



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**ÁDILA LORENA MORAIS LIMA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DUAS  
N-ACETIL- $\beta$ -HEXOSAMINIDASES DO EQUINODERMA  
MARINHO *Echinometra lucunter***

**NATAL/RN  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ÁDILA LORENA MORAIS LIMA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DUAS  
N-ACETIL- $\beta$ -HEXOSAMINIDASES DO EQUINODERMA  
MARINHO *Echinometra lucunter***

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica.

Orientador: Luiz Roberto Diz de Abreu.

**NATAL/RN  
2006**

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte UFRN/Biblioteca  
Central Zila Mamede

Lima, Ádila Lorena Morais.

Purificação e caracterização parcial de duas n-acetil-B-hexosaminidases do equinoderma marinho *echinometra lucunter* / Ádila Lorena Morais Lima. – Natal, RN, 2006.

93 f : il.

Orientador : Luiz Roberto Diz de Abreu.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.  
Centro de Biociência. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Ouriço-do-mar (*Equinometra lucunter*) - Dissertação. 2. N-acetil-β-glicosaminidases – Dissertação. 3. N-acetil-β-hexosaminidases – Dissertação. 4. Glicosaminoglicanos – Dissertação. I. Abreu, Luiz Roberto Diz. de. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 593.95

Com toda admiração e amor, **DEDICO** a minha conquista aos meus pais, José de Arimatéa e Maria José, pelo amor, pela confiança, por muitas vezes que deixaram de realizar seus sonhos para concretizar os meus e pelo incentivo e preocupação com minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador Luiz Roberto Diz de Abreu, por aceitar esse desafio comigo, pelas sugestões, apoio, incentivo e principalmente por compreender as minhas limitações.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pelas incontáveis bênçãos, por permitir a realização dos meus sonhos e que com sua infinita bondade compreendeu meus anseios e me deu a necessária coragem e discernimento para alcançar as minhas metas;

Aos meus irmãos Aedra, Andressa e Alexandre pelo incentivo e carinho incondicional;

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFRN, pela contribuição prestada à minha formação acadêmica;

Aos professores Elizeu Antunes e Hugo Alexandre pelas importantes sugestões durante a qualificação;

A professora Luciana Duarte, pelos ensinamentos e amizade;

Ao professor Maurício P. Sales, por toda contribuição a este trabalho;

A minha grande amiga Lúcia, pela amizade, pelos momentos bons e ruins compartilhados juntas e pela tranquilidade em saber que posso sempre contar em qualquer momento;

A amiga Elizabeth pela constante preocupação com o meu bem-estar e por sempre torcer por minha felicidade;

Aos amigos da turma do mestrado: Tarciana, Shirley, Fabiano, Vanessa, Celina, Carol e Ângela pela ótima convivência e pelos constantes estímulos e carinho;

Aos amigos de laboratório Robério, Edilson e Roberta pela amizade e ajuda na realização dos experimentos;

Aos funcionários do Departamento: Creuza, Eliene, Itamar, Jonas, Marcos, Michelli e Kildare; pelo acolhimento, carinho e grande contribuição para realização deste trabalho.

*“A ciência está longe de ser um  
instrumento perfeito de conhecimento. É  
apenas o melhor que temos”.  
(Carl Sagan)*



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Ponto de hidrólise das endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases sobre alguns carboidratos.....	25
FIGURA02: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos..	29
FIGURA03: Distribuição dos Glicosaminoglicanos Sulfatados no reino animal.....	31
FIGURA 04: <i>Echinometra lucunter</i> .....	38
FIGURA 05: Degradação de glicosaminoglicanos sulfatados pelas frações enzimáticas de <i>Echinometra lucunter</i> precipitadas com sulfato de amônio....	54
FIGURA 06: Atividades específicas das frações enzimáticas de <i>Echinometra lucunter</i> .....	55
FIGURA 07: Perfil de eluição de FIII em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).....	56
FIGURA 08: Perfil de eluição da N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75).....	57
FIGURA 09: Perfil de eluição da N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200) .....	58
FIGURA 10: Correlação entre o logaritmo do peso molecular e o volume de eluição das proteínas.....	59
FIGURA 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações protéicas.....	61

FIGURA12: Determinação do $K_m$ e da $V_{max}$ das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases.....	63
FIGURA 13: Efeito do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.....	64
FIGURA 14: Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.....	65
FIGURA 15: Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo. ....	66
FIGURA 16: Efeito da pré-incubação a 60°C na atividade catalítica da(s) N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase(s).....	67
FIGURA 17: Logaritmo da atividade residual da desnaturação térmica das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases a 60 °C.....	68
FIGURA 18: Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.....	69
FIGURA 19: Efeito da reversão do pH sobre a atividade das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Famílias de glicosidases que possuem atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica.....	21
Tabela 02: Etapas de purificação das N-acetil- $\beta$ - glicosaminidases.....	60
Tabela 03: Influencia de diferentes sais sobre a atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica.....	71
Tabela 04: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica.....	73
Tabela 05: Estudo de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>C4S</b>	Condroitim 4-sulfato
<b>C6S</b>	Condroitim 6-sulfato
<b>F I</b>	Extrato protéico precipitado a 0-30% de sulfato de amônio
<b>F II</b>	Extrato protéico precipitado a 30-50% de sulfato de amônio
<b>F III</b>	Extrato protéico precipitado a 50-80% de sulfato de amônio
<b>HS</b>	Heparam sulfato
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>NAcGlc</b>	N-acetilglicosamina
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio

## RESUMO

Neste trabalho foram purificadas e caracterizadas parcialmente duas N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases (F11 e F15) extraídas de gônadas do equinoderma marinho *Echinometra lucunter*. As enzimas foram purificadas com protocolo seqüencial por precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de exclusão molecular (Sephacryl S-200, Sephadex G-75 e Sephacryl S-200). A fração F11 foi purificada 192,47 vezes com recuperação de 28,5% e F15 85,41 vezes com recuperação de 32,3%. Suas massas moleculares, determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foram respectivamente 116 e 42 kDa. Em Sephacryl S-200 F15 apresentou massa molecular de 84 kDa, sugerindo que esta enzima possui forma dimérica. Utilizando-se p-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -glicosaminídeo como substrato obtivemos  $K_m$  aparente de 0,257 mM e  $V_{max}$  de 0,704 unidades de absorbância a 405 nm / h para a fração 11, e 0,235 mM e  $V_{max}$  de 0,9 unidades de absorbância a 405 nm / h para F15. Ambas frações apresentaram pH e a temperatura ótima de catálise 5,0 e 45 °C, respectivamente. A atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica foi potencialmente inibida por prata, iodoacetamida, N-etilmaleimida e PMSF. A forte inibição de F15 por N-etilmaleimida indica o envolvimento de radicais sulfidríla na hidrólise do substrato sintético, caracterizando também ser uma enzima altamente sensível a este sal.

Palavras-chave: N-Acetil- $\beta$ -glicosaminidases, N-Acetil- $\beta$ -hexosaminidases, glicosidases, *Echinometra lucunter*, glicosaminoglicanos sulfatados, gônadas.

## ABSTRACT

Two  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases (F11 e F15) were purified from *Echinometra lucunter* gonads extracts. The purified enzymes were obtained using ammonium sulfate fractionation, followed by gel filtration chromatographies (Sephacryl S-200, Sephadex G-75 and Sephacryl S-200). The F11 fraction was purified 192.47 -fold with a 28.5% yield, and F15 fraction 85.41 -fold with a 32.3% yield. The molecular weights of the fractions were 116 kDa for F11 and 42 kDa for F15 using SDS-PAGE. In Sephacryl S-200, F15 was 84 kDa, indicating that it is a dimeric protein. When p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glycosaminide was used as substrate, we determined an apparent  $K_m$  of 0.257 mM and  $V_{max}$  of 0.704 for F11 and for F15 the  $K_m$  was 0.235 mM and  $V_{max}$  of 0.9 mM of product liberated by hour. Both enzymes have optimum pH and temperature respectively at 5.0 and 45 °C. The enzymes showed inhibition by silver nitrate, while the glucuronic acid was a potent activator. The high inhibition of F15 by N-ethylmaleimide indicates that sulphhydryl groups are involved in the catalysis of synthetic substrate.

Key words: N-Acetyl- $\beta$ -glicosaminidases, N-Acetyl- $\beta$ -hexosaminidases, *Echinometra lucunter*, sulfatate glycosaminoglycans and gonads.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. GLICOSIDASES.....	19
<b>1.1.1. Endo-N-acetil-<math>\beta</math>-glicosaminidase</b> .....	21
<b>1.1.2. N-acetil-<math>\beta</math>-hexosaminidase</b> .....	26
1.2. GLICOSAMINOGLICANOS .....	27
1.3. DEGRADAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS .....	32
1.4. <i>Echinometra lucunter</i> .....	35
<b>2. MATERIAIS</b> .....	38
2.1. ESPÉCIE EM ESTUDO.....	38
2.2. POLISSACARÍDEOS.....	38
2.3. MONOSSACARÍDEOS E DISSACARÍDEOS.....	39
2.4. SUBSTRATOS SINTÉTICOS.....	39
2.5. OUTROS COMPOSTOS.....	39
2.6. MATRIZES PARA CROMATOGRAFIAS.....	40
2.7. EQUIPAMENTOS.....	40
<b>3. MÉTODOS</b> .....	42
3.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	42
3.2. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO.....	42
3.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200)	42
3.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX G-75)...	43
3.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200)	43

3.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	44
<b>3.6.1. Com substratos naturais.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.2. Com p-nitrofenil derivados de açúcar.....</b>	<b>44</b>
3.7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE – ANALÍTICA PARA GLICOSAMINOGLICANOS.....	45
3.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS – SDS/PAGE.....	46
3.9. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS N-ACETIL- $\beta$ -HEXOSAMINIDASES POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SEPHACRYL S-200.....	47
3.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	47
3.11. ESTUDOS CINÉTICOS.....	47
<b>3.11.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten (<math>K_m</math>) e Velocidade máxima (<math>V_{max}</math>).....</b>	<b>48</b>
<b>3.11.2. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>48</b>
<b>3.11.3. Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>49</b>
<b>3.11.4. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>49</b>
<b>3.11.5. Influência do potencial hidrogeniônico (pH) na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>50</b>
<b>3.11.6. Influência de diversos sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-</b>	



glicosaminídeo.....	51
<b>3.11.7. Influência de carboidratos sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>51</b>
<b>3.11.8. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>52</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES GLICOSIDÁSICAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DO FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO.....	53
<b>4.1.1 Utilizando substratos naturais.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.2. Utilizando p-nitrofenil derivados de açúcar.....</b>	<b>54</b>
4.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).	55
4.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX G-75)....	56
4.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).	57
4.5.RESUMO DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO PROTÉICA.....	60
4.6. PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE.....	61
4.7. ESTUDOS CINÉTICOS DAS N-ACETIL- $\beta$ -GLICOSAMINIDASES.....	62
<b>4.7.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten (Km) e Velocidade máxima (Vmax).....</b>	<b>62</b>
<b>4.7.2. Influência do tempo na hidrólise p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>63</b>
<b>4.7.3. Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7.4. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>65</b>
<b>4.7.5. Efeito da pré-incubação a 60°C na atividade catalítica das N-acetil-<math>\beta</math>-</b>	

<b>hexosaminidases.....</b>	<b>66</b>
<b>4.7.6. Influência do potencial hidrogeniônico (pH) na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>68</b>
<b>4.7.7. Influência de diferentes sais sobre a atividade N-acetil-β-glicosaminidásica.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7.8. Influência de diferentes carboidratos sobre a atividade N-acetil-β-hexosaminidásica.....</b>	<b>72</b>
<b>4.7.9. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo.....</b>	<b>73</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. GLICOSIDASES

As glicosidases são enzimas responsáveis pela hidrólise de glicosídeos O-, N- e S- ligados (SPENCER; DAVIES, 2001), estando desta forma diretamente envolvidas no metabolismo de polissacarídeos e glicoconjugados (MALEY *et al.*, 1989). Seu estudo constitui importante contribuição para o esclarecimento das características estruturais dos carboidratos (SPENCER; DAVIES, 2001).

Segundo RIGDEN (2002), para compensar a notável variedade de carboidratos e glicoconjugados que ocorrem naturalmente, uma correspondente diversidade de enzimas que atuam sobre eles também é produzida, e por este motivo, foi criado um sistema de classificação glicosil-hidrolase (GH), introduzido e desenvolvido por HENRISSAT, (1991) e HENRISSAT; BAIROCH, (1993), o qual está disponível em um banco de dados geral (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) (COUTINHO; HENRISSAT, 1999). Este sistema é mais complexo do que a classificação E.C. que é geral, visto não agrupar as enzimas somente pela função catalítica, mas também de acordo com suas seqüências aminoacídicas e os relacionamentos estruturais entre elas. Agrupando assim, as enzimas de origem evolutiva comum, independentemente das reações que elas catalisam. Aproximadamente 90 famílias de glicosil-hidrolases são atualmente conhecidas (WITHERS, 2002).

A clivagem da ligação glicosídica entre um resíduo de N-Acetil- $\beta$ -D-glicosamina e outro resíduo adjacente, pode ser do tipo exo ou endo glicosidásicas, e essas se encontram distribuídas em seis famílias de glicosil

hidrolases: GH3, GH18, GH19, GH20, GH73 e GH84. Na GH3, encontramos a enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1. 52) que possui tanto atividade glicosaminidásica, como galactosaminidásica. Na família GH18, ocorrem 2 tipos de enzimas com atividade glicosaminidásica, a quitinase (EC 3.2.1. 14) e a endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 96). A única enzima classificada na família GH19 é uma quitinase encontrada em plantas. A família GH20 possui as mesmas características da GH18, entretanto a  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase da GH20 é uma exoglicosidase. A GH84 possui uma  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 52), e a família GH73 possui uma endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 96). A Tabela 01 abaixo sumariza as características das seis famílias citadas.

<b>Família</b>	<b>Atividades conhecidas</b>
GH3	$\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 21); xilano1,4- $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1. 37); $\beta$ -N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1. 52); glicano 1,3- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 58); glicano 1,4- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 74); exo-1,3-1,4-glicanase (EC 3.2.1. -); $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1. 55)
GH18	quitinase (EC 3.2.1. 14), endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 96)
GH 19	quitinase (EC 3.2.1. 14)
GH20	$\beta$ -hexosaminidase (EC 3.2.1. 52); lacto-N-biosidase (EC 3.2.1. 140)
GH73	endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 96); $\beta$ -1,4-N-acetilmuramoilhidrolase
GH84	$\beta$ -N-acetilglicosaminidase (EC 3.2.1. 52); hialuronidase (EC. 3.2.1.35)

**Tabela 01- Famílias de glicosidases que possuem atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica.**

(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) (Coutinho e Henrissat, 1999).

### 1.1.1. Endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase

São classificadas como endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases as enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre um resíduo de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina e um monossacarídeo adjacente dentro de uma cadeia oligossacarídica. De acordo com esta definição, três tipos de endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases podem ser classificadas: as que atuam em mureína, as que atuam em N-glicanos e as que atuam em quitina (KARAMANOS, 1997).

A mureína compõe a parede celular de muitas bactérias sendo formada por cadeias lineares de N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilmurâmico unidos por

ligações  $\beta$  (1,4). As endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases com ação sobre mureína agem quebrando tais ligações  $\beta$  (1,4) em sítios internos do peptideoglicano (Figura 1A). Assim como o seu substrato, as endo-N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases que atuam sobre mureína são específicas de bactérias (KARAMANOS, 1997). Esta atividade endo-glicosidásica já foi detectada em *Bacillus cereus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis*, bem como em *Escherichia coli* (KAWAGASHI *et al.*, 1980; GUBISH *et al.*, 1982; VITKOVIC, 1987; RIVAS *et al.*, 2002).

Os N-glicanos representam os oligossacarídeos de proteínas N-glicosiladas, que são encontrados em todas as células animais, vegetais, fúngicas e em muitos vírus. As endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidases que atuam em N-glicanos promovem a N-deglicosilação de glicoproteínas, pela hidrólise da ligação entre dois resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina, separando assim, um oligossacarídeo com um resíduo de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina no terminal redutor e deixando uma proteína (ou um peptídeo ou um simples resíduo de asparagina) com um outro resíduo de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina ligado (Figura 1D). Estas enzimas são igualmente distribuídas entre bactérias, fungos, plantas e animais; em leveduras sua presença não foi detectada (KARAMANOS, 1997).

A quitina é o principal componente estrutural do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Ela é constituída por resíduos de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (ou N-acetil-D-glicosamina) unidos por ligações  $\beta$  (1,4) (KARAMANOS, 1997). As endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidases que atuam sobre a quitina são chamadas de quitinases (EC. 3.2.1.14). Estas enzimas possuem uma específica atividade degradativa sobre a quitina, e atuam quebrando randomicamente o

polissacarídeo (Figura 1B), liberando como produtos finais, oligossacarídeos solúveis com baixa massa molecular (KRAMER e KOGA, 1986; REYNOLDS e SAMUELS, 1996; KARAMANOS, 1997).

Estas enzimas também atuam na degradação de outros carboidratos, como a mureína e fatores de nodulação (Figura 1C). Os fatores de nodulação são semelhantes à quitina, sendo formados por resíduos de N-acetil-D-glicosamina unidos por ligações  $\beta$  (1,4), onde o resíduo terminal não redutor carrega um grupo acil (KARAMANOS, 1997). Em plantas estes fatores induzem a divisão celular e diferenciação em raízes (KAMST *et al.*, 1999) e são substratos efetivos para quitinases de plantas (SCHULTZ *et al.*, 1993; STAEHELIN *et al.*, 1994). As endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidases, que atuam sobre quitina, são produzidas por bactérias, plantas superiores e por todos os organismos que contém quitina (KARAMANOS, 1997).

