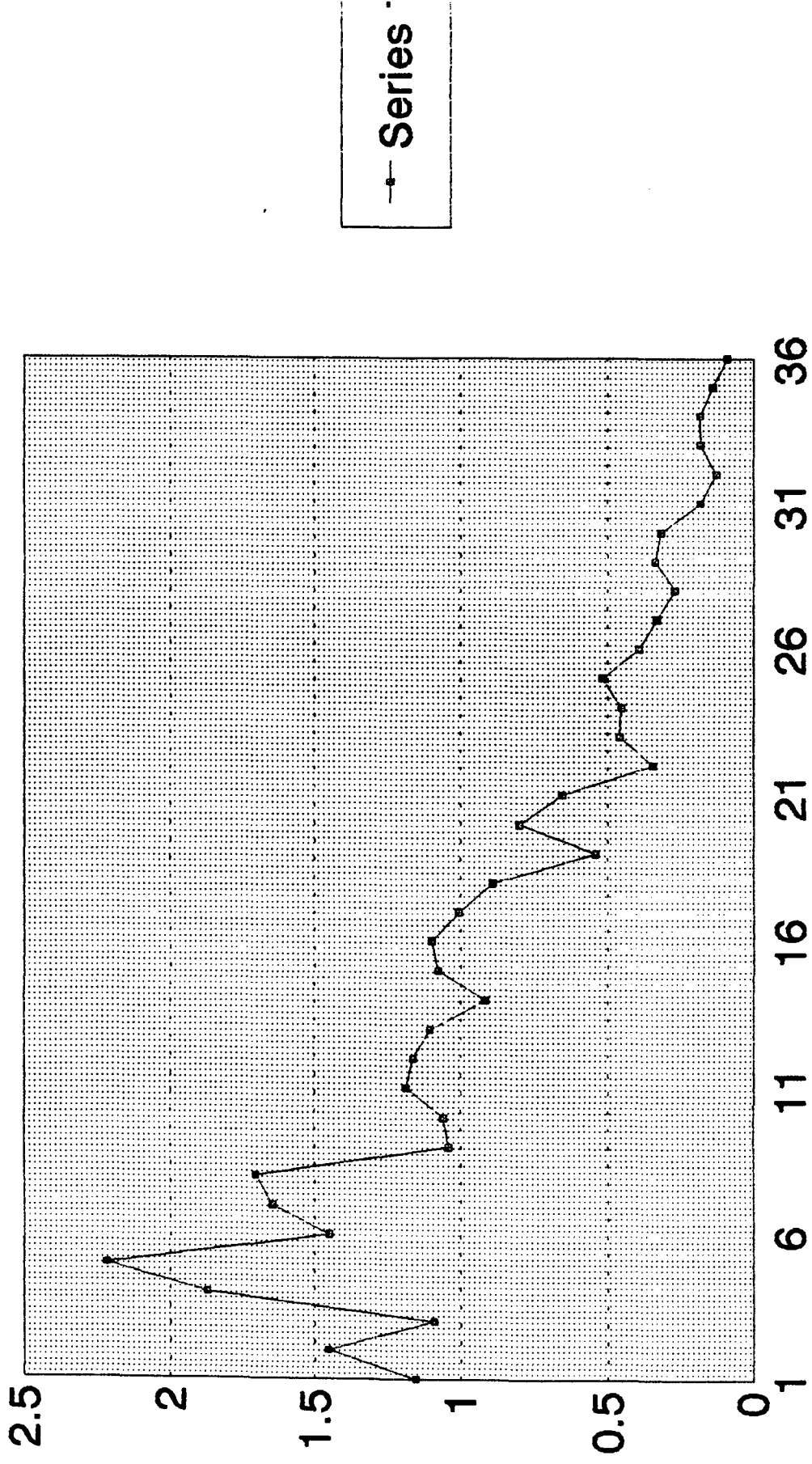
BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. Tissue Culture Technique of importance to Plant Pathology. In: _____ . Plant Pathology. New York: Academic Press, 1986. p. 758-761.
- ALBERSHEIM, P. In: Plant Biochemistry. BONER, J & VARNER, J.E. London: Academic Press, 1976.
- ALMEIDA, E.R.A. Protoplastificação do Fungo Paecilomyces farinosa usando como fonte enzimática o suco gástrico de Megalobulimus spp (Mollusca, Gastropoda). Curitiba, 1992. (monografia - Curso de Biologia). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BENGOCHEA T. & DODDS. Plant Protoplasts. 1986.
- BERRY, S.F.; LU, D.Y.; PENTAL, D; COCKING, E.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. Z. Pflanzenphysiol, Stutgard, v. 103, p. 31-38, 1982.
- CURLING, J. The use of Sephadex® in the separation purification and characterization of biological materials. In: KERKUT, G.A. Experiments in physiology and biochemistry. [ed]. London: Academic Press, 1970. 484 p. p. 417-484.
- ESAU, K. Plant anatomy. New York: Wiley, 1960.
- EVANS & BRAVO. Handbook of Plant Cultured ^{Cell} ~~Plants~~. 1983.
- FONTANA, J.D.; FEIJÓ, M.A.L. & DUARTE, J.H. Ação de algumas carboidratases do suco digestivo do *Megalobulimus paranaguensis*, Pilsbry - Ihering, (1900) sobre substratos definidos. 28ª Reunião Anual da SBPC, 1976.
- FOWKE, L.C. & CONSTABEL, F. Plant Protoplast. C.R.C. Press. Inc., Boca raton, Florida, 1985.
- GEBARA, M. Potencial hidrolásico do suco gástrico do molusco terrestre Megalobulimus paranaguensis. Curitiba, 1989. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.
- GETENBY, A.A.; COCKING, E.C. Callus formation from protoplasts of marrow stem Kale. Plant Sci. Lett. (Limerick), v. 8, p.275-280, 1977.
- GOLDSTEIN, I.S. Organic Chemicals from Biomass. Boca Raton: CRC Press, 1981. 310 p.

