



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

JOSÉ EDILSON GOMES JÚNIOR

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -N-
ACETILHEXOSAMINIDASE EXTRAÍDA DO MAMÍFERO
MARINHO *Sotalia fluviatilis***

**NATAL/RN,
2006**

JOSÉ EDILSON GOMES JÚNIOR

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -N-
ACETILHEXOSAMINIDASE EXTRAÍDA DO MAMÍFERO
MARINHO *Sotalia fluviatilis***

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: Prof. Dr. Luiz Roberto Diz
de Abreu

NATAL/RN,

2006

JOSÉ EDILSON GOMES JÚNIOR

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -N-
ACETILHEXOSAMINIDASE EXTRAÍDA DO MAMÍFERO

MARINHO *Sotalia fluviatilis*

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.

Aprovado em: 06/12/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Roberto Diz de Abreu
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador

Prof^a. Dr^a. Kátia Castanho Scortecci
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN
1^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Luciana Duarte Martins da Matta
Departamento de Bioquímica – UFRN
2^a Examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter propiciado esse momento.

Aos meus pais Edilson e Christina, além das minhas irmãs Germana e Daniela e o meu irmão Cosme, por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À minha esposa Alessandra Gomes, por sempre estar comigo.

Ao meu professor e grande amigo Luiz Roberto por ter tanto me ajudado.

Aos meus amigos Robério Nascimento e Ádila Lorena pela cumplicidade.

A Djair Souza pelo grande auxílio que me presta, tanto como amigo e como conhecedor da área de bioquímica.

A Jorge Taquita e ao Prof. Carlos Bloch Júnior pela contribuição valiosa neste trabalho.

Ao grupo PPC-RN, em especial ao aluno Cleysyvan Macedo e a Prof. Dra. Maria Emília Yamamoto por terem gentilmente cedido o material desse estudo.

*"Somos o que fazemos, mas somos, principalmente,
o que fazemos para mudar o que somos"*
Eduardo Galeano

RESUMO

Este trabalho mostra a purificação de 2232 vezes de uma β -N-Acetilhexosaminidase obtida a partir dos extratos hepáticos do mamífero marinho *Sotalia fluviatilis* com recuperação final de 8,4%. Passos seqüenciais foram utilizados para a purificação enzimática: fracionamento com sulfato de amônio e as cromatografias de Biogel A 1.5 m, Quitina, DEAE-Sepharose e Hidroxiapatita. A massa molecular protéica foi estimada em 10 kDa usando SDS-PAGE e confirmada por MALDI-TOF. Foi encontrado como pH e temperatura ótimos, 5,0 e 60°C, respectivamente. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes foram 2,72 mM e 0,572 nmol/mg/min, sendo utilizado o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo como substrato. A enzima foi inibida pelo cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) e dodecil sulfato de sódio (SDS).

Palavras-chave: β -N-Acetilhexosaminidase, β -N-Acetilglucosaminidase, β -N-Acetilgalactosaminidase, *Sotalia fluviatilis*, glicosaminoglicanos, extratos hepáticos, mamíferos marinhos.

ABSTRACT

This report shows 2232 times purification of a β -N-Acetylhexosaminidase from hepatic extracts from the sea mammal *Sotalia fluviatilis* homogenate with final recovery of 8,4%. Sequenced steps were utilized for enzyme purification: ammonium sulfate fractionation, Biogel A 1.5 m, chitin, DEAE-Sephrose and hydroxyapatite chromatographies. The protein molecular mass was estimated in 10 kDa using SDS-PAGE and confirmed by MALDI-TOF. It was found to have an optimal pH of 5.0 and a temperature of 60°C. Using p-nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-glycosaminide apparent K_m and V_{max} values were of 2.72 mM and 0.572 nmol/mg/min, respectively. The enzyme was inhibited by mercury chloride ($HgCl_2$) and sodium dodecil sulfate (SDS).