As quitinases possuem importantes papéis na biologia dos organismos vivos. Baseados nisso, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas, visando utilizar estas enzimas, bem como as outras N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases, como ferramentas de aplicabilidade biotecnológica. Isso inclui sua utilização em biopesticidas e na produção de plantas transgênicas com maior capacidade de resistir a patógenos (VIERHEILIG *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 1995). Estas enzimas, também podem ser alvos no controle biológico de pragas, visto que alosamidinas, estiloguanidinas e argifinas são potenciais inibidores naturais destas enzimas, sendo capazes de interromper reações do metabolismo da quitina, interferindo no ciclo de vida de organismos como insetos e fungos patogênicos, bem como cracas

(crustáceos da sub-classe cirripedia) que causam sérios danos aos cascos de embarcações (KATO *et al.*, 1995; GRIFFITH; DANISHEFSKY, 1996; SHIOMI *et al.*, 2000).



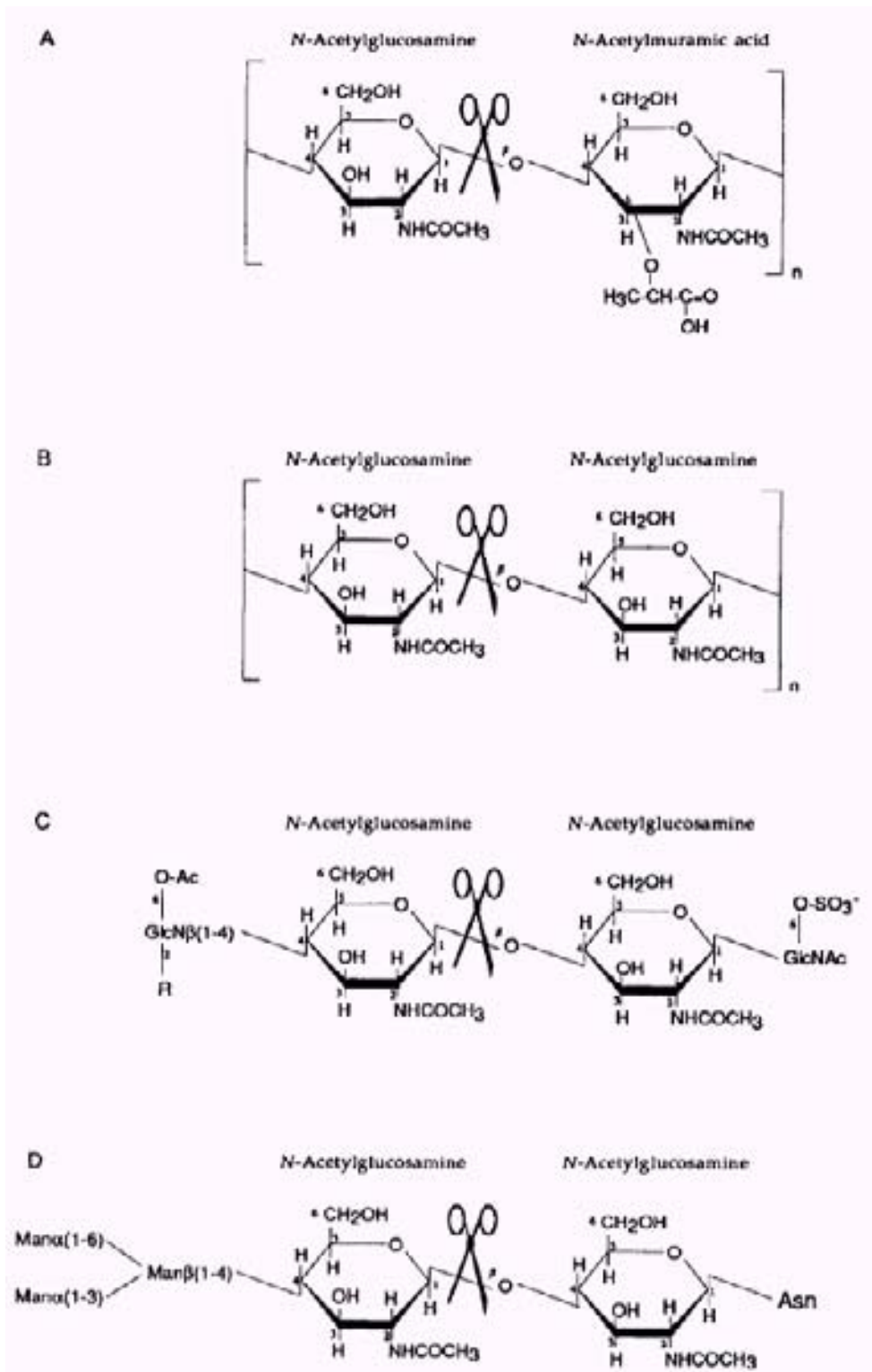


Figura 01: Ponto de hidrólise das endo-N-acetil- $\beta$ -glucosaminidases sobre alguns carboidratos. (A) Mureína; (B) Quitina; (C) Fator de nodulação; (D) N-glicano (KARAMANOS, 1997)

### 1.1.2. N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase

As N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases pertencem a um grupo de enzimas que removem resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina dos terminais não redutores das cadeias de carboidratos, sendo assim consideradas exoglicosidasas (HORSCH *et al.*, 1997). Estas enzimas também são denominadas de N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase (EC 3.2.1.52), devido ao fato de possuírem atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica bem como atividade N-acetil- $\beta$ -galactosaminidásica (KRESSE; GLÖSSL, 1987; HORSCH *et al.*, 1997; NIIMI *et al.*, 2001). O papel bioquímico dessa enzima vem sendo estudado em bactérias, fungos e artrópodes. Em humanos, sua determinação no plasma e na urina tem sido utilizada na detecção precoce de doenças mesmo antes de manifestações clínicas, em particular nos casos de hipertensão, danos e distúrbios renais, depressão e mucopolissacaridoses (MUZZARELLI, 1999).

As N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases apresentam grande variedade de substratos. Elas atuam em polissacarídeos ou em produtos da ação de endoenzimas, que liberam di, oligos ou polissacarídeos, que apresentem resíduos de N-acetil- $\beta$ -glicosamina no terminal não redutor da cadeia glicosídica (SAKAI *et al.*, 1990).

As N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases podem atuar sobre os p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeos (substratos sintéticos compostos por uma molécula de p-nitrofenol e um resíduo de açúcar). Quando hidrolisados estes substratos liberam como produto, a molécula de p-nitrofenol e o resíduo de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina.

Em meio básico o p-nitrofenol transforma-se em p-nitrofenolato que absorve luz no comprimento de onda de 405 nm.

Segundo KRESSE e GLÖSSL, (1987) as isoenzimas de  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase são ativas na degradação de glicosaminoglicanos como condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato e dermatan sulfato. A atuação destas enzimas também foi relatada em oligossacarídeos ligados a glicoproteínas (HORSCH *et al.*, 1997) e em mureína (peptidoglicano da parede bacteriana) (CHAPMAN; PERKINS, 1983).

## 1.2. GLICOSAMINOGLICANOS

Os Glicosaminoglicanos (GAG) são um grupo de heteropolissacarídeos aniônicos, complexos e lineares consistindo de seqüências dissacarídicas repetidas, unidas por ligações glicosídicas, onde um dos resíduos é uma hexosamina (glicosamina ou galactosamina); e o outro, um ácido urônico (glucurônico ou idurônico) ou unidades de galactose. Estes resíduos se encontram usualmente sulfatados em várias posições, resultando em considerável heterogeneidade e alta carga negativa (DIETRICH, 1984), favorecendo interações com uma diversidade de proteínas, envolvidas em processos biológicos importantes. Por isso é crescente o interesse da indústria farmacêutica na pesquisa destes compostos sulfatados isolados de organismos aquáticos.

A classificação dos glicosaminoglicanos baseia-se, principalmente na estrutura química desses açúcares complexos e os relaciona em função: a) Do tipo de hexosamina encontrada, que pode ser N-acetilada, N-sulfatada, N-

acetilada-6-sulfatada, N-acetilada-4-6-dissulfatada; b) Do açúcar não nitrogenado (ácido idurônico ou ácido glicurônico), c) Do tipo de ligação glicosídica (intra e interdissacarídicas,  $\beta$ -1,4;  $\beta$  -1,3 ou  $\beta$ -1,4) e, D) Da presença, quantidade e posição dos grupamentos sulfato (NADER, 1991; PAVÃO *et al.*, 1995; NADANAKA *et al.*, 1998; NADER *et al.*, 1999b). Dessa maneira, podem-se classificar os diversos tipos de glicosaminoglicanos em: ácido hialurônico (AH), único não sulfatado; condroitim 4 e 6 sulfato (C-4-S, C-6-S); heparam sulfato (HS), heparina (Hep), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (KS) (DIETRICH; NADER; STRAUS, 1983; DIETRICH *et al.*, 1998; 1999), como mostrado na Figura 02.

Com exceção do ácido hialurônico, os glicosaminoglicanos se encontram covalentemente ligados a um core de proteínas, formando macromoléculas chamadas proteoglicanos. Estas moléculas podem ser encontradas no interior celular, em suas superfícies, ou nas matrizes extracelulares de uma grande variedade de tecidos de vertebrados e invertebrados (SANTOS *et al.*, 2002). Embora não se encontre ligado à proteína formando um proteoglicano, o ácido hialurônico interage com proteoglicanos na matriz extracelular formando grandes complexos.

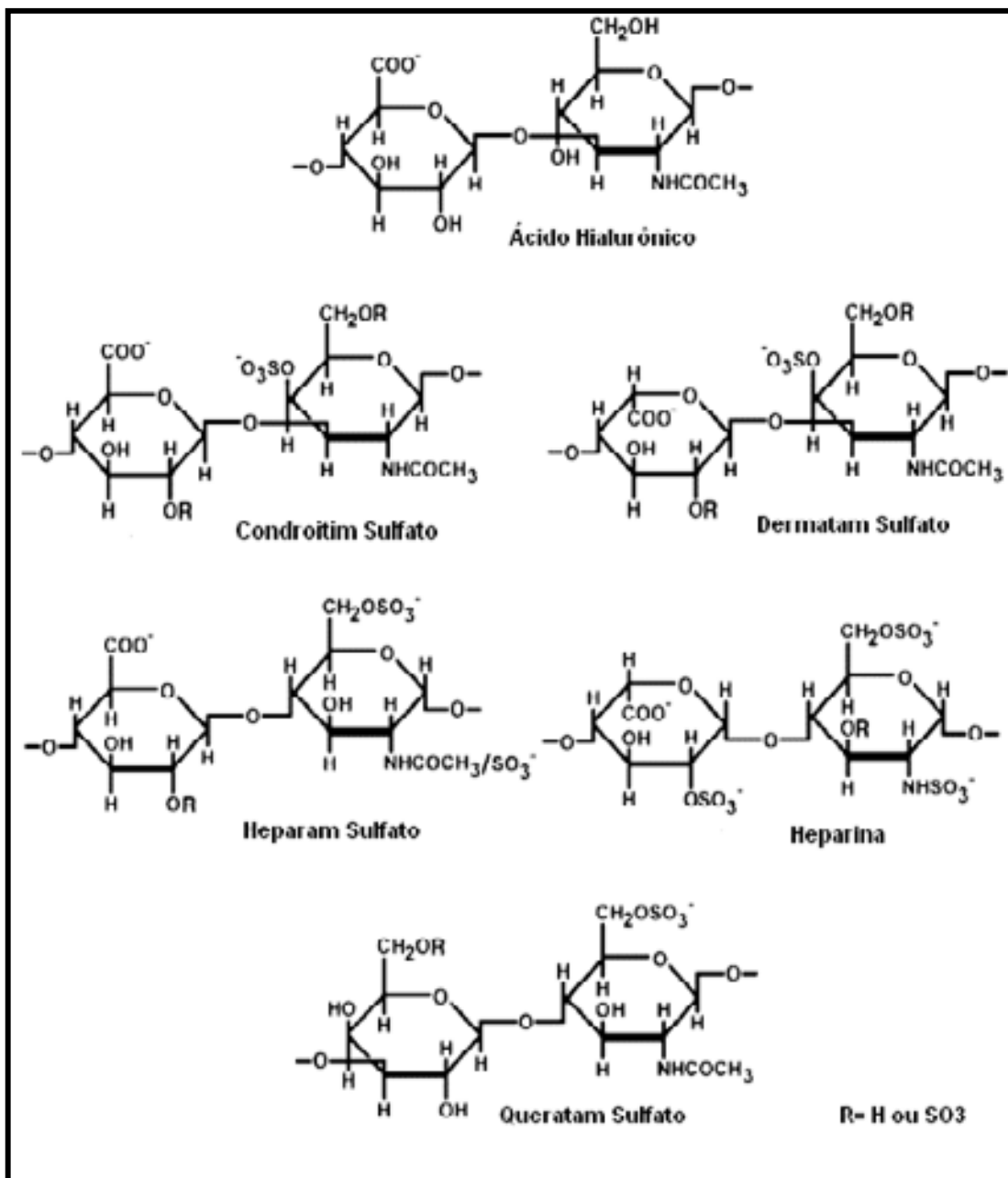
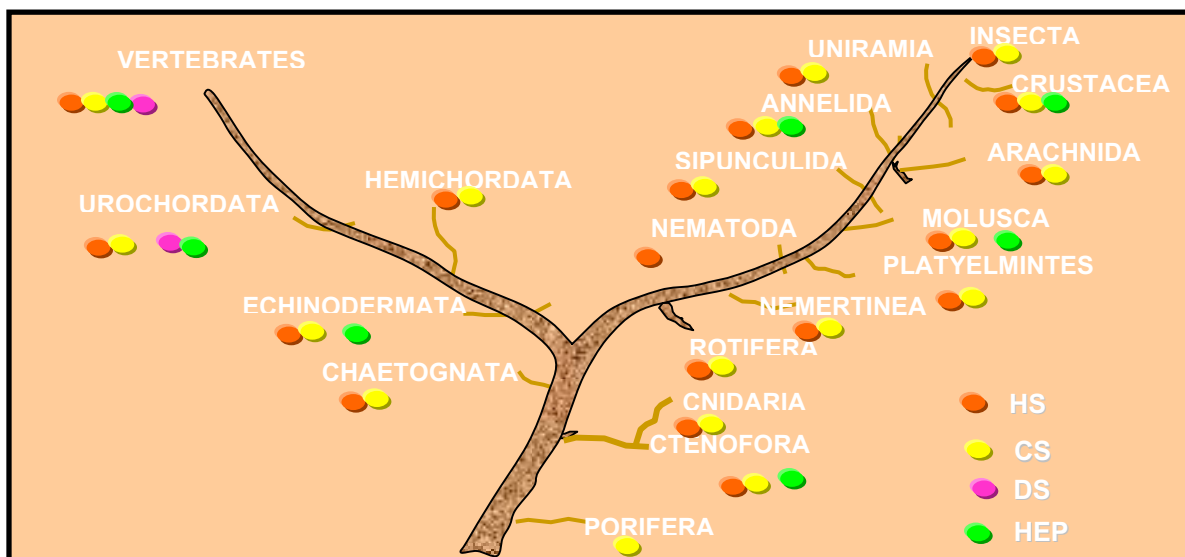


Figura 2: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos (VOLPI; MACARI, 2006)

O estudo da distribuição dos glicosaminoglicanos mostrou que, com exceção de bactérias, fungos e protozoários, os glicosaminoglicanos estão presentes em todos os filos do reino animal que apresentam organização tissular. Eles aparecem desde espongiários até mamíferos (NADER, 1991; SPILLMAN *et al.*, 1995; NADER *et al.*, 1996; NADER *et al.*, 1999b; MEDEIROS, 1999). A distribuição é tecido-específica (DIETRICH *et al.*, 1983), com exceção da heparina, cuja distribuição acompanha a de mastócitos, únicas células que as contém (SANTOS *et al.*, 2002).

CÁSSARO e DIETRICH (1977) realizaram um estudo sistemático de distribuição desses compostos em 22 espécies de invertebrados pertencentes ao filo Porífera, Coelenterata, Annelida, Molusca, Arthropoda e Equinodermata. Este estudo demonstrou que todas as espécies continham quantidades variáveis de um ou mais tipos de glicosaminoglicanos sulfatados. MEDEIROS e colaboradores (2000) estenderam este estudo com mais 23 espécies de 13 filos de invertebrados e demonstraram que o heparano sulfato é encontrado em todas as espécies estudadas. A heparina foi encontrada em 10 espécies, sendo cinco de crustáceos.

A ocorrência dos glicosaminoglicanos em todo o reino animal indica que eles são conservados ao longo do processo evolutivo (MEDEIROS *et al.*, 2000) (Figura 3) e que participam de processos biológicos importantes relacionados ao desenvolvimento animal (PAVÃO *et al.*, 1996).