- HAKMAN, I.C.; von ARNOLDS, S. Isolation and culture of protoplasts from cell suspensions of *Pinus contorta* Dougl. ex. Loud. Plant Cell Rep., Heidelberg, v. 2, p. 92-94, 1983.
- JUNQUEIRA, L.C. Biologia Celular e molecular. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogar, 1983. 270 p.
- KRATZL, K.; BILLEK, G. (eds.). Biochemistry of wood. New York: Pergamon Press, 1959.
- LEHNINGER, A.L. Fundamentos de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1980. 465 p.
- REESE, E.T. et alii Biological degradation of cellulose derivatives and its relation to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol*, 59, 485, 1950.
- SEPHADEX gel filtration in theory and practice. Pharmacia Guide, 1974. 63 p.
- TEASDALE, R.D.; RUGINI, R. Preparation of viable protoplasts from suspension-cultured loblolly pine (*Pinus taeda*) cells and subsequent regeneration to callus. Plants Cell Tissue Organ. Cult. Dordrecht, v. 2, p. 253-261, 1983.
- THOMAS, E; DAVE, M.R. (eds.) From single cells to plants. New York: Wykeham Publications, 1975. p. 78-79.
- WARD, O.P. & MOO-YOUNG, M. Enzymatic Dgradation of Cell Wall and related plant polysaccharides. In: CRC Criticals Reviews in Biotechnology. v. 8, n. 4, p. 237-274, 1989.

Curva Absorbancia S10

280 nm



Amostra n° 01

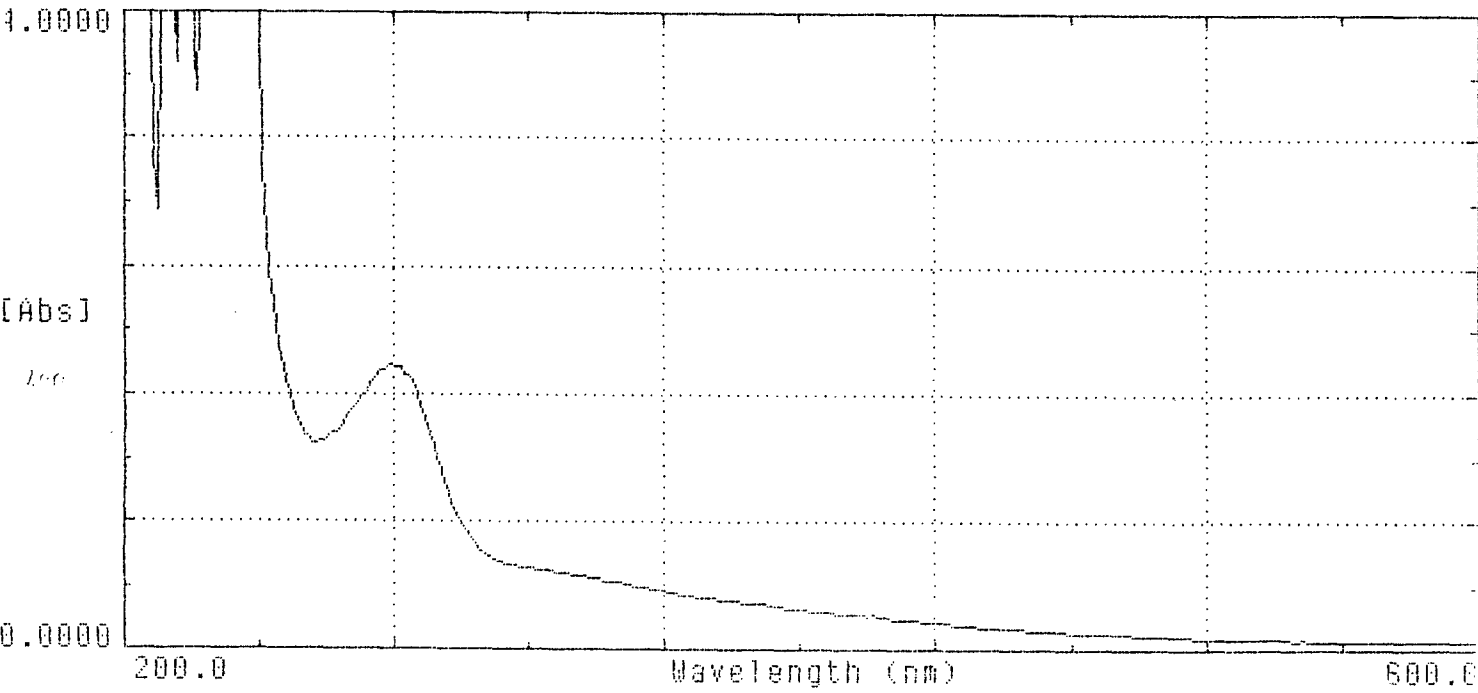
File Edit View Scan
LeadSamples Tabulate +-*Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Qui

Scan directory: VIEW Autoprint: [No] Method name: A:\DEFAULT
Start λ : 200 nm Autosave: [No] Autosave name: [A:\]SCANS
End λ : 500 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
Overlay scans: [No] Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

A:\WORK_001

Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

Functions: Scan



Amostra: 05

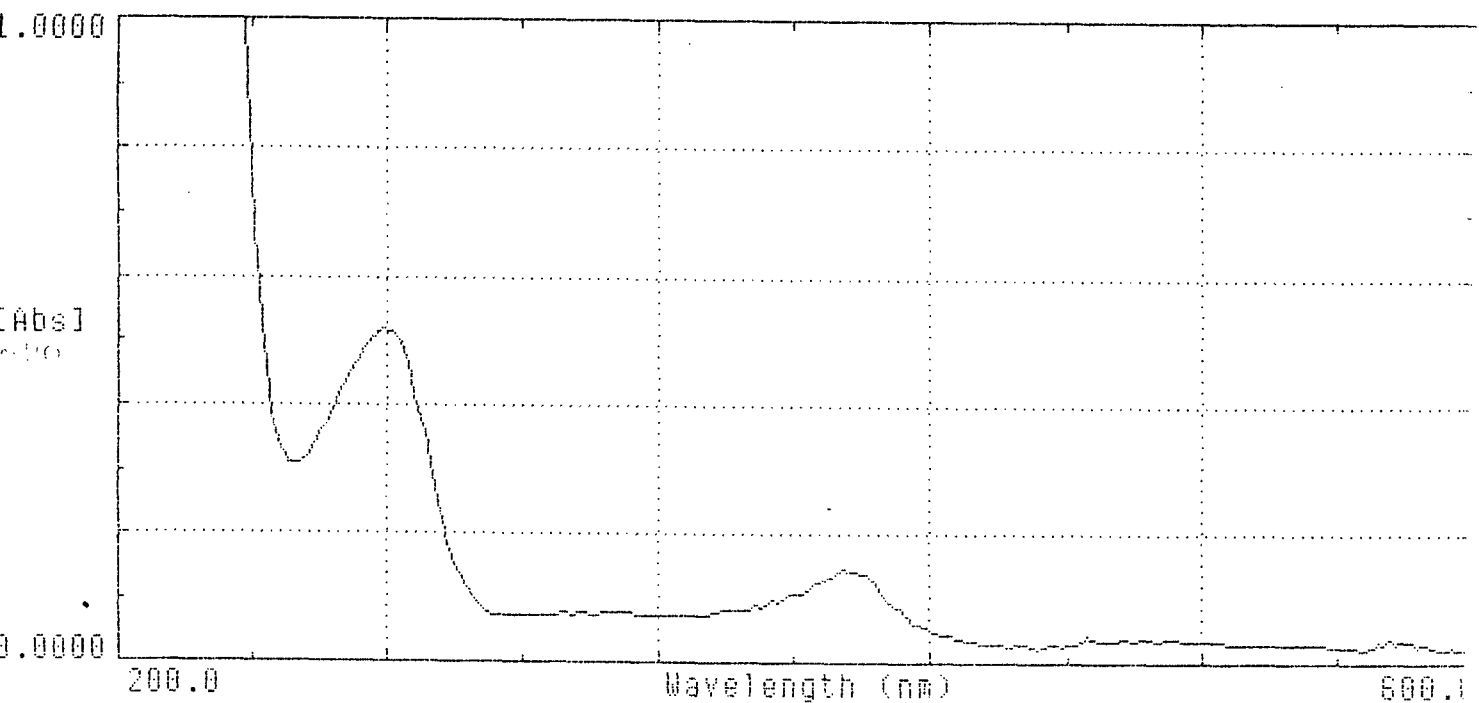
File Edit View Window Help
LeadSamples Tabulate +-#Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Qui