**Figura 3: Distribuição dos Glicosaminoglicanos Sulfatados no reino animal (MEDEIROS *et al*, 2000).**

A ampla distribuição destes polissacarídeos em invertebrados sugere possíveis papéis biológicos relacionados as suas características estruturais, em particular, as propriedades aniônicas; e, sua presença nos diversos órgãos desses invertebrados indica a possível presença de enzimas relacionadas à catálise destas moléculas. Os glicosaminoglicanos participam de muitas funções biológicas, onde estas variam de acordo com as particularidades estruturais dos compostos bem como com o tipo de tecido onde os mesmos estão presentes (MAYER-SONNENFELD, 2005). São funções altamente diversificadas que vão desde simples suporte mecânico às mais complexas, como adesão, motilidade, proliferação, diferenciação e morfogênese celular. Outras funções como atividade anticoagulante e atividade antiproliferativa da heparina e heparam sulfato são expressas pela cadeia de GAG livre (KJÉLLEN; LINDAHL, 1994). Esses compostos também estão relacionados ao desenvolvimento neuronal, crescimento

tumoral e metástase, invasão viral e injúrias na coluna vertebral, além de modular vias chaves de sinalização essenciais para promover o crescimento celular e angiogênese. Por serem importantes para o desenvolvimento cerebral, estudos têm sido realizados no sentido de elucidar sua ligação com a patologia da doença de Alzheimer (GAMA; HSIEH-WILSOR, 2005). Os glicosaminoglicanos obtidos pela extração e purificação de diferentes tecidos animais possuem várias atividades biológicas, bem como propriedades farmacológicas, sendo a base para importantes drogas para o uso nas áreas clínicas e farmacêuticas (VOLPI, 2005).

### 1.3. DEGRADAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS

Para se descrever a degradação enzimática dos GAGs, devemos considerar que estes compostos se encontram nos tecidos sob a forma de proteoglicanos. Deste modo como primeira etapa de degradação, tem-se o ataque proteolítico destes compostos com quebra parcial do esqueleto protéico, para que então os polissacarídeos sejam degradados por glicosidases e sulfatases específicas (HERS; VAN HOOFF, 1973; HOPWOOD, 1989; GLOSSL, 1987).

Para a degradação enzimática total do condroitim sulfato e dermatam sulfato em vertebrados, atuam as seguintes enzimas: endoglucuronidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-iduronidase,  $\beta$ -N-acetilgalactosaminidase e sulfatases (NEUFELD, 1974; KRESSE; GROSSL, 1987; DIETRICH, 1991). Inicialmente, o polímero é fragmentando em oligossacarídeos por ação da endoglucuronidase. Posteriormente, a partir do terminal não redutor atuam de modo seqüencial as exoenzimas. A  $\beta$ -glucuronidase age removendo o resíduo de ácido glucurônico,



em seguida ocorre à ação da N-acetilgalactosamina 6-sulfatase que remove o éster de sulfato da posição C-6 da hexosamina, posteriormente à ação destas enzimas, a  $\beta$ -N-acetilgalactosaminidase atua removendo o resíduo de N-acetilgalactosamina. O ciclo repete-se até a degradação total da molécula (NEUFELD, 1974; GLASER; CONRAD, 1979). Para a dessulfatação destes compostos duas sulfatases foram identificadas: N-acetilgalactosamina 4-sulfatase e N-acetilgalactosamina 6-sulfatase (MATALON *et al.*, 1974; FREEMAN; HOPWOOD, 1989). O dermatam sulfato é degradado de forma semelhante ao condroitim sulfato, incluindo ainda a  $\alpha$ -L-iduronidase. A enzima N-acetilgalactosamina 4-sulfatase parece atuar tanto sobre condroitim sulfato quanto sobre dermatam sulfato (KRESSE; GROSSL, 1987). As enzimas iduronosil-2-sulfatase e glucuronato-2-sulfatase atuam removendo os grupamentos sulfato da posição C-2 dos ácidos idurônico e glucurônico, que por vezes podem estar presentes nestes açúcares.

No estudo da degradação de heparina e heparam sulfato, várias sulfatases foram isoladas e caracterizadas. Essas sulfatases funcionaram em alternância com as enzimas:  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-iduronidase,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase e acetil-CoA-N-glucosaminiltransferase (KRESSE e GROSSL, 1987; HOPWOOD, 1989; DIETRICH, 1991; NEUFELD e MUENZEN, 1995).

Nas bactérias *Flavobacterium heparinum*, *Proteus sp.* e *Arthrobacter sp.*, o condroitim sulfato e o dermatam sulfato são inicialmente degradados por ação das liases condroitinase AC (SUZUKI *et al.*, 1968; YAMAGATA *et al.*, 1968;

MICHELACCI e DIETRICH, 1975; HORTON e MICHELACCI, 1986), condroitinase B (MICHELACCI e DIETRICH, 1974; MICHELACCI e DIETRICH, 1975), condroitinase C (MICHELACCI e DIETRICH, 1976), condroitinase ABC (SUZUKI *et al.*, 1968; YAMAGATA *et al.*, 1968; MICHELACCI *et al.*, 1987) formando dissacarídeos insaturados. Estas enzimas quebram a ligação glicosídica introduzindo uma dupla ligação entre C-4 e C-5 do resíduo de ácido urônico (LINHARDT *et al.*, 1986). A condroitinase ABC de *F. heparinum* apresenta um modo de ação distinto das demais, liberando dissacarídeos insaturados a partir do terminal redutor das moléculas (MICHELACCI *et al.*, 1987). Os respectivos dissacarídeos 4- e 6-sulfatados são então dessulfatados por 4 e 6-sulfo-hidrolases específicas (condro-4-sulfatase e condro-6-sulfatase) (DIETRICH, 1991; NADER *et al.*, 1993). Estas sulfatases bacterianas atuam unicamente sobre dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato e dermatam sulfato diferenciando-se assim das sulfatases de mamíferos que agem nos oligossacarídeos. Os dissacarídeos podem também ser degradados a N-acetilgalactosamina sulfato por ação das glicuronidases (KRESSE e GROSSL, 1987).

Em invertebrados, estudos relacionados a estas enzimas, têm sido realizados em nossos laboratórios. Como por exemplo, a degradação de condroitim sulfato, liberando ácido glucurônico e  $\beta$ -N-acetilhexosaminas a partir de extratos de *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus gibbus*, indicando a presença de  $\beta$ -N-acetilhexosaminidases e  $\beta$ -glucuronidases nestes organismos. Em 1990, SOUZA F<sup>o</sup> isolou uma condroitim sulfato 4,6-sulfatase do molusco *Anomalocardia brasiliiana* que apresentou um mecanismo de ação diferente daquelas de

mamíferos. A enzima atuou sobre o polímero intacto de condroitim 4- ou 6-sulfato removendo os grupamentos sulfatos sem necessidade de fragmentação do composto. Posteriormente, estes polímeros dessulfatados foram degradados a seus açúcares constituintes por ação sequencial da  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -N-acetilgalactosaminidase.

Estudos realizados durante as várias fases do desenvolvimento embrionário do molusco *Pomacea sp*, mostraram a presença de sulfatases e exoglicosidases envolvidas na degradação do condroitim sulfato (OLIVEIRA *et al.*, 1992). Alguns trabalhos na literatura indicaram que outras espécies de moluscos apresentam sulfatases com mecanismos de ação semelhantes (LLOYD *et al.*, 1968; ATSUMI *et al.*, 1972).

#### 1.4. *Echinometra lucunter*

Os ouriços-do-mar são animais bentônicos por viverem associados ao substrato do seu ambiente. São encontrados em depressões nas rochas, produzidas pela ação de seus espinhos e, principalmente, do aparelho raspador (lanterna-de-Aristóteles). Possuem corpo globoso e simetria radial, a qual lhes permitem tomar contacto com todas as direções do espaço, compensando a pouca mobilidade desses animais. Têm espinhos móveis de tamanho variado, presos a uma carapaça calcária rígida, cujo diâmetro varia de 7 a 15cm. As espécies de ouriço-do-mar são dióicas, ou seja, cada indivíduo produz apenas um tipo de gameta (espermatozóide ou óvulo), mas poucos apresentam dimorfismo sexual. Os gametas são lançados no ambiente e se atraem quimicamente para

ocorrer a fecundação e formação do zigoto. Este geralmente se desenvolve externamente, embora haja espécies que incubem seus ovos. O desenvolvimento é indireto, com formação de uma larva equinoplúteo, caracterizada por apresentar braços, os quais desaparecem com a metamorfose. *Echinometra lucunter* é típico da zona entremarés de praias rochosas, sobretudo na região de arrebentação, mas pode viver até a 40m de profundidade. *Echinometra lucunter*, como a maioria dos ouriços-do-mar, alimenta-se raspando com os dentes algas e outros organismos fixos no substrato (HENDLER *et al*, 1995).

Há poucos estudos sobre essa espécie de ouriço-do-mar, principalmente no âmbito da enzimologia. Os trabalhos existentes abrangem na maioria das vezes outras espécies e aspectos relacionados à: bio-controle de sedimentos (LODEIROS; GARCIA, 2004), indução da reação acrossomal por fucanas sulfatadas (HIROHASHI *et al*, 2002), impacto da indústria petrolífera sobre essa espécie (NASCIMENTO *et al*, 2000), temperatura ideal de fertilização (SEWELL; YOUNG, 1999) e dispersão oceânica da espécie (McCARTNEY, KELLER, LESSIOS, 2000).

Os estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa sugerem uma ampla perspectiva de trabalhos a serem realizados com endo-, exoglicosidases e sulfatases encontradas em invertebrados marinhos. Os resultados até agora obtidos apontam para a existência de muitas diferenças, no que diz respeito a estas enzimas, entre as classes de invertebrados marinhos já estudados. O estudo e posterior purificação de atividades glicosidásicas e sulfatásicas destes organismos servirão como ferramenta molecular na elucidação da estrutura química de glicosaminoglicanos de invertebrados e de polissacarídeos acídicos de

algas marinhas. Assim como, posteriormente, como moduladoras da atividade biológica de carboidratos complexos. Com base nas razões acima discutidas, os objetivos do presente estudo consiste em:

- Identificar endo e exoglicosidases em extratos protéicos do equinoderma *Equinometra lucunter*;
- Purificar através de métodos cromatográficos N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases;
- Determinação do  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . das enzimas purificadas;
- Caracterizar cineticamente as N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases.

## 2. MATERIAIS

### 2.1. ESPÉCIE EM ESTUDO

POSIÇÃO SISTEMÁTICA: (HENDLER *et al.* 1995)

- Filo: Echinodermata
- Classe: Echinoidea
- Ordem: Echinoidea
- Família: Echinometridae
- Gênero: Echinometra
- Espécie: *Echinometra lucunter*



**Figura 04- *Echinometra lucunter***  
[www.usp.br/cbm/artigos/galeria/echinoidea/echinometra.html](http://www.usp.br/cbm/artigos/galeria/echinoidea/echinometra.html)

Os animais foram coletados na praia de Santa Rita, litoral Norte do município de Natal – Rio Grande do Norte. Suas gônadas foram retiradas, acondicionadas a quatro graus centígrados, levadas ao laboratório e mantidas em congelador até o seu processamento.

### 2.2. POLISSACARÍDEOS

Glicosaminoglicanos: condroitim 4 sulfato (C4S) extraído de cartilagem de baleia, condroitim 6 sulfato (C6S) extraído da cartilagem de tubarão e dermatam sulfato (DS) extraído da pele de porco foram adquiridos da Seikagaku Kogyo (Tóquio, Japão). Heparan sulfato (HS) foi gentilmente cedido

pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Bonciani Nader (UNIFESP/SP). Heparinas purificadas de mucosa intestinal bovina e de pulmão bovino, foram fornecidas respectivamente, pela LAOB Laboratórios (Barueri SP, Brasil) e pela UpJohn Co (Kalamazoo, MI, EUA).

### 2.3. MONOSSACARÍDEOS E DISSACARÍDEOS

Ácido D-glicurônico, D-glicose, L-fucose, N-Acetil- $\beta$ -D-glicosamina, N-Acetil- $\beta$ -D-galactosamina, D-manose, D-galactose, foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

### 2.4. SUBSTRATOS SINTÉTICOS

N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, p-nitrofenil  $\beta$ -D-manopiranosídeo; p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucuronídeo; p-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminídeo; p-nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo; p-nitrofenil  $\beta$ -D-fucopiranosídeo foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA).

### 2.5. OUTROS COMPOSTOS

- Agarose (Standard-Low-Mr) foi adquirida da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA).
- 1,3 diaminopropano acetato (PDA) foi adquirido da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwaukee, WI, EUA).
- Brometo de cetil trimetilamônio (CETAVLON) da British Drug House Chemicals Ltd. (Poole, Inglaterra).

- Azul de toluidina, albumina sérica bovina, persulfato de amônio, glicina, N, N, N', N'tetra-metileno diamino (TEMED), Nitrato de prata, "coomassie brilhante blue" R 250, "coomassie brilhante blue" G 250 foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Fair Lawn, NY, EUA).
- Acrilamida e bisacrilamida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), Dodecil sulfato de sódio (SDS) da Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Indústria Brasileira- Rio de Janeiro).
- Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) foram adquiridos da VETEC Química Fina LTDA – RJ; ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ )-MERCK – Rio de Janeiro.
- Padrões de massa molecular para eletroforese da Ferments Life Sciences ( $\beta$ -galactosidase – 116 kDa, albumina – 66,2 kDa, ovoalbumina – 45 kDa, lactato desidrogenase – 35 kDa, endonuclease de restrição – 25 kDa,  $\beta$ -lactoglobulina 18,4 kDa e lisozima – 14,4 kDa).

Todos os reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

## 2.6. MATRIZES PARA CROMATOGRAFIAS

- Sephacryl S-200 da Sigma Chemical Company .
- Sephadex G-75 da G.E. Healthcare.

## 2.7. EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital, modelo 2525, FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).



- Banhos e estufas de temperaturas constantes FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bomba peristáltica modelo 18-1110-91 e coletor de frações modelo 18-1003-64, Pharmacia Biotech, (Uppsala, Suíça).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col., Técnica Permatron Ltda (São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga refrigerada modelo CR 21 da Hitachi Koki Co., Ltda. (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetro Hitachi U 2000 (Japão).
- Fonte de corrente contínua regulável, desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda., Industria e Comércio (São Paulo, SP, Brasil).
- Sistema de eletroforese em gel vertical, modelo Mini-V 8.10 da BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA).
- Medidor de pH Digimed (São Paulo, SP, Brasil).

### **3. MÉTODOS**

### 3.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Cerca de 150 gramas de gônadas do equinoderma marinho *Echinometra lucunter* foram homogeneizadas com dois volumes de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e centrifugados a 27 mil x g durante 30 min. A fase solúvel (extrato bruto) foi reservada para posterior fracionamento com sulfato de amônio.

### 3.2. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado em três etapas de saturação: 0-30%, 30-50% e 50-80%. Os precipitados resultantes de cada saturação foram ressuspensos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e submetidos a diálise contra o mesmo tampão durante 18 horas a 4°C. As frações de F-I, F-II e F-III foram denominadas, referindo-se aos percentuais de saturação 0-30%, 30-50% e 50-80%, respectivamente.

### 3.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).

Cerca de 01 ml (29,78 mg de proteínas) obtidos da fração FIII foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 (74 cm x 1,8 cm) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, sendo coletadas frações de aproximadamente 2 mL/5min. O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, e o perfil de atividade enzimática utilizando o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo como descrito no item 3.6.2. Este procedimento foi realizado 45 vezes.

### 3.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX G-75).

As frações com atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica, eluídas da Sephacryl S-200, foram reunidas e concentradas com 90% de sulfato de amônio e, após 18 horas, submetidas a uma centrifugação. O precipitado, foi solubilizado em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Cerca de 1 mL (56,16 mg de proteína), foi então aplicado em uma outra cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 (93 cm x 1,2cm), a qual foi equilibrada com o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A coluna foi eluída com o mesmo tampão, sendo coletadas frações de 1 mL/10min. O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, enquanto o perfil de atividade enzimática foi obtido como descrito no item 3.6.2. Este procedimento foi realizado 10 vezes.

### 3.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).

As frações com maior atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica, eluídas da Sephadex G-75, foram reunidas e concentradas com 90% de sulfato de amônio e, após 18 horas, submetidas a uma centrifugação. O precipitado foi solubilizado em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Cerca de 0,68 mg de proteína (2 mL), foi então aplicado em uma outra cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 (104 cm x 0,9cm), a qual foi equilibrada com o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A coluna foi eluída com o mesmo tampão, sendo coletadas frações de 2 mL/5min . O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, o perfil de atividade enzimática foi obtido como descrito no item 3.6.2.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### 3.6.1. Com substratos naturais

Alíquotas das frações precipitadas com sulfato de amônio e o extrato bruto foram incubadas com 20µg de uma mistura de glicosaminoglicanos (CS, DS e HS) a 45° C por 18 horas. Após as incubações, as amostras foram secas sendo em seguida, dissolvidas em 20 µL de água destilada e submetidas à eletroforese em gel de agarose tampão diaminopropano acetato (PDA) pH 9,0 (item 3.7).

#### 3.6.2. Com p-nitrofenil derivados de açúcar

Alíquotas das frações enzimáticas foram incubadas a 45°C durante uma hora com os diferentes p-nitrofenis derivados de açúcar a uma concentração final de 0,15 mM em um volume final de 100 µL. As reações foram interrompidas após a adição de 1 mL de NaOH 0,25N e o p-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm. Para cada ensaio foram feitos controles negativos dos substratos e das frações protéicas.