Scan directory: VIEW Autoprint: [No] Method name: A:\DEFAULT
Start λ : 200 nm Autosave: [No] Autosave name: [A:\]SCANS
End λ : 600 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
Overlay scans: [No] Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

A:\WORK_002

Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

Functions: Scan



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Date: 28/07/9
Time: 18:35

Amostran: 08

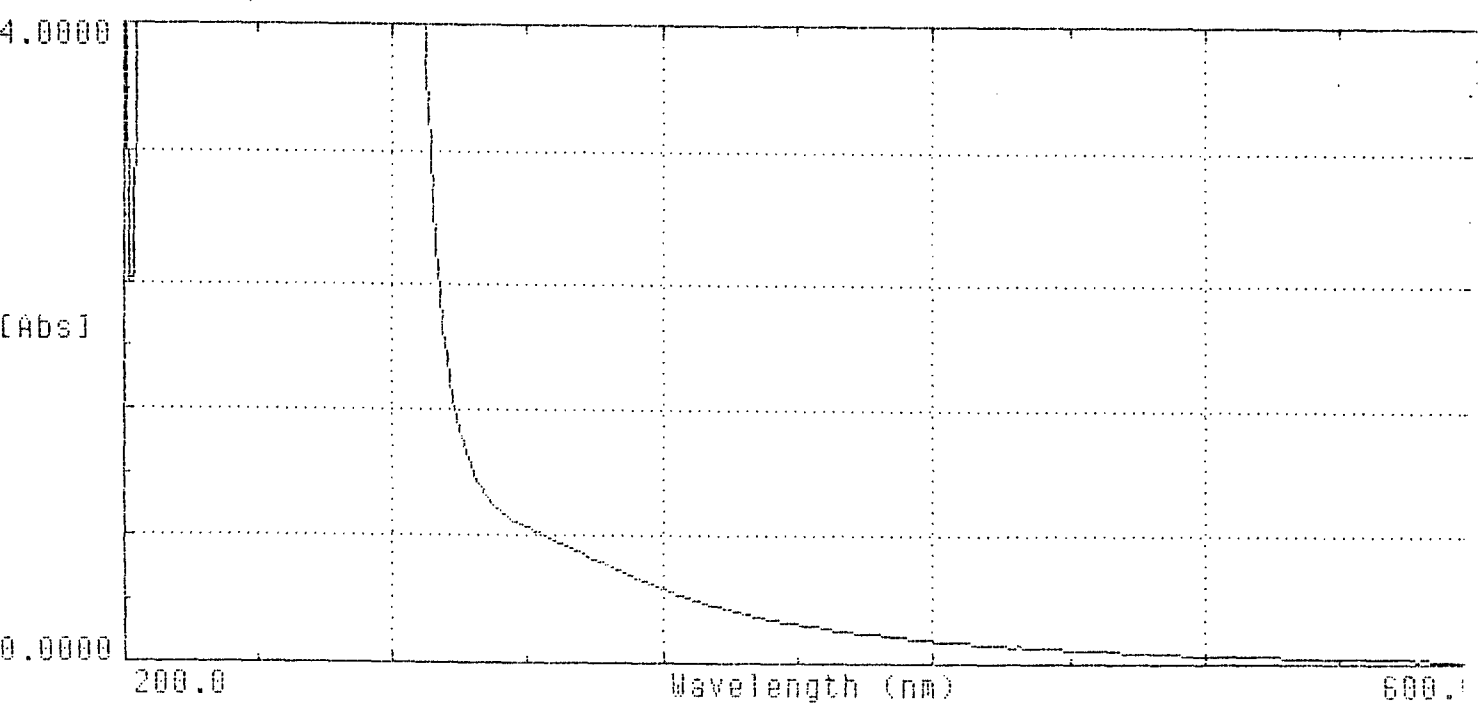
ReadSamples Tabulate +-*Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Qui