As atividades específicas foram calculadas pela relação entre a quantidade de p-nitrofenol liberado em uma hora, a 45°C e a massa em µg de proteína adicionada ao ensaio enzimático. A quantidade de produto liberado foi determinada de acordo com o coeficiente de extinção molar ( $E_{405 \text{ nm}}$ ) do p-nitrofenol ( $18,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Uma unidade enzimática (1U) corresponde a 0,01 absorvâncias por hora.

### 3.7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE – ANALÍTICA PARA GLICOSAMINOGLICANOS.

Alíquotas de 5 µL do material incubado com os glicosaminoglicanos, como descrito no item 3.6.1, foram aplicadas em lâminas de gel de agarose 0,55%, tampão 1,3 diaminopropano-acetato (PDA) pH 9,0, em caixa refrigerada a 4°C, sob tensão de 100 mV durante 60 minutos, nestas condições os GAG migram para o pólo positivo. Após a corrida, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel com CETAVLON 0,1%, por um período mínimo de 2 horas. Transcorrido este tempo, o gel foi seco sob corrente de ar quente, sendo em seguida corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%, por 15 minutos. A seguir, o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1% em etanol 50%, e as lâminas foram deixadas para secar a temperatura ambiente; conforme descrito por DIETRICH e DIETRICH (1976).

### 3.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS – SDS/PAGE

Para avaliar o grau de pureza das frações 11 e 15 da segunda cromatografia em S-200, 20 µg de cada fração foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI, (1970). Depois de diluída em tampão de amostra (azul de bromofenol 5%, SDS 20% e sacarose 10%), a alíquota foi aplicada no gel (10 cm x 14 cm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 30 mA por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado em solução de "coomassie

brilhante blue" R 250 0,1%, metanol 40% e ácido acético a 10%. A banda de proteína foi revelada após imersão do gel em uma solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%). Para a detecção de proteínas na ordem de nanogramas, o gel já corado com o azul de "coomassie", foi desidratado com etanol a 50 % (três trocas a cada 20 min), posteriormente, mergulhado em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e mantido sob suave agitação durante 1 minuto. Após este tempo, o gel foi submetido a três lavagens rápidas com água destilada e imerso em solução de nitrato de prata (100 mL de solução de nitrato de prata 0,2%, 74  $\mu$ L de formaldeído 37 %) por 20 minutos. Novamente o gel foi lavado 3 vezes com água destilada e por fim, adicionada solução reveladora (100 mL solução de carbonato de sódio 6 %, 50  $\mu$ L de formaldeído 37 % e 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 %). A reação foi interrompida com ácido acético 13%. Para acompanhar a migração eletroforética da proteína isolada, foram utilizados padrões de proteínas recombinantes na faixa de 14,4 kDa a 116 kDa, da "Ferments Life Sciences".

### 3.9. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS N-ACETIL- $\beta$ -HEXOSAMINIDASES POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SEPHACRYL S-200.

Proteínas com massas moleculares conhecidas ( $\beta$ -amilase, 200 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; Inibidor de tripsina de soja (SBTI), 21 kDa e citocromo C, 12 kDa ), foram aplicadas na Sephacryl S-200 (104 cm x 0,9 cm) equilibrada com

tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0; sendo coletadas frações de aproximadamente 2 mL. O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm. O mesmo foi feito com as frações F11 e F15. Uma vez relacionada a eluição destas frações com as de proteínas de massa molecular conhecida, inferimos a massa molecular de nossas amostras.

### 3.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Em cada passo de purificação foi realizada a dosagem de proteínas pelo método SEDMAK e GROSSBERG (1977), tendo a albumina bovina como padrão.

### 3.11. ESTUDOS CINÉTICOS

Com as frações 11 e 15 obtidas após a cromatografia Sephacryl S-200 foram realizados os testes cinéticos frente a diferentes concentrações de substrato, concentrações de enzima, condições de temperatura e pH. Além disso, foram analisados a influência do tempo, efeito de sais, grupos catalíticos e carboidratos sobre as atividades N-acetil- $\beta$ -hexosaminidásicas.

#### 3.11.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da Velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ )

Com o objetivo de se determinar a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), alíquotas de 5  $\mu$ L da fração 11 (0,17  $\mu$ g) e da fração 15 (0,18  $\mu$ g) foram incubadas a 45°C durante 1 h, junto a concentrações crescentes de p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo (0 a 0,7mM). Os ensaios foram

interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram submetidos a linearização de LINEWEAVER-BURK (1934) para melhor determinação destes parâmetros.

### **3.11.2. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**

A hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo (0,9 mM) foi realizada com diferentes tempos de incubação (5, 15, 30, 60, 90, 150 e 210 minutos), com 5 $\mu$ L das frações 11 (0,17  $\mu$ g) e 15 (0,18  $\mu$ g), a 45°C. Decorrido cada intervalo de tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.11.3. Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**

Com o objetivo de avaliar a proporcionalidade entre as quantidades da enzima e de p-nitrofenol liberadas durante os ensaios, concentrações variáveis de F11 (0,17; 0,34; 0,51; 0,68; 1,02; 1,7  $\mu$ g) e F15 (0,18, 0,36, 0,54, 0,72, 1,08 e 1,8  $\mu$ g) foram incubadas a 45°C, e após 1 h, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.11.4. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**



Para avaliarmos o efeito da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, alíquotas de 5  $\mu$ L da fração 11 (0,17  $\mu$ g) e da fração 15 (0,18  $\mu$ g) foram incubadas a diferentes temperaturas (5, 25, 37, 45, 60, 70 e 80°C) com uma concentração final de 0,9 mM do substrato, e, após 1 h, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

Em outro experimento, foram feitas pré-incubações de 5  $\mu$ L das frações durante 0,5; 1; 5; 15; 20; 30 e 60 minutos a 60°C, na ausência do substrato. Após cada intervalo de tempo especificado foi adicionado p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo para uma concentração final de 0,9 mM. Os ensaios enzimáticos ocorreram então a 45°C durante uma hora, após esse período as reações foram interrompidas com 1mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.11.5. Influência do potencial hidrogeniônico (pH) na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**

Com o objetivo de avaliarmos a influência do pH sobre a hidrólise do substrato sintético, foram preparados tampões em diferentes pH: acetato de sódio 0,1 M pH 3,0, 3,5, 4,0, 5,0 e 5,5; fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8 e tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e 8,5. Alíquotas de 100  $\mu$ L das frações 11 e 15 foram dialisadas durante 18 horas contra os tampões acima citados. Em seguida, foram realizados ensaios enzimáticos com 5  $\mu$ L de cada fração com o substrato sintético para uma concentração final de 0,9 mM, a 45°C, por 1 h. Os ensaios foram interrompidos

com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

Em outro experimento, para avaliar a resistência da enzima à mudança de pH, as frações dialisadas contra os diferentes tampões acima citados, foram submetidas à nova diálise contra o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. Em seguida, foram realizados ensaios enzimáticos com 5  $\mu$ L de cada fração com o substrato sintético para uma concentração final de 0,9 mM, a 45°C, por 1 h. Os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.11.6. Influência de diversos sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.**

Alíquotas de 5  $\mu$ L das frações 11 e 15 foram pré-incubadas a 45°C, durante 15 minutos, na presença de diversos sais a uma concentração final de 1mM. Transcorrido esse tempo, foi adicionado o p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo numa concentração final de 0,9 mM e procedemos com o ensaio a 45°C, e após 1 h, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm. Os sais utilizados nesse experimento foram: sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ), nitrato de

prata ( $\text{AgNO}_3$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ).

### **3.11.7. Influência de carboidratos sobre a atividade enzimática**

Neste experimento, alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  das frações 11 e 15 foram incubadas com os carboidratos (mono e dissacarídeos) em concentrações finais de 1 mM e 0,9 mM de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo. Os ensaios foram realizados a 45°C durante uma hora, e após este período, foram interrompidos pela adição de 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

Os monossacarídeos utilizados foram: ácido glicurônico, frutose, galactose, glicose, galactosamina e N-acetil-D-glicosamina. Os dissacarídeos foram: lactose e maltose. Os ensaios realizados com polissacarídeos foram desenvolvidos nas mesmas condições acima citadas, entretanto foram utilizados 4,5  $\mu\text{g}$  dos seguintes polissacarídeos: condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina.

### **3.11.8. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**

Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  das frações 11 e 15 foram pré-incubadas a 45°C, durante 15 minutos, na presença de compostos que inibem especificamente radicais aminoacídicos. Transcorrido esse tempo, foi adicionado o p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo numa concentração final de 0,9 mM e procedemos com um ensaio

a 45°C, e após 1 h, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm. Os compostos utilizados nesse experimento foram os seguintes: Iodoacetamida ( $C_2H_4INO$ ) e PMSF ( $C_7H_7FO_2S$ ), em concentração final de 1 mM e N-etilmaleimida ( $C_6H_7NO_2$ ) a 5 mM.

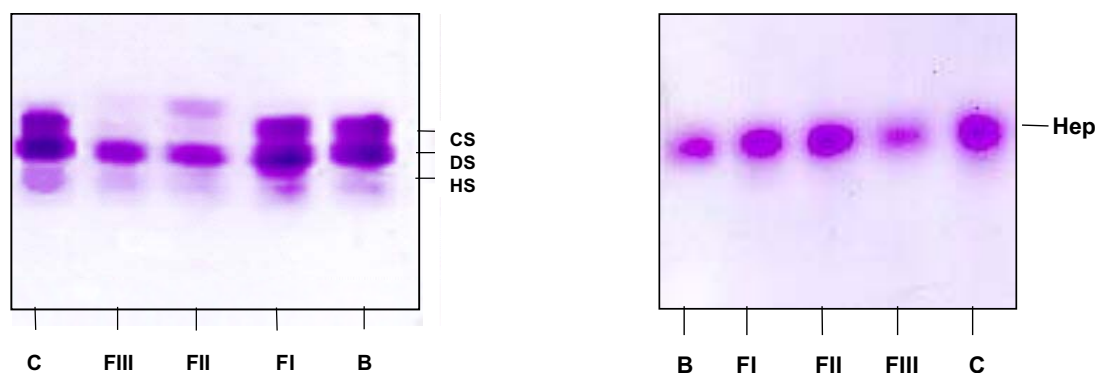
## 4. RESULTADOS

### 4.1-DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES GLICOSIDÁSICAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DO FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO.

#### 4.1.1. Utilizando substratos naturais.

A presença de enzimas com atividade degradativa sobre glicosaminoglicanos foi investigada no extrato bruto e nas frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio (Figura 05). Verificou-se que das três frações obtidas neste fracionamento, FIII (precipitada entre 50-80%) foi a que degradou mais extensamente estes substratos (CS, DS e HS). Foi observado que FIII degrada quase totalmente heparam sulfato e condroitim sulfato, sendo que o dermatam sulfato é pouco degradado. Observa-se também uma boa degradação do heparam sulfato pelo extrato bruto. Com relação à heparina, percebe-se uma boa degradação pela fração FIII e o extrato bruto, quando comparada com as outras frações.

A perda da atividade metacromática dos glicosaminoglicanos sugere a presença, além das endoglicosidases, de hexosaminidases, glicuronidases e sulfatases nas frações precipitadas com sulfato de amônio.

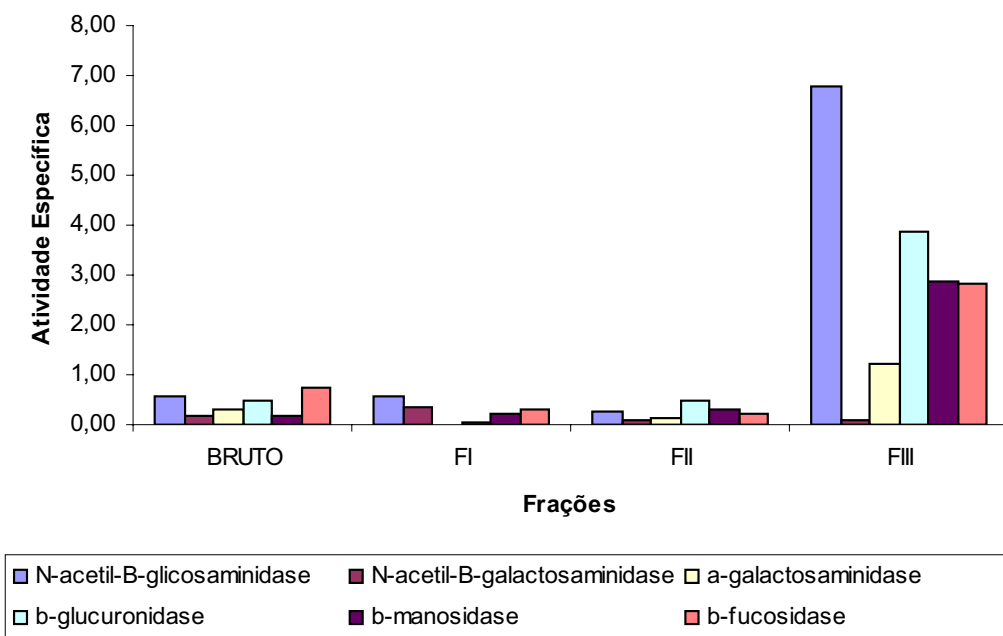


**Figura 5: Degradação de glicosaminoglicanos sulfatados pelas frações enzimáticas de *Equinometra lucunter* precipitadas com sulfato de amônio.**

Cerca de 20 $\mu$ g de glicosaminoglicanos foram incubados com as frações de sulfato de amônio (FI, FII e FIII) a 45°C durante 18 horas. As misturas de incubação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose conforme descrito em Materiais e Métodos. CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; Hep, heparina; C, controle; B, extrato bruto; FI, FII, FIII, frações obtidas das gônadas do *E. lucunter* após precipitação com 0-30%, 30-50% e 50-80% de saturação com sulfato de amônio, respectivamente.

#### 4.1.2. Determinação das atividades enzimáticas utilizando p-nitrofenil derivados de açúcar.

Para a detecção dessas atividades, foram realizados ensaios com substratos sintéticos p-nitrofenil derivados de açúcares (Figura 6). Os resultados obtidos demonstram que houve uma maior precipitação das atividades exoglicosidásicas em FIII. A atividade da N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase apresentou-se maior em FIII, seguida da  $\beta$ -glucuronidase. A fração FIII por apresentar maior atividade sobre o p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, em relação às demais frações, foi submetida ao fracionamento em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).

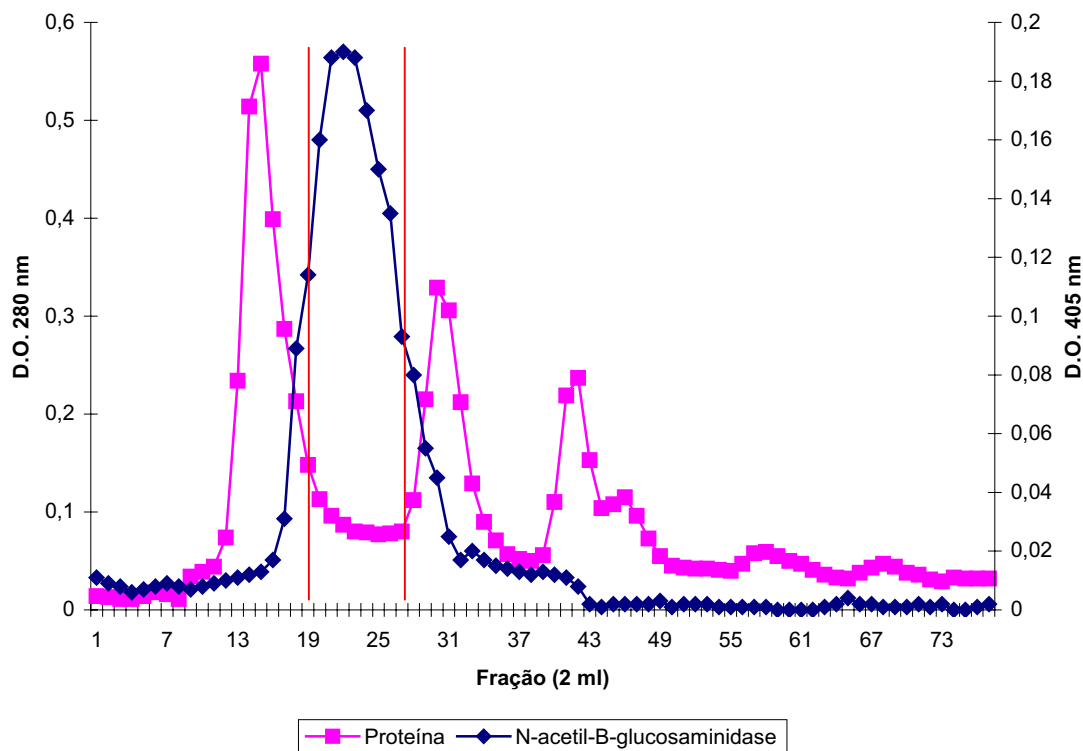


**Figura 6: Atividades específicas das frações enzimáticas de *Equinometra lucunter*.**

Frações do extrato bruto, FI, FII e FIII foram incubadas com cada p-nitrofenil para uma concentração final de 0,15 mM a 45°C, durante 1 hora. As incubações foram interrompidas pela adição de 1mL de NaOH 0,25N e o p-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Onde: Bruto, extrato protéico bruto; FI, FII e FIII, frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente. A atividade específica (D.O. 405nm/ $\mu$ g de proteína) foi encontrada através da relação entre a quantidade de p-nitrofenil liberado e a massa em  $\mu$ g de proteínas de cada fração contida no ensaio, por um período de uma hora.