Scan directory: VIEW	Autoprint: [No]	Method name: A:\DEFAULT
Start λ : 200 nm	Autosave: [No]	Autosave name: [A:\]SCANS
End λ : 600 nm	Scans per sample: 1	Sampling device: None
Overlay scans: [No]	Interval: 10.00 [sec]	Read average time: 0.50 sec

A:\WORK_001

Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Prin

Functions: Scan



Anexo IV

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Date: 28/07/9
Time: 18:39

Amostra n° 17

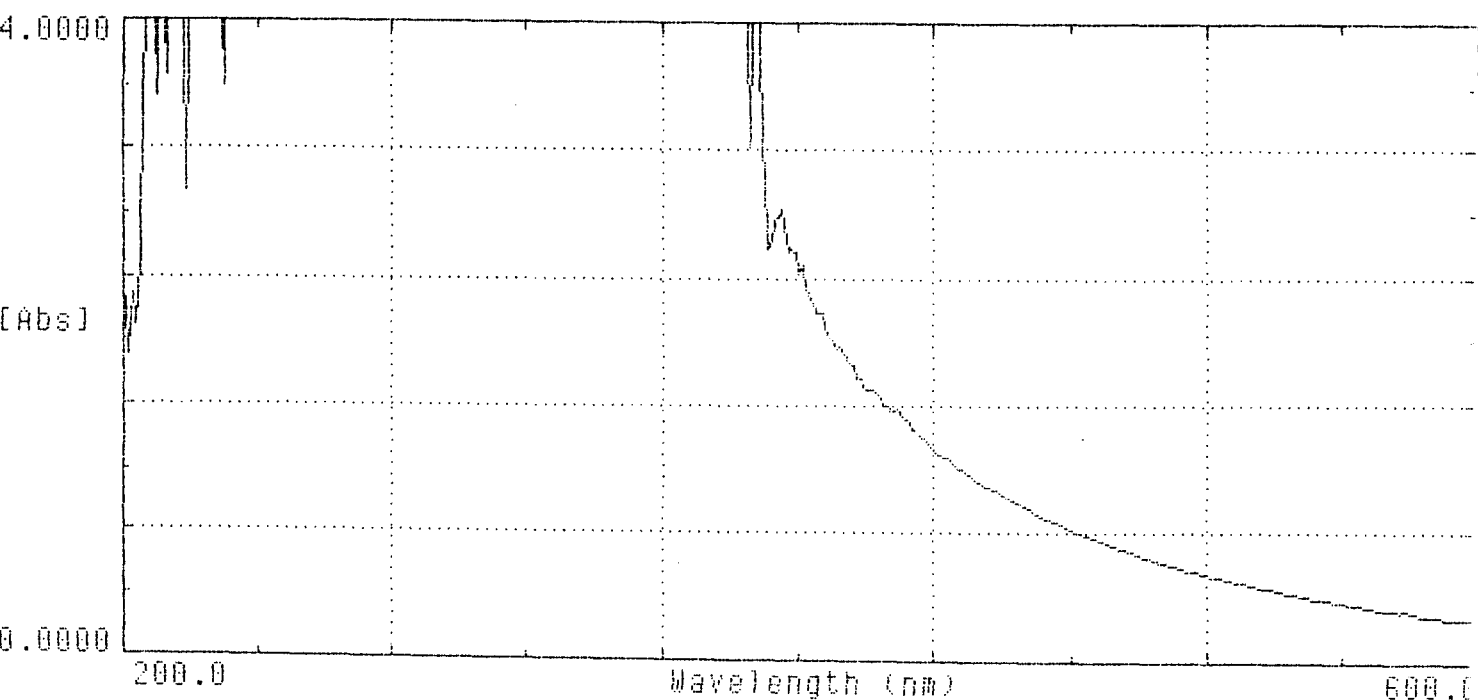
ReadSamples Tabulate +-*Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Qui

Scan directory: VIEW Autoprint: [No] Method name: A:\DEFAULT
Start λ : 200 nm Autosave: [No] Autosave name: [A:\]SCANS
End λ : 600 nm Scans per sample: 1 Sampling device: None
Overlay scans: [No] Interval: 10.00 [sec] Read average time: 0.50 sec

A:\WORK_001

Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Prin

Functions: Scan



Anexo VI