#### 4.2 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).

A fração FIII foi aplicada em uma cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 para a purificação das frações com atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica. Foram eluídos três picos protéicos e apenas uma faixa de atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica bastante pronunciada (Figura 07). As frações 19 a 27 foram reunidas, concentradas e submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75.



**Figura 07- Perfil de eluição de FIII em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).**

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 2 mL/5min. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil das atividades com o p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo determinadas por leitura a 405 nm.

#### 4.3 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX G-75).

O perfil de eluição em G-75 revelou um pico protéico bem destacado (280 nm) e dois picos de atividade após a leitura em espectrofotômetro a 405 nm (Figura 08). As frações referentes ao primeiro e maior pico de atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica foram reunidas, concentradas e submetidas à outra cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200.



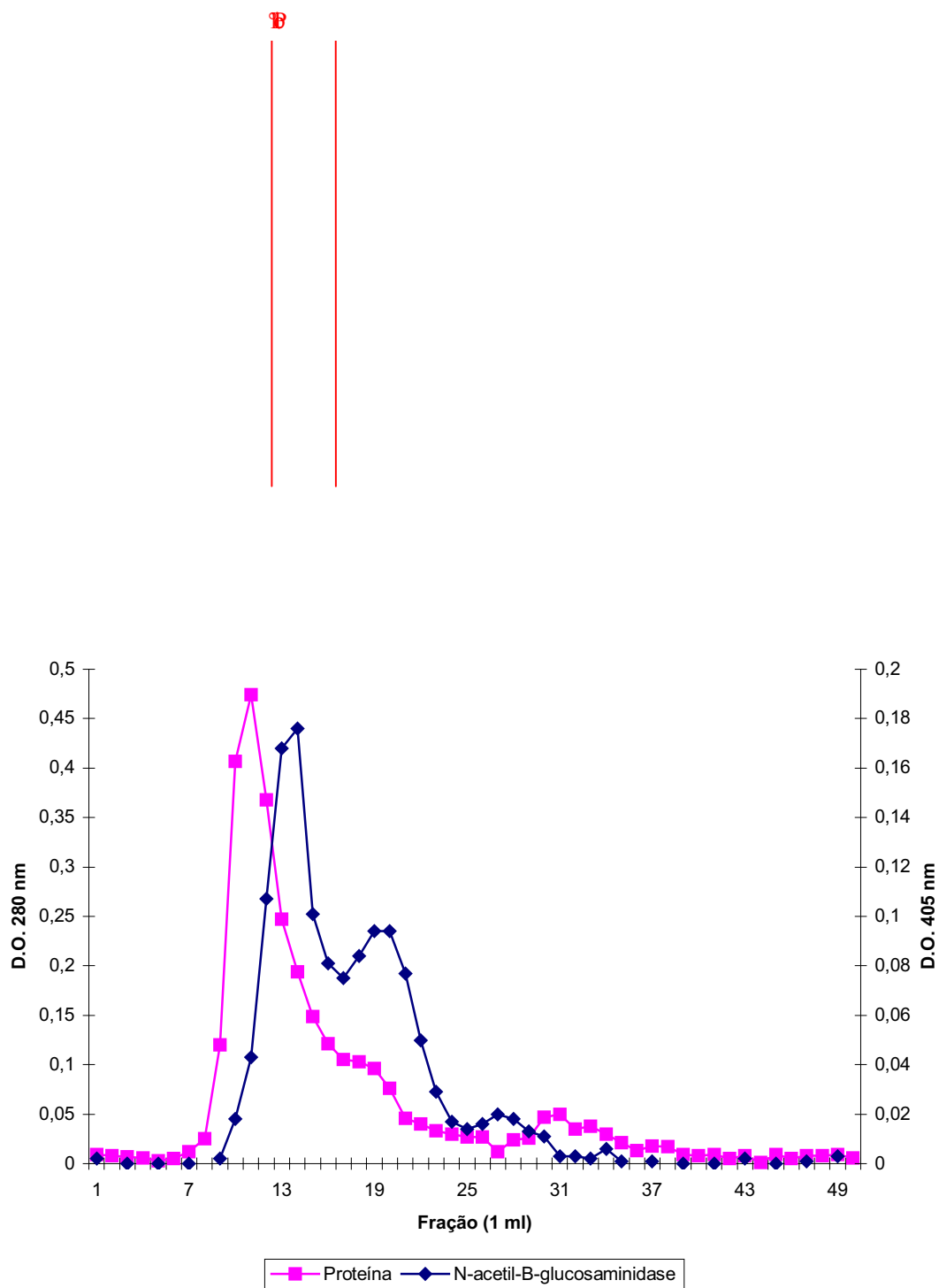


Figura 08- Perfil de eluição da N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75).

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 1mL/10 min. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil das atividades com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo determinadas por leitura a 405 nm.

#### 4.4- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHACRYL S-200).

O perfil de fracionamento em Sephacryl S-200 está representado na Figura 09. Observa-se que esta coluna revelou um pico protéico mais destacado e dois picos de atividade N-acetil-β-glicosaminidásica de interesse, que foram denominadas F11 e F15.

Esta coluna foi calibrada com padrões de peso molecular conhecidos, e de acordo com o volume de eluição, podemos inferir que as proteínas eluídas nos picos com atividade N-acetil-β-glicosaminidásica (F11 e F15), possuem cerca de 137 kDa e 84 kDa, respectivamente. A figura 10 mostra a boa correlação ( $R^2=0,9429$ ) entre o logaritmo do peso molecular e o volume de eluição das frações protéicas.

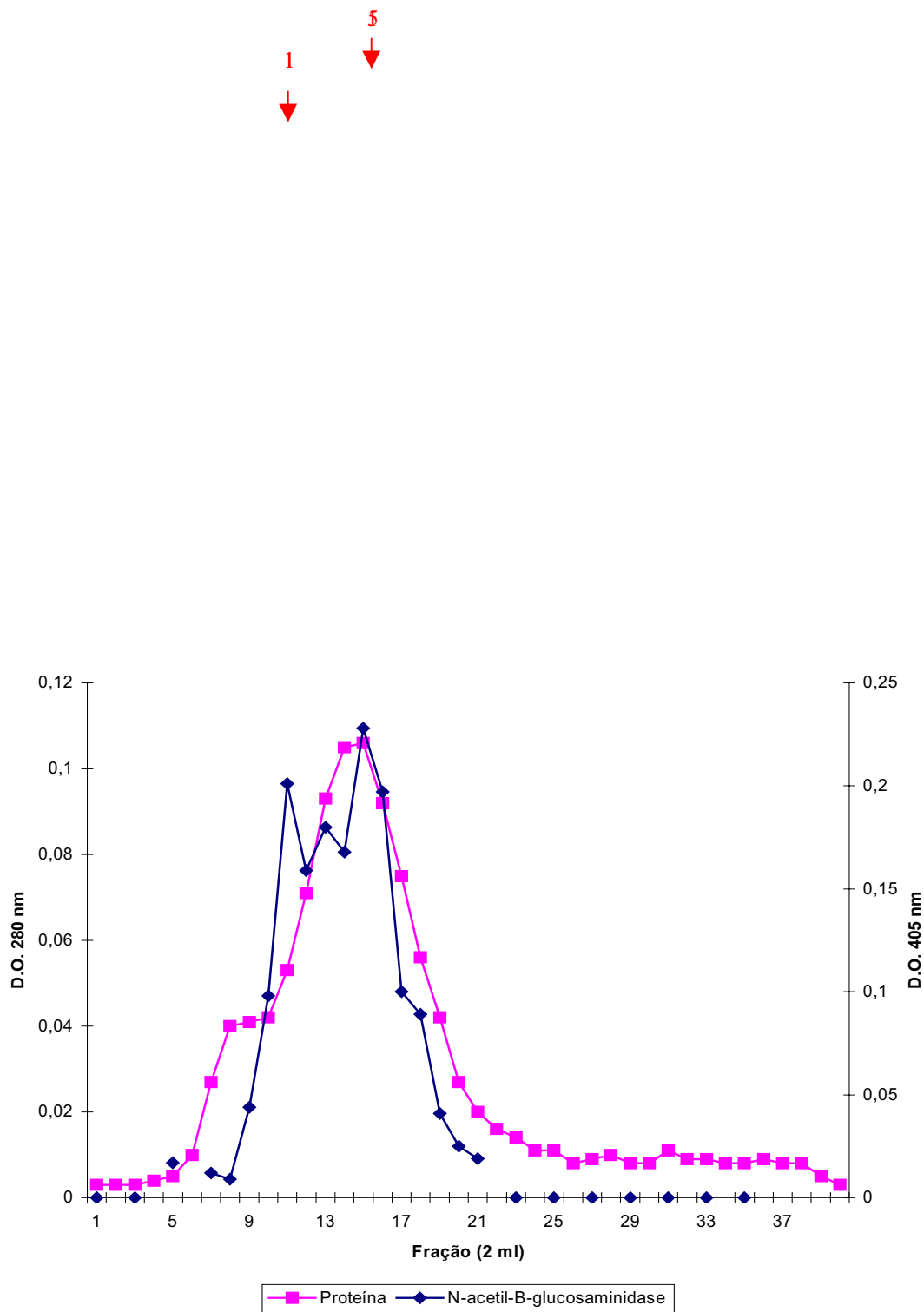
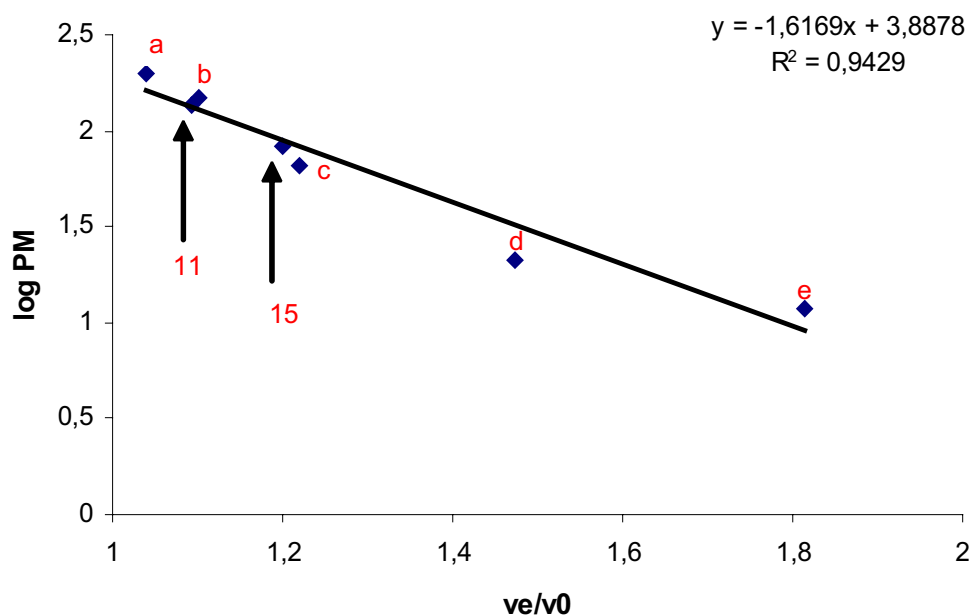


Figura 09- Perfil de eluição da N-acetil-β-glicosaminidase em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5.0. Foram coletadas frações de 2 mL/5 min. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil das atividades com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo determinadas por leitura a 405 nm.



**Figura 10: Correlação entre o logaritmo do peso molecular e o volume de eluição das proteínas.** Onde: a (β-amilase- 200kDa), b (álcool-desidrogenase- 150kDa), c (BSA- 66 kDa), d (SBTI- 21kDa), e (citocromo c- 12 kDa), 11 (fração 11- 137 kDa) e 15 (fração 15- 84 kDa).

As frações 11 (F11) e 15 (F15), correspondentes aos picos, foram separadas para realização de SDS-PAGE e posterior utilização nos ensaios cinéticos.

#### 4.5.RESUMO DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO PROTÉICA

As etapas utilizadas na purificação das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases estão sumarizadas na Tabela 2. Analisando-se esta tabela observou-se um índice de purificação final de 192,47 vezes e uma recuperação de 28,5% para F11. Com relação a F15 percebe-se uma purificação de 85,41 vezes e uma recuperação de 32,3%.

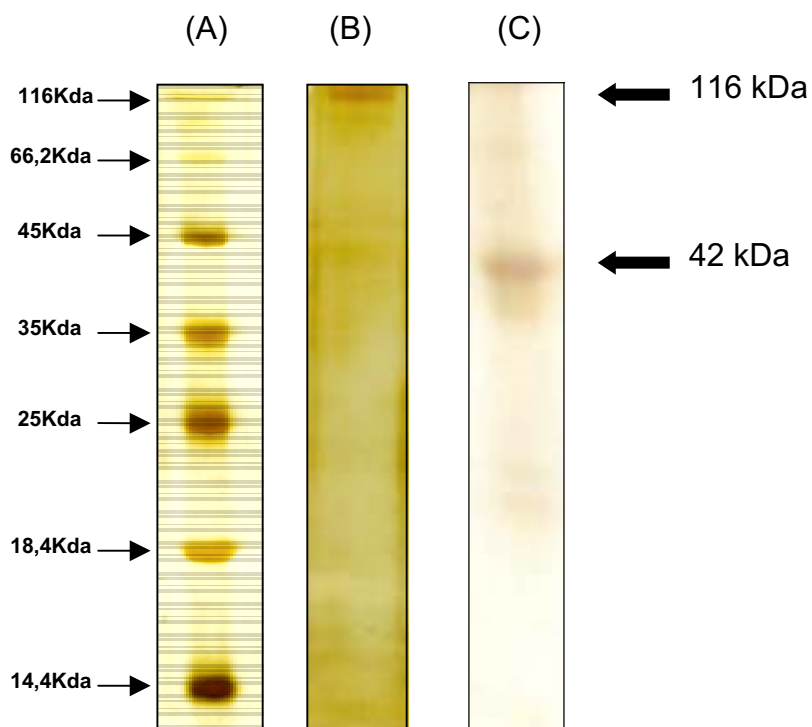
Fração	Volume Total (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica	Purificação (X)	Recuperação (%)
<b>Bruto</b>	355	9,6	3408,0	70,6	367,708	1,00	100,0
<b>F III</b>	45	29,78	1340,1	41,3	1386,84	3,77	58,5
<b>S-200</b>	480	0,117	56,16	23,1	2100,00	5,71	32,7
<b>G-75</b>	10	0,068	0,68	31,7	23308,8	63,39	44,9
<b>S-200 (F11)</b>	2	0,0142	0,0284	20,1	70774,6	192,47	28,5
<b>S-200 (F15)</b>	2	0,0363	0,0726	22,8	31405,0	85,41	32,3

**Tabela 02: Etapas de purificação das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases**

Onde: Atividade Total (U) = 1U corresponde a 0,01 unidade de absorbância a 405 nm; Purificação = Razão entre a atividade específica em cada passo de purificação e a atividade específica do extrato bruto; Recuperação = Percentual de atividade total em cada passo de purificação em relação a atividade total no extrato bruto (100%).

#### 4.6. PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE

Para avaliar o grau de pureza e determinar a massa molecular aproximada das N-Acetil- $\beta$ -glicosaminidases, alíquotas das frações 11 e 15 da Sephacryl S-200 foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e posteriormente corado com prata (Figura 11). A análise do gel mostrou alto grau de pureza da F11, onde uma banda protéica predominante é observada na região de 116 kDa. Observando a F15 percebe-se uma banda protéica predominante de aproximadamente 42 kDa.



**Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações protéicas.**

(A) Padrões de pesos moleculares; (B) Fração 11; (C) Fração 15.

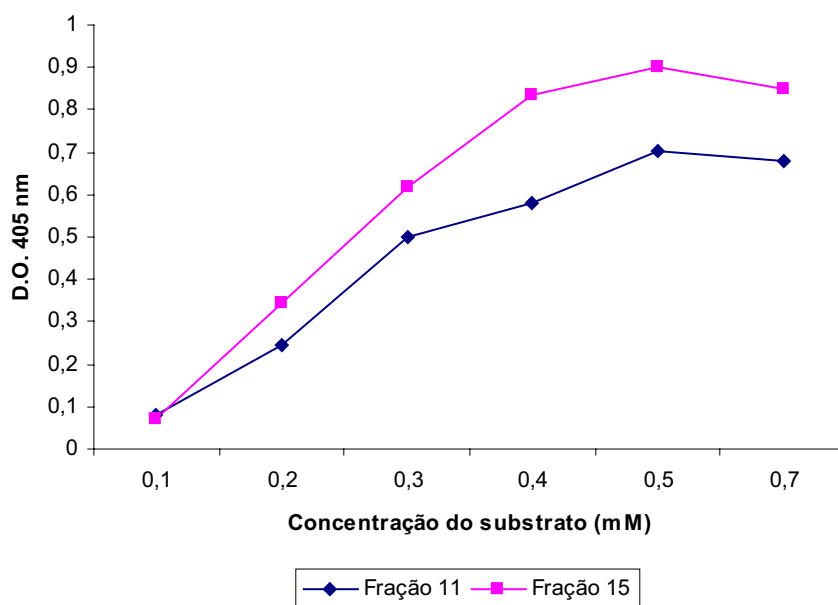
#### 4.7. ESTUDOS CINÉTICOS DAS N-ACETIL- $\beta$ -GLICOSAMINIDASES.

Para os estudos cinéticos utilizou-se F11 e F15 provenientes da Sephacryl S-200. A hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo foi avaliada com diferentes concentrações do substrato sintético, sob a influência de diferentes temperaturas, tempos de ensaio enzimático, de concentrações de hidrogênio (pH), concentrações de proteína e de prováveis inibidores e competidores.

##### **4.7.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e Velocidade máxima ( $V_{max}$ )**

Podemos observar a atividade enzimática sobre diferentes concentrações de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminídeo na Figura 12. Após a linearização dos resultados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk ( não mostrado) obtivemos uma  $K_m$  aparente de 0,257 mM e  $V_{max}$  de 0,704 unidades de absorbância a 405 nm / h para F11, que corresponde a 384,7 $\mu$ M de p-nitrofenol liberado por hora. F15 apresentou um  $K_m$  aparente de 0,235 mM e  $V_{max}$  de 0,9 unidades de absorbância a 405 nm / h, que corresponde a 491,8 $\mu$ M de p-nitrofenol liberado por

hora A partir da concentração de 0,5 mM de substrato, a atividade enzimática tende a estabilizar em ambas as frações.



**Figura 12: Determinação do Km e da Vmax das N-acetil-β-glicosaminidases**

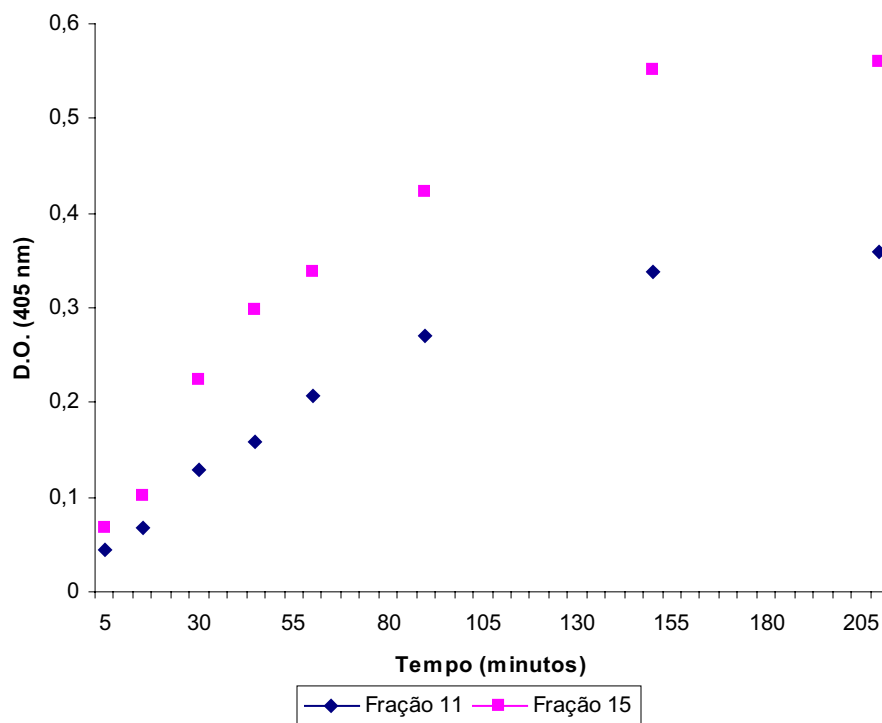
Cinco microlitros das frações 11 e 15 foram incubadas, junto a concentrações crescentes de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,7 mM) durante uma hora a 45°C. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas como descrito no item 2.7.2 .

#### **4.7.2. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

O efeito do tempo sobre a atividade enzimática revela que após três horas de ensaio ocorre pouca alteração na velocidade, tendendo a ficar constante



(Figura 13). Esse resultado sugere uma boa estabilidade da enzima, que se mantém ativa a 45°C por várias horas de ensaio.



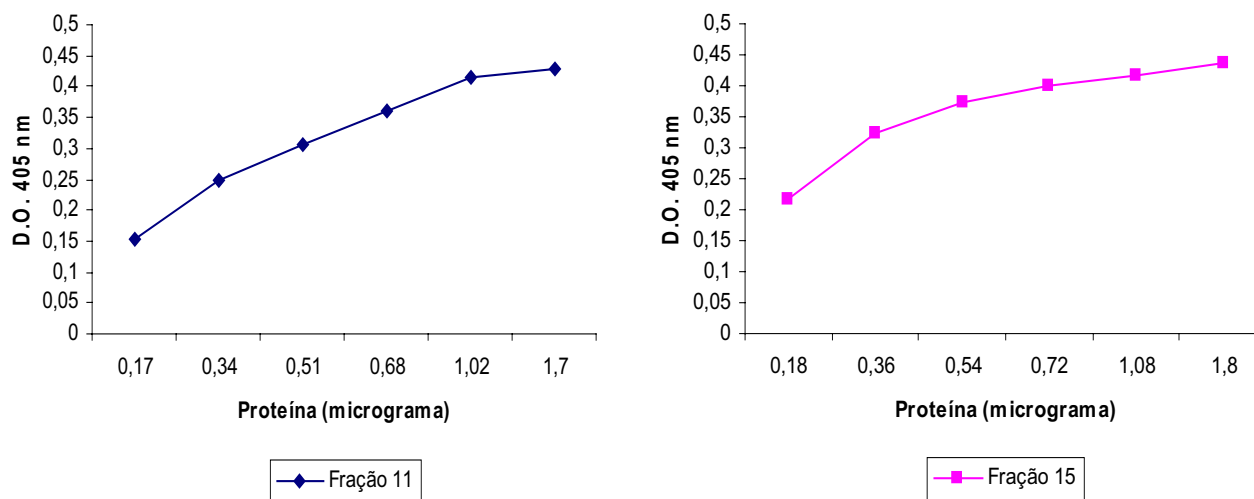
**Figura 13- Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Cerca de 5 μL das frações 11 e 15 foram incubadas com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo a 45°C, durante diferentes intervalos de tempo. Transcorrido cada período, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

#### **4.7.3. Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Observando a figura 14, notamos uma correlação entre as quantidades das enzimas e de p-nitrofenolato liberados, indicando certa proporcionalidade entre os

dois parâmetros. Percebe-se que com o aumento da concentração protéica, a velocidade da reação tende a platonizar.



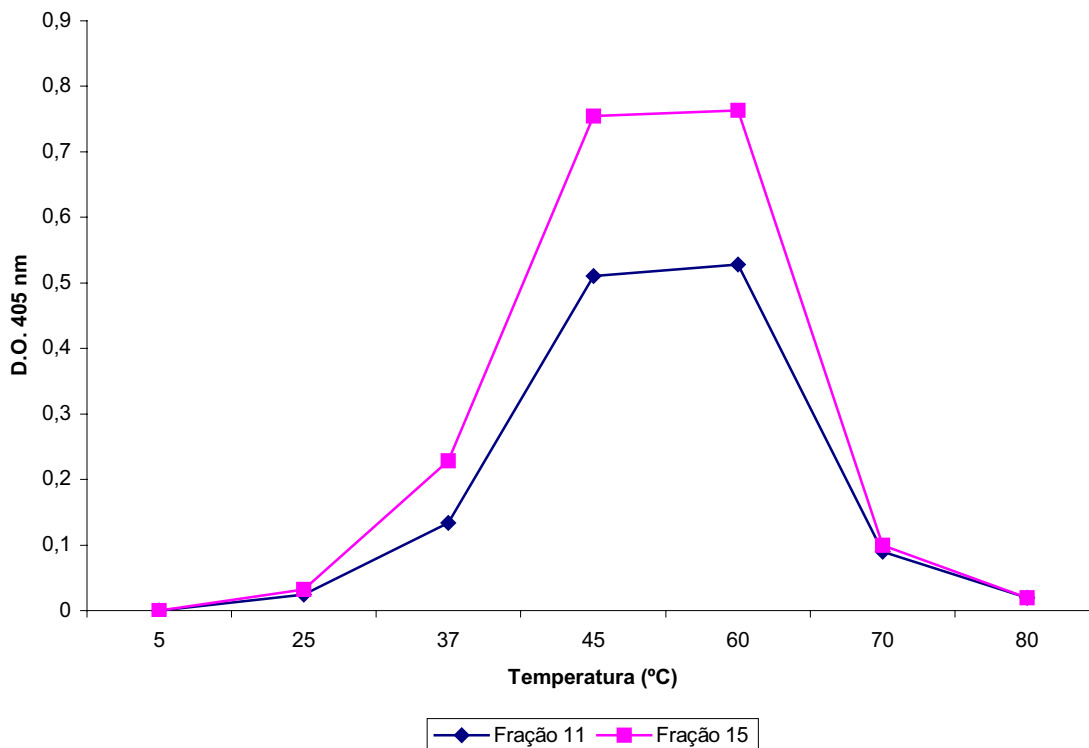
**Figura 14-Influência da concentração da enzima na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Diferentes concentrações das frações 11 e 15 foram incubadas com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo a 45°C, durante 1 hora. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

#### **4.7.4. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Os ensaios realizados em diferentes temperaturas mostram que as maiores atividades, para ambas as frações, ocorrem na faixa de 45 a 60°C. Em

temperaturas abaixo e acima destas, observa-se queda brusca da atividade enzimática (Figura 15).



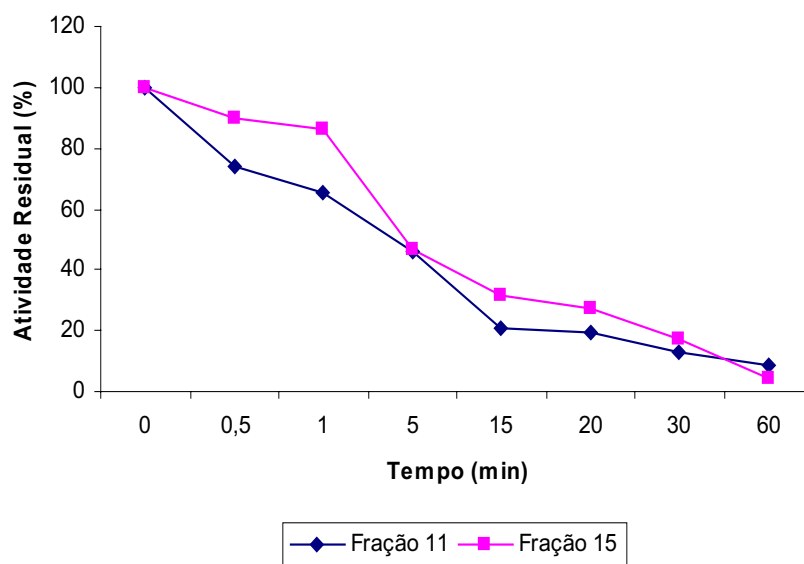
**Figura 15- Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Cerca de 5μL das frações 11 e 15 foram incubadas com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo durante 1 hora em diferentes temperaturas. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

#### **4.7.5. Efeito da pré-incubação a 60°C na atividade catalítica das N-acetil-β-glicosaminidases.**

A influência da temperatura sobre a atividade N-acetil-β-glicosaminidásica foi pesquisada pré-incubando-se as frações enzimáticas, por diferentes tempos, a 60°C, na ausência de substrato, e a atividade residual foi medida pela incubação

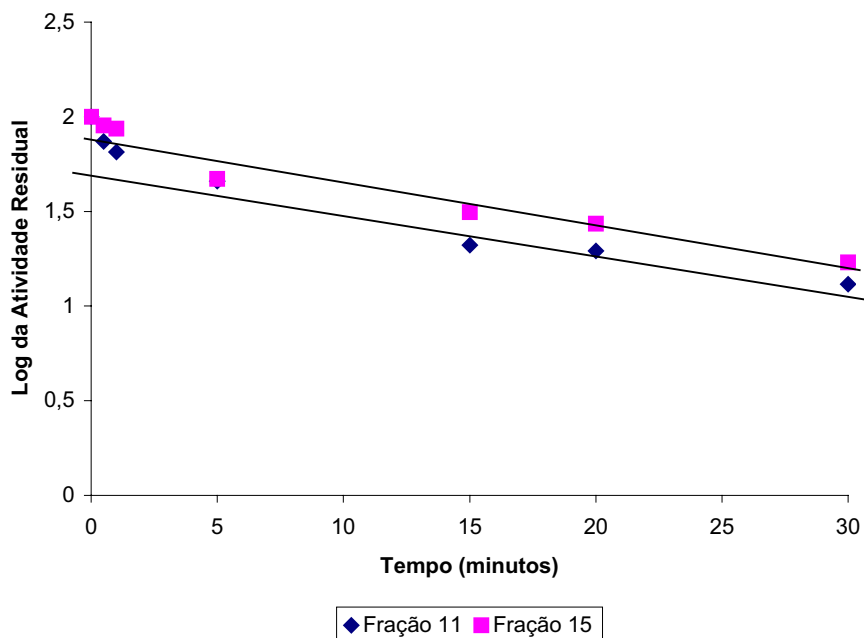
com p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo a 45°C durante uma hora. A figura 16 mostra que ocorre um decréscimo progressivo da atividade, até a total desnaturação térmica das enzimas.



**Figura 16- Efeito da pré-incubação a 60°C na atividade catalítica da(s)  $\beta$ - N-acetil glicosaminidase(s).**

Cerca de 5 $\mu$ L das frações 11 e 15 após pré-incubação a 60°C, em diferentes tempos, foram submetidas a incubações com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo durante 1 hora a 45°C. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

Após a logaritmização dos dados de desnaturação térmica das N-acetil- $\beta$ -glucosaminidases, observou-se uma boa aderência dos pontos à reta, sugerindo a presença de apenas uma enzima envolvida na degradação do substrato (Figura 17).

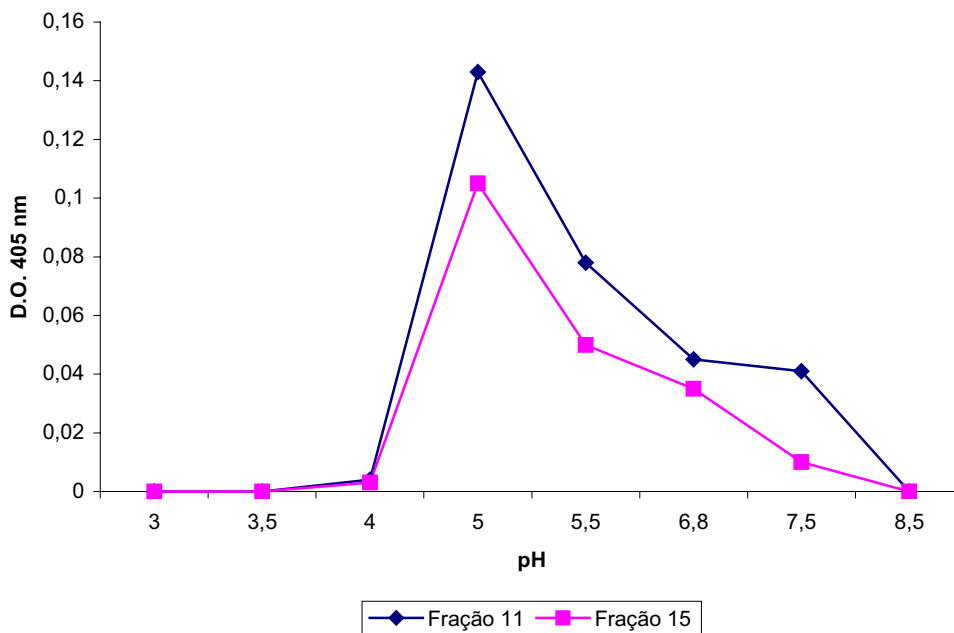


**Figura 17: Log da atividade residual da desnaturação térmica das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases, a 60 °C.**

Cerca de 5 $\mu$ L das frações 11 e 15 após pré-incubação a 60°C, em diferentes tempos, foram submetidas a incubações com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo durante 1 hora a 45°C. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

#### **4.7.6. Influência do potencial hidrogeniônico (pH) na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo.**

O efeito do pH sobre a catálise do p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo revela que tanto a fração 11 como a 15 apresentaram melhor atividade em pH 5,0. Em pH 3,0; 3,5; 4,0 e 8,5 a atividade enzimática em ambas é nula (Figura 18).

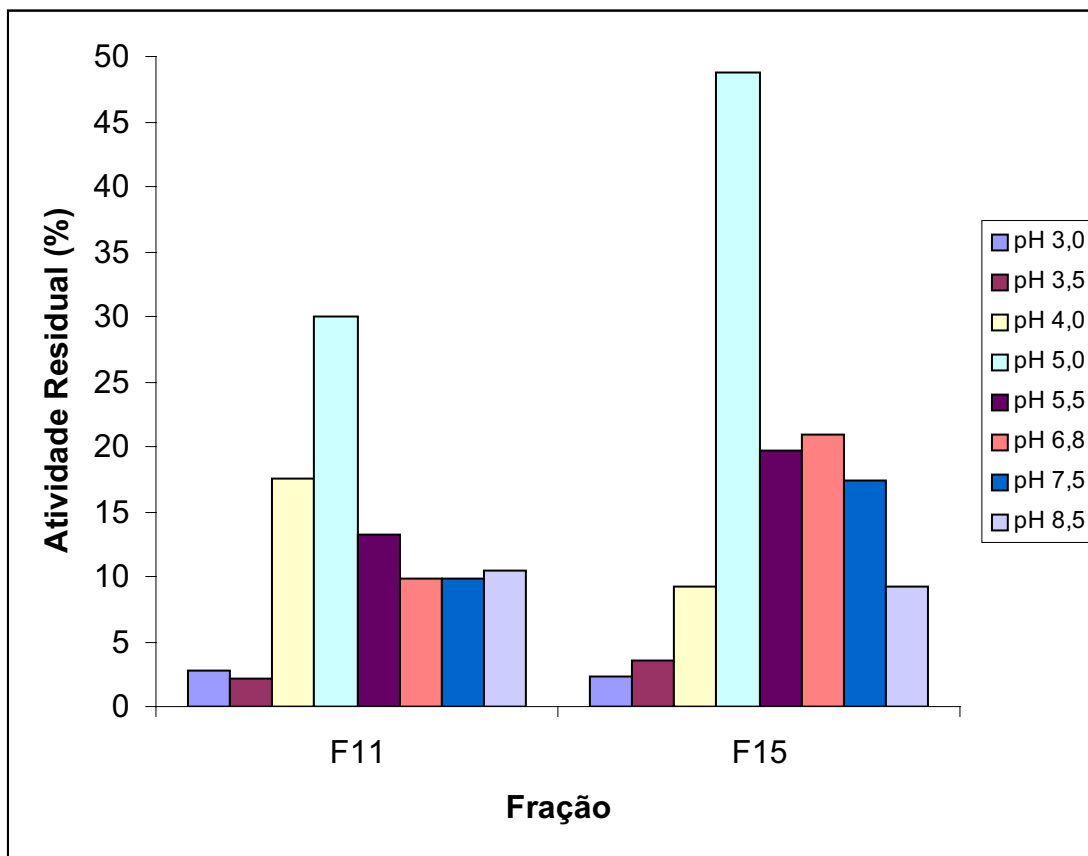


**Figura 18: Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Cerca de 5 μL das frações 11 e 15, submetidas a diferentes pHs, foram incubadas com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo durante 1 hora a 45°C. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

Foi também investigada a resistência da enzima frente a mudanças de pH. As frações dialisadas durante 18 horas contra os diferentes tampões já citados, foram submetidas à nova diálise de mesma duração agora contra o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 para o retorno das frações para o pH original de 5,0. Observou-se que após a reversão do pH houve uma perda significativa das atividades das frações, mesmo as frações que já estavam em pH 5,0 (Figura 19). Esta perda deve-se tanto à manipulação das frações para a diálise, quanto ao

próprio processo de diálise e a permanência da enzima em pHs não ideais a ela (5,0).



**Figura 19: Efeito da reversão do pH sobre a atividade das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases.**

Cerca de 5 $\mu$ L das frações 11 e 15, submetidas à reversão para pH 5,0, foram incubadas com 0,9 mM de p-nitrofenil-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo durante 1 hora a 45°C. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o p-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.6.2.

#### 4.7.7. Influência de diferentes sais sobre a atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica.

A Tabela 03 mostra como diferentes sais podem interferir na atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica. A F11 apresentou uma maior inibição por  $\text{AgNO}_3$  (93,8%), seguido por  $\text{MnCl}_2$  (65,9%) e  $\text{CuSO}_4$  (64,9%). A F15 sofreu maior inibição por  $\text{AgNO}_3$  (94%) e  $\text{CuSO}_4$  (31%).

Sais inorgânicos	Atividade Residual(%)	
	Fração 11	Fração 15
$\text{AgNO}_3$	6,2	6,0
$\text{CaCl}_2$	86,8	93,5
$\text{MgCl}_2$	60,5	87,5
$\text{MnCl}_2$	34,1	93,5
$\text{ZnSO}_4$	58,9	100,0
$\text{CuSO}_4$	34,9	69,0
Controle	100,0	100,0

**Tabela 03: Efeito de diferentes sais sobre a atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica**

Cerca de 5 $\mu$ l das frações 11 e 15 foram pré-incubadas durante 15 minutos a 45°C com diferentes sais a uma concentração final de 1 mM. Transcorrido este período, foi adicionado o substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo para uma concentração final de 0,9 mM. Novamente o material foi colocado a temperatura de 45°C durante 1 hora e as incubações foram interrompidas e o p-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm como descrito no item 3.6.2.



#### **4.7.8. Influência de diferentes carboidratos sobre a atividade N-acetil- $\beta$ -glucosaminidásica.**

A tabela 04 mostra que dos monossacarídeos testados, observou-se que o ácido glucurônico promoveu um aumento na degradação do p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, refletindo em um aumento de 176,51% na atividade de F11 e 52,34% em F15. A maior inibição foi provocada pela glicose, 61,74% para F11 e 41,28% para F15. Com relação aos dissacarídeos verificou-se uma maior inibição pela lactose tanto para F11 (54,36%) como para F15 (48,94%). Todos os polissacarídeos testados inibiram a degradação do p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, sendo que a maior inibição foi promovida pelo dermatam-sulfato, em um percentual de 55,03% para F11 e 29,79% para F15.

Carboidratos		Atividade Residual (%)	
		Fração 11	Fração 15
N-acetil-glucosamina	1,0 mM	46,7	92,3
Galactosamina	1,0 mM	77,18	101,7
Ácido glucurônico	1,0 mM	276,51	152,34
Galactose	1,0 mM	44,3	66,81
Frutose	1,0 mM	70,47	63,4
Glicose	1,0 mM	38,26	58,72
Maltose	1,0 mM	72,48	69,79
Lactose	1,0 mM	45,64	51,06
Heparina	4,5 µg	74,5	74,04
Condroitim-4-Sulfato	4,5 µg	75,17	78,3
Condroitim-6-Sulfato	4,5 µg	71,81	77,87
Heparam Sulfato	4,5 µg	85,23	76,6
Dermatam Sulfato	4,5 µg	44,97	70,21
Controle		100,0	100,0

**Tabela 04- Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade N-acetil-β-glicosaminidásica.**

Cerca de 5µl das frações 11 e 15 foram incubadas com mono e dissacarídeos em concentrações finais de 1 mM, juntamente com o p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo (0,9 mM). Os polissacarídeos foram utilizados na concentração de 4,5 µg. Os ensaios foram realizados a 45°C durante uma hora. Após este período, foram interrompidos e o p-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

#### **4.7.9. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo.**

Neste experimento testamos diferentes compostos que atuam em distintos grupamentos da enzima, para pesquisar a participação de determinados grupamentos da N-acetil-β-glicosaminidase envolvidos na degradação do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo. Todos os compostos testados interferiram fortemente na catálise enzimática (Tabela 05). N-etilmaleimida inibiu F11 em 61,5% enquanto que inibiu quase totalmente a F15 (98,8%), indicando a importância de grupos sulfidríla para esta última fração. O composto

iodoacetamida inibiu em 59,9% a atividade da F11 e 69,2% a F15. A inibição por PMSF foi de 68,1% para F11 e 81,9% para F15.

Composto		Atividade Residual (%)	
		Fração 11	Fração 15
Iodoacetamida	1 mM	40,1	30,8
PMSF	1 mM	31,9	18,1
N-Etilmaleimida	5 mM	38,5	1,2
Controle		100,0	100,0

**Tabela 05-Estudo de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo**

Cerca de 5 $\mu$ l das frações 11 e 15 foram pré-incubadas durante 15 minutos a 45°C na presença de diferentes compostos (iodoacetamida- IO-ACE; fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF e N-etilmaleimida- NEM). Transcorrido o tempo de pré-incubação adicionou-se p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo para uma concentração final de 0,9 mM. Novamente o material foi colocado a 45°C e após uma hora os ensaios foram interrompidos e o p-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

## 5. DISCUSSÃO

Glicosidases hidrolisam ligações glicosídicas de glicoconjugados, oligo- e polissacarídeos, possuindo desta forma grande amplitude de ação, sendo muito importantes para o metabolismo de muitos organismos. Devido ao seu papel central na degradação de carboidratos complexos, essas enzimas têm sido tema de muitos estudos clássicos na biologia (STAM *et al*, 2005).

Estudos iniciais com o Extrato Bruto e as frações FI, FII e FIII, provenientes do fracionamento com sulfato de amônio, mostraram a presença de exo- e endoglicosidases que atuam sobre glicosaminoglicanos sulfatados. Essas atividades foram detectadas pelo desaparecimento metacromático de glicosaminoglicanos em eletroforese em gel de agarose. Nestes experimentos observamos que os glicosaminoglicanos condroitim sulfato e heparam sulfato são mais extensamente degradados por estas enzimas do que o dermatam sulfato. A presença de tais enzimas já foi constatada em diversos trabalhos realizados com outros invertebrados marinhos tais como: *Artemia franciscana* (AQUINO, 2004), *Palythoa caribaeorum* (SOUZA, 2003), *Palythoa variabilis* (FERREIRA, 2003), *Strombus goliath* (ARAÚJO, 2002), *Chiton sp* (VIEIRA, 2002), *Aplysia cervina* (MATTA, 2001), *Tagelus gibbus* (MEDEIROS, 1998).

Utilizando-se substratos sintéticos p-nitrofenil derivados de açúcares, foi pesquisada a presença de exoglicosidases nas frações precipitadas com sulfato de amônio e no extrato bruto. Os resultados obtidos demonstram que houve uma maior precipitação das atividades de exoglicosidases em FIII. A atividade da N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase apresentou-se maior em FIII, seguida da  $\beta$ -glucuronidase.

A fração F III foi escolhida por apresentar a melhor atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica, e submetida ao fracionamento em cromatografias de exclusão molecular, visando à purificação da enzimática. Ao final dos passos de purificação (Sephacryl S-200) a F11 foi purificada 192 vezes com rendimento de 28,5% e para a F15 obtivemos uma purificação de 85 vezes com recuperação final de 32%.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes revelou que F11 possui uma banda protéica de aproximadamente 116 kDa e F15 uma banda de 42 kDa. Utilizando a relação do volume de eluição de F11 e F15 em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200) calibrada com proteínas de pesos moleculares conhecidos, determinamos que essas proteínas possuem cerca de 137 kDa e 84 kDa, respectivamente. Esse resultado mostra um indicativo que F11 possua massa molecular entre 116 e 137 kDa e que F15 seja um dímero. Em geral, a literatura traz exemplos de N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases com massas moleculares variando em uma ampla faixa que vai de 40 a 240 kDa (PETERS *et al.*, 1998; CIFALI e DIAS FILHO, 1999; AMUTHA, 1999).

As frações purificadas F11 e F15 também foram testadas com p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminídeo, tendo sido constatado que ambas as enzimas também possuem atividade N-acetil- $\beta$ -galactosaminidásica (resultados não apresentados). Isso se deve ao fato da alta especificidade da enzima em relação a N-acetil-glicosídeos e N-acetil-galactosídeos (CABEZAS, 1989). Esse fenômeno é bastante comum, o que levou a reclassificação destas enzimas. Hoje a nomenclatura de N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase (E.C. 3.2.1.52) engloba as N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases (E.C. 3.2.1.30) e N-acetil- $\beta$ -galactosaminidases (E.C. 3.2.1.53).

Os valores de  $K_m$  encontrados (0,257 mM para F11 e 0,235 mM para F15), demonstram que essas enzimas possuem grande afinidade por seus substratos. O  $K_m$  encontrado foi similar ao da N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase isolada do crustáceo *Artemia franciscana* (AQUINO, 2004) que apresentou um  $K_m$  de 0,23 mM. Este valor não diferiu significativamente de alguns valores encontrados em outros trabalhos, como no caso da N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase isolada da biomassa de *Palythoa caribaeorum* (SOUZA, 2003) onde foi observado um  $K_m$  de 0,45 mM e de *Trichinella spiralis* (BRUCE; GOUNARIS, 2006) que apresentou uma  $K_m$  de 0,187 mM. Entretanto, muitos estudos encontraram valores de  $K_m$  mais elevados como no caso da enzima extraída do repolho *Brassica oleracea* (CHANG *et al.*, 1998) onde se observou uma  $K_m$  de 0,94 mM e de ovos de *Halocynthia roretzi* (MATSUURA *et al.*, 1993) que apresentou  $K_m$  de 1,2 mM. A partir da concentração de 0,5 mM de substrato, a atividade catalítica de ambas enzimas tende a decair, isso se deve à inibição da atividade enzimática pelo substrato, fenômeno não muito raro de ocorrer.

Sobre o efeito da concentração da enzima na velocidade da reação observou-se uma correlação entre esses dois parâmetros. Concentrações maiores de proteína apresentaram também maiores velocidades da reação. Comportamento semelhante foi observado com N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase: de *Artemia franciscana* (AQUINO, 2004), *Palythoa caribaeorum* (SOUZA, 2003), *Palythoa variabilis* (FERREIRA, 2003) e *Chiton sp* (VIEIRA, 2002).

A temperatura ótima para atividade N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase, de ambas as frações, ocorrem na faixa de 45 a 60°C. A temperatura de 60°C está muito

próxima da desnaturação térmica das enzimas, visto que 5 minutos após a pré-incubação nesta temperatura, restou somente cerca de 50% da velocidade inicial da reação. No entanto, as enzimas permaneceram estáveis durante 3,5 horas a 45°C. A temperatura ótima de 60°C também foi observada para mesma atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica em um trabalho realizado com *Trichoderma harzianum* (DE MARCO, 2004) e *Artemia franciscana* (AQUINO, 2004). BRUCE e GOUNARIS, 2006 isolaram uma N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase de *Trichinella spiralis*, onde esta apresentou uma temperatura ótima semelhante, em torno de 54°C.

A pré-incubação da enzima a 60°C, na ausência do substrato, resultando em perda progressiva de sua capacidade catalítica, em função do tempo, a desnaturação térmica ocorre devido ao desenrolamento, e conseqüente desnaturação, da cadeia polipeptídica. Nossos resultados sugerem que o substrato proteja a N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase contra a desnaturação. Além disso, a progressiva desnaturação tendendo a zero indica a existência de somente uma enzima agindo sobre o substrato. ABREU, 1999 constatou em seus resultados, que a sulfatase purificada do bivalve *Tagelus gibbus*, quando pré-incubada a 60°C na presença do substrato se torna mais termoestável, e que nas frações enzimáticas menos purificadas, as glicosidases presentes eram mais resistentes à temperatura do que nas frações mais puras, indicando que tanto a formação do complexo enzima-substrato quanto a presença de outras proteínas na fração protegem as glicosidases contra a desnaturação térmica. A atividade N-acetil- $\beta$ -glicosaminidásica purificada de outros organismos, apresentou temperaturas ótimas iguais ou próximas a 60°C. Como é o caso da N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase

extraída de *Enterobacter sp* (45°C), de couves da família Brassicaceae (60°C), do fungo *Trichoderma reesei* (50°C), de *Aspergillus niger* (65°C) e do *Bacillus sp* (70°C) (MATSUO *et al.*, 1999; NOGAWA *et al.*, 1998; PÊRA *et al.*, 1997; AMUTHA *et al.*, 1998).

O pH ótimo encontrado para catálise do p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminídeo foi de 5,0 para F11 e F15, este resultado aponta para a possibilidade de tratar-se de enzimas lisossomais. Também foi registrado valor de pH ótimo semelhante para N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases extraídas de gônadas do molusco *Chiton sp* (VIEIRA 2002), de extratos enzimáticos do molusco *Strombus goliath* (ARAÚJO, 2002) e para a N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase A extraída de fígado humano (HINY OKIKA; ZASSHI, 1992). Uma N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase isolada do termo-tolerante *Bacillus sp* e outra do fungo *Trichoderma harzianum*, apresentaram um pH ótimo em torno de 6,0 (AMUTA *et al.*, 1998; ULHOA *et al.*, 2000). A brusca queda da atividade enzimática nos pH diferentes de cinco indicam grande sensibilidade da enzima às concentrações de hidrogênio do sistema. Variações de pH alteram o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos alterando desta forma a distribuição de cargas, interferindo sobremaneira na estrutura da proteína e na atividade enzimática. As N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases foram completamente inibidas em pH 3,0; 3,5; 4,0 e 8,5, entretanto a enzima purificada do sapo *Bufo arenarum* (MARTINEZ *et al.*, 2000) apresentou um pH ótimo de 3,5.

A prata inibiu a hidrólise do substrato sintético em ambas frações em torno de 94%. Esse resultado provavelmente deve-se ao alto poder redutor da prata. SANON *et al.*, 2005 isolaram uma N-acetil- $\beta$ -hexosaminidase de *Trichomonas*



*vaginalis* que apresentou uma inibição de sua atividade em 54%, na presença do nitrato de prata. O cloreto de manganês e o sulfato de zinco interferiram mais fortemente na atividade da fração 11, onde inibiram a catálise enzimática em 65,9% e 65,1%, respectivamente.

A ação de diversos carboidratos sobre a atividade das N-acetil- $\beta$ -glicosaminidases foi estudada. Observou-se que o ácido glucurônico promoveu um aumento significativo na degradação do p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, enquanto que a glicose provocou uma maior redução nesta degradação. Todos os polissacarídeos sulfatados testados inibiram a degradação do p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo, sendo que a maior inibição foi promovida pelo dermatam sulfato.

A inibição por iodoacetamina e N-etilmaleimida, principalmente em F15 (98,8%), indica a participação de radicais sulfidríla importantes para a atividade enzimática. Estes dados sugerem que a inibição por estes agentes reflete a dependência de resíduos de cisteína disponíveis no sítio catalítico da enzima para a hidrólise do substrato sintético, mas pode ter também relação com a necessidade de pontes dissulfeto estabilizando o dímero. A inibição por PMSF indica a possibilidade do resíduo de serina ser também importante para a atividade N-acetil- $\beta$ -hexosaminidásica.

## 6. CONCLUSÕES

- Gônadas de *Echinometra lucunter* possuem glicosidases que estão provavelmente envolvidas no metabolismo de glicoproteínas, glicolípídeos e glicosaminoglicanos;
- Refletindo a remoção de proteínas do sistema e a atividade enzimática detectada em todas as etapas utilizadas para a purificação das enzimas, a fração F11 foi purificada duas vezes mais do que F15 (192 vezes e 85 vezes, respectivamente) com percentuais de rendimento muito próximos;
- F15 provavelmente é um homodímero por ter apresentado massa molecular de 42 KDa em SDS-PAGE e de 84 KDa em gel filtração. F11 provavelmente é formada por uma única cadeia polipeptídica por apresentar somente uma banda protéica de 116 KDa em eletroforese desnaturante e 137 KDa em gel filtração;
- As frações purificadas, F11 e F15, apresentam alta especificidade por N-acetil-glicosídeos e N-acetil-galactosídeos. Estes resultados estão de acordo com a literatura e por isso hoje estas enzimas são classificadas como N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases (E.C. 3.2.1.52);
- F15 apresentou maior eficiência catalítica de acordo com seus valores de Km e Vmax (0,235 e 0,9), quando comparada com F11(0,257 e 0,7). Ambas frações possuem alta finidade pelo substrato quando comparadas com dados da literatura;
- Ambas enzimas apresentam boa estabilidade térmica a 45°C e baixa resistência à pré-incubação a 60°C. Isso por que permaneceram estáveis

durante 3,5 horas a 45°C, e, no entanto a pré-incubação por cinco minutos a 60°C reduz a atividade enzimática em cerca de 50% da velocidade inicial da reação;

- O pH ótimo de 5,0 *in vitro* pode ser considerado como indicativo de se tratar de enzimas lisossomais, e a variação nas concentrações de hidrogênio do sistema alteram o estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos interferindo na distribuição de cargas da proteína, levando a modificações em suas estruturas e na atividade enzimática;
- A importância de radicais sulfidrílica para a catalise enzimática do substrato sintético foi demonstrado pela alta sensibilidade a N-etilmaleimida, principalmente F15. Além disso, verificamos a necessidade da participação de resíduos de serina na catálise do mesmo substrato devido à inibição por PMSF;
- Lembrando que estas enzimas fazem parte de um grupo de enzimas existentes no tecido em estudo, o papel metabólico delas pode ser inferido devido à inibição por todos os carboidratos testados no teste de especificidade enzimática, com exceção para o ácido glucurônico que foi um potente ativador.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.R.D. **Purificação e caracterização de uma sulfatase do molusco *Tagellus gibbus*, envolvida no metabolismo de glicosaminoglicanos.** Tese de Doutorado apresentada a EPM como parte do convênio UFRN-UNIFESP/EPM, 1999.

AMUTHA, B.; KHIRE, J.M.; KHAN, M.I. Characterization of a novel exo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from the thermotolerant *Bacillus* sp. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, n.1425, p.300-310, 1998.

AMUTHA, B.; KHIRE, J.M.; KHAN, M.I. Active site characterization of the exo-N-acetyl- $\beta$ -D -glucosaminidase from thermotolerant *Bacillus* sp. NCIM 5120: involvement of tryptophan, histidine and carboxylate residues in catalytic activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA-General Subjects)**,v.1427,p.121-132, 1999.

AQUINO, R.A.P. 2004. **Purificação e caracterização parcial de uma  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase de *Artemia franciscana*.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

ARAÚJO, C.M.D.B. 2002. **Purificação e caracterização parcial de uma  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase extraída do molusco *Strombus goliath*.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

ARONSON, N. N.; BLANCHARD, C.J; MADURA, J.D. **J.Chem.Inf. Comput**, v. 37, p.999-1005, 1997.

ATSUMI, K. *et al.* Chondrosulphatase of squid liver. **Biochem. J.**, v. 128, p. 983-985, 1972.

AWAD O.M.; ATTIA W.E.; EL ASHRY E.S.H. Comparative evaluation of d-glucosyl thiouronium, glucosylthio heterocycles, Daonil, and insulin as inhibitors for hepatic glycosidases. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 3, p. 469-476(8), 25 Feb/,2004.

BRUCE, A.F.; GOUNARIS K. Characterisation of a secreted N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase from *Trichinella spiralis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.145, p.84-93, 2006.

CABEZAS, J.A. Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for b-N-acetylglucosaminidase, b-N-acetylhexosaminidase and b-N-acetylgalactosaminidase. **Biochem. J**, v. 261, p.1059-1060, 1989.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. The distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates, **J. Biol. Chem.**, v.252, p.2254, 1977.

CHANG, C.T. *et al.* Purification and properties of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from cabbage. **Biochem. Mol. Biol**, v.45, p.371–380, 1998.

CHAPMAN, S.J. & PERKINS, H.R. Peptidoglycan-degrading enzymes in ether-treated cells of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Gen. Microbiol**, v.129, p.877-883, 1983.

CIFALI, A.P.; DIAS FILHO, B.P. Purification and partial characterization of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol Res**, v.85, p. 256-262, 1999.

CRIPPS, J.G. *et al.* Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan–cytokine interactions. **International Immunopharmacology**, v. 5, p.1622-1632, 2005.

COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. (1999) **Carbohydrate-Active Enzymes** server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>.

DE MARCO, J. L., VALADARES-INGLIS, M. C., FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.64, p.70–75, 2004.

DIETRICH, C.P, DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v.70, p.645-647, 1976.

DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; STRAUS, A.H. Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. **Biochem Biophys. Res. Commun**, v.111, p.865, 1983.

DIETRICH, C.P. *et al.* Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.843, p.1-7, 1983.

DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.17, p.5-15, 1984.

DIETRICH, C.P. The mode of action of sulfatases in the metabolism of glycosaminoglycans. **TIGG**, v. 3, p.352-354, 1991.

DIETRICH, C.P. *et al.* Sequencing of heparan sulfate: Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight in heparan sulfates from different origins. **Cell. Mole. Biol.**, v.44, p.417-429, 1998.

DIETRICH, C.P. *et al.* Structural features and anticiotting activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1999.

FERREIRA, P.A. 2003. **Purificação parcial e caracterização de uma  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase de *Palythoa variabilis***. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

FREEMAN, C.; HOPWOOD, J.J. Human-liver N-acetylglucosamine-6-sulfatase: catalytic properties. **Biochem. J.**, v.246, p.355-365, 1989.

GAMA, C.I.; HSIEH-WILSON, L.C. Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p.609-619, 2005.

GLASER, J.H.; CONRAD, H.E. Chick embryo liver  $\beta$ -glucuronidase: comparison of activity on natural and artificial substrates. **J. Biol. Chem.**, v.254, p. 6588-6594, 1979.

GRIFFITH, D.A.; DANISHEFSKY, S.J. The total synthesis of allosamidin. Expansions of the methodology of azaglycosylation pursuant to the total synthesis of allosamidin. A surprising enantiotopic sense for a lipase-induced deacetylation. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, p.9526-9538, 1996.

GUBISH, E.R. JR.; CHEN K.C.; BUCHANAN, T.M. Detection of a gonococcal endo-beta-N-acetyl-D-glucosaminidase and its peptidoglycan cleavage site. **J. Bacteriol.**, v.51, p.172-176, 1982.

HENDLER, G. *et al.* Echinoderms of Florida and the Caribbean. Sea Stars, Sea Urchins, and Allies. Washington: Smithsonian Inst. Press. 390p.1995.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem.J.**, v.280, p.309-316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J.**, v.293, p.781-788, 1993.

HERS, H.G.; VAN HOOFF, F. Lysosomes and storage diseases. New York, **Academic Press**, 1973.

HIROHASHI *et al.* Structural requirements for species-specific induction of the sperm acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.298, p.403-407, 2002.

HOPWOOD, J. Enzymes that degrade heparin and heparan sulphate. In: HANE, D. A. ; LINDAHL, U. (Eds) Heparin- chemical and biological properties, clinical application. London, **Edward Arnold**, p. 19, 1989.

HORTON, D.S.P.Q.; MICHELACCI, Y.M. Mucopolysaccharidases from *Pseudomonas sp.* Isolation and partial characterization of constitutive enzymes involved in the degradation of keratan sulfate and chondroitin sulfate. **Eur. J. Biochem.**, v. 161, p.139-147, 1986.

HORSCH, M. *et al.*  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase: A target for the Design of Antifungal Agents. **Pharmacol. Ther.**, v. 76, p.187-218, 1997.

KARAMANOS, Y. Endo-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and their potential substrates: structure/function relationships. **Res. Microbiol.**, v.148, p.661-671, 1997.

KATO, T. *et al.* Stylotuanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylorella Aurantium*. **Tetrahedron Letters**, v.36, p.2133-2136, 1995.

KAMST, E. *et al.* Chemical synthesis of N-acetylglucosamine derivatives and their use as glycosyl acceptors by the *Mesorhizobium loti* chitin oligosaccharide synthase NodC. **Carbohydrate Research**, v.321, p.176-189, 1999.

KAWAGISHI, S.; ARAKI, Y.; ITO, E. Bacillus cereus autolytic endoglucosaminidase active on cell wall peptidoglycan with N-unsubstituted glucosamine residues. **J. Bacteriol.**, v.141, p.137-143, 1980.

KRAMER, K.J.; KOGA, D. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochem**, v.16, p.851-877, 1986.

KRESSE, H.; GLÖSSL, J. Glycosaminoglycans degradation. **Adv. Enzymol.**, v.60, p.217-311, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. **Nature**, v.227, p.680-692, 1970.

LIN, W. *et al.* Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. **Bio Technol**, v.13, p.686-691, 1995.

LINDAHL, U. *et al.* More to "heparin" than anticoagulation. **Thrombosis Research**, v.75, p. 1-32, 1994.

LINEWEAVER; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, v.56, p.658-666, 1934.



LLOYD, A.G. *et al.* Bacterial carbohydrate sulphamidase induction and heparin degradation. **Biochemistry. J.**,v. 110, p. 54-58,1968.

LODEIROS, C.; GARCIA, N. The use of sea urchins to control fouling during suspended culture of bivalves. **Aquaculture**, v.6, p.293-298, 2004.

MARTINEZ, M.L.; MARTELOTTO, L.; CABADA, M.O. Purification and biological characterization of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from *Bufo arenarum spermatozoa*. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p.194-203, 2000.

MATSUURA, K.; SAWADA, H.; YOKOSAWA, H. Purification and properties of N-acetylglucosaminidase from eggs of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Eur J Biochem.**, v.218, n.2, p.535-41, 1993.

MATTA, L.D.M. 2001. **Identificação de glicosidases e sulfatases em extratos do molusco *Aplysia cervina***. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

MATSUO, Y. *et al.* Purification, characterization and gene analysis of N-acetylglucosaminidase from *Enterobacter* sp. G-1. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.63, p.1261-1268, 1999.

MAYER-SONNENFELD, T. *et al.* The metabolism of glycosaminoglycans is impaired in prion diseases. **Neurobiology of Disease**, v.20, p.738 – 743, 2005.

McCARTNEY, M. A.; KELLER, G. P.; LESSIOS, H. A. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. **Molecular Ecology**, v. 9(9), p.1391-1400, 2000.

MEDEIROS, G.F. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1475, p.287-294, 1999.

MEDEIROS *et al.* Distribution of sulfated Glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1475, p-287-294, 2000.

MATALON, R.; *et al.* Morquio's Syndrome: deficiency of a chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 61, p.759-765, 1974.

MICHELACCI, Y.M.; DIETRICH, C.P. Isolation and partial characterization of an induced chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 56, p.973-980, 1974.

MICHELACCI, Y.M.; DIETRICH, C.P. A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. Isolation of a chondroitinase AC susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulfate B. **Biochem. J.**, v.151, p. 121-129, 1975.

MICHELACCI, Y.M.; DIETRICH, C.P. A chondroitinase C from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 1154-1158, 1976.

MICHELACCI, Y.M.; HORTON, D.S.P.Q. ; POBLACION, C.A. Isolation and characterization of an induced chondroitinase ABC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 923, p.292-301, 1987.

MUZZARELLI, R. A. Analytical biochemistry and clinical significance of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and related enzymes. **EXS.**, v.87. p.235-47, 1999.

NADANAKA, S. *et al.* Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with aneurite out growth promoting activity. **J. Biol. Chem.** v.273, p.3296-3307, 1998.

NADER, H.B. Characterization of a heparan sulfate and peculiar chondroitin 4-sulfate from platelets. **J. Biol. Chem.**, v.226, p.10518-10523, 1991.

NADER, H.B. *et al.* The mode of action of sulfated glycosaminoglycans degrading enzymes in bacteria, invertebrates and vertebrates. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 62-65, 1993.

NADER, H.B. *et al.* Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.529-538, 1999.

NASCIMENTO *et al.* Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v.3, p.449-458, 2000.

NASCIUTTI, L.E. *et al.* Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. **Micron**, v.37, p.544-550, 2006.

NEUFELD, E. The biochemical basis for mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. IN: STEINBERG, A.G. & BEARN, A.C. (Eds) **Progress in medical genetics**. Greene and Stranton, 1974.

NEUFELD, E.; MUENZER, J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. **McGraw-Hill**, New York, p.2465-2449, 1995.

NIIMI, K.; SHEPHERD, M.G.; CANNON, R.D. **Distinguishing *Candida* Species by  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase activity**. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.2089-2097, 2001.

NOGAWA, M. *et al.* Purification and characterization of exo- $\beta$ -D-glucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.890-895, 1998.

OLIVEIRA, F.W.; *et al.* Isolation and characterization of a galactanase, galactosidases, heparan sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes synthesized during embryonic development of the mollusc *Pomacea* sp. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1200, p.240-246, 1992.

PAVÃO, M.S.G. *et al.* A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian: Its structure and the effect of its unusual sulfation patterns on anticoagulant activity. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.31027-31036, 1995.

PAVÃO, M.S. Unique sulfated polysaccharides from ascidians (Chordata, Tunicata). **Braz.J.Med Biol Res**, v.29, p.1227-1233, 1996.

PERA, L.M.; MAJOLLI, M.V.I.; BAIGORI, M.D. Purification and characterization of a thermostable and highly specific beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Aspergillus niger* 419. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.26, p.183-187, 1997.

PETERS, G.; Saborowski, R.; Mentlein, R. & Buchholz. Isoforms of an N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from the Antarctic Krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.120B, p.743-751, 1998.

REYNOLDS, S.E.; SAMUELS R.I. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. **Adv. Insect Physiol**, v.26, p.157-232, 1996.

RIGDEN, D.J. Interactive database searches demonstrate that glycoside hydrolase families 27, 31, 36 and 66 share a common evolutionary origin with family 13. **FEBS Letters**, v.523, p.17-22, 2002.

RIVAS, B. *et al.* Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolases. **J. Bacteriol**, v.184, p.4988-5000, 2002.

SAKAI, M., *et al.* The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, v.1, p.413-417, 1992.

SANON, A. *et al.* N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase from *Trichomonas vaginalis*: substrate specificity and activity of inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p.245-248, 2005

SANTOS *et al.* Mast cell are present in epithelial layers of different tissues of mollusc *Anomalocardia brasiliensis*. In situ Characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. **Histochemical Journal**, v.34, p.553-558, 2002.

SEDMAK, J.J.;GROSSBERG S.E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 . **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, 1977.

SEWELL, M.A.; YOUNG, C.M. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.236, p.291-305, 1999.

SHIOMI, K. *et al.* Structure of argifin, a new chitinase inhibitor produced by *Gliocladium* sp. **Tetrahedron Letters**, v.41, p.2141-2143, 2000.

SILVA, M.E. & DIETRICH, C.P. (1975) The structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. J. Biol. Chem. 250: 6841-6846

SOUZA, D.S.L. 2003. **Purificação e caracterização de uma  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase identificada em extratos protéicos de *Palythoa caribaeorum***. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

SOUZA F°; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Sequential degradation of chondroitin sulfate in molluscs. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p.20150-20155, 1990.

SPENCER, J.W.; DAVIES, G.J. Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature. **Trends in Biotechnology**, v.19, p.356-362, 2001.

STAM, M.R. *et al.* Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on  $\alpha$ - and  $\beta$ -bonds. **Carbohydrate Research**, v.340, p.2728-2734, 2005.

SUZUKI, T. *et al.* Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v.99, p.9691-9696, 2002.

SUZUKI, S. *et al.* Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p.1543-1550, 1968.

ULHOA, C.J. *et al.* Effect of tunicamycin on N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1528, p.39-42, 2000.

VIEIRA, V.K.B. 2002. **Detecção e caracterização parcial da  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase em extratos de gônadas do molusco *Chiton sp.*** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. (Dissertação de Mestrado).

VIERHEILIG, H. *et al.* Colonization of transgenic *N. Sylvestris* plants, expressing different forms of *N. Tabacum* chitinase, by the root pathogen, *Rhizoctonia solani*, and by the mycorrhizal symbiont, *Glomus mosseau*. **Mol. Plant Microbe Interact**, v.6, p.261-264, 1993.

VIKTOVIC, L. *Bacillus subtilis* Lyt+ and Lyt- strains secrete peptidoglycan hydrolases. **Can. J. Microbiol**, v.33, p.563-565, 1987.

VOLPI, N. Occurrence and structural characterization of heparin from mollusks. **ISJ**, v.2, p.6-16, 2005.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Glycosaminoglycan Composition of the Large Freshwater Mollusc Bivalve *Anodonta anodonta*. **Biomacromolecules**, v.6, p.3174-3180, 2006.

WITHERS, S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p.325-337, 2002.

YAMAGATA, T. *et al.* Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **J. Biol. Chem.**, v.243, p.1523-1535, 1968.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)