Keywords: β -N-Acetylhexosaminidase, β -N-Acetylgalactosaminidase, β -N-Acetylglycosaminidase, *Sotalia fluviatilis*, glycosaminoglycans, hepatics extracts, sea mammal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de glicosaminoglicanos (GAGS).....	2
Figura 2	Hexosaminas constituintes dos glicosaminoglicanos.....	2
Figura 3	<i>Sotalia fluviatilis</i> (boto-cinza ou tucuxi).....	10
Figura 4	Esquema do fracionamento com sulfato de amônio.....	14
Figura 5	Atividades específicas das frações enzimáticas extraídas de <i>Sotalia fluviatilis</i> obtidas pela precipitação com sulfato de amônio.....	25
Figura 6	Perfil de eluição em cromatografia de exclusão molecular em Biogel 1.5 A m das proteínas e atividades enzimáticas no extrato FI de <i>Sotalia fluviatilis</i>	26
Figura 7	Perfil de eluição em cromatografia de afinidade em quitina das proteínas e atividades β -N-acetilglucosaminidásica e β -N-acetilgalactosaminidásica.....	27
Figura 8	Perfil de eluição em cromatografia de troca iônica em DEAE Biogel das proteínas e atividades β -N-acetilglucosaminidásica e β -N-acetilgalactosaminidásica.....	28
Figura 9	Perfil de eluição em cromatografia de afinidade em hidroxiapatita das proteínas e atividades β -N-acetilglucosaminidásica e β -N-acetilgalactosaminidásica.....	29
Figura 10	Atividades específicas das frações reunidas da cromatografia em hidroxiapatita.....	30

Figura 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....	32
Figura 12 Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular da β -N-Acetilhexosaminidase por MALDI-TOF.....	33
Figura 13 A. Determinação do K_m e da $V_{m\acute{a}x}$ na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo. B. Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, 1934.....	34
Figura 14 Efeito da concentração protéica na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo.....	35
Figura 15 Efeito da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo.....	36
Figura 16 Estabilidade térmica da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica.....	37
Figura 17 Desnaturação térmica da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica.....	38
Figura 18 Efeito do pH na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica.....	39
Figura 19 Efeito do tempo sobre a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Purificação	da	β -N-
	acetilhexosaminidase.....		31
Tabela 2	Efeito	de sais	na atividade β -N-
	Acetilhexosaminidásica.....		41
Tabela 3	Influência	de grupos catalíticos	na atividade β -N-
	Acetilhexosaminidásica.....		42
Tabela 4	Efeito	de mono- e dissacarídeos	sobre a atividade β -N-
	Acetilhexosaminidásica.....		43
Tabela 5	Efeito	de polissacarídeos	sobre a atividade β -N-
	Acetilhexosaminidásica.....		44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAIS	10
2.1. SUBSTRATOS SINTÉTICOS	11
2.2. MATRIZES PARA CROMATOGRAFIAS	11
2.3. OUTROS COMPOSTOS	11
2.4. EQUIPAMENTOS	12
3 MÉTODOS	13
3.1 PURIFICAÇÃO DA β -N-ACETILHEXOSAMINIDASE DOS EXTRATOS HEPÁTICOS DO MAMÍFERO MARINHO <i>SOTALIA FLUVIATILIS</i>	13
3.1.1 Obtenção dos extratos protéicos	13
3.1.2 Fracionamento com sulfato de amônio	14
3.1.3 Cromatografia de exclusão molecular (Biogel A 1.5 m)	15
3.1.4 Cromatografia de afinidade (Quitina)	15
3.1.5 Cromatografia de troca iônica (DEAE Biogel)	16
3.1.6 Cromatografia de afinidade (Hidroxiapatita)	16
3.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS COM P- NITROFENIS DERIVADOS DE AÇÚCAR	17
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS COM SDS	17
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	18

3.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE PUREZA E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	19
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN E VELOCIDADE MÁXIMA	19
3.7 ESTUDOS CINÉTICOS	20
3.7.1 Influência da concentração da β-N-acetilhexosaminidase na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	20
3.7.2 Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	20
3.7.3 Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	21
3.7.4 Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	22
3.7.5 Efeito de diversos sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	22
3.7.6 Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	23
3.7.7 Teste de especificidade enzimática com carboidratos	23
4 RESULTADOS	24
4.1 PURIFICAÇÃO DA β -N-ACETILGLUCOSAMINIDASE	24
4.1.1 Determinação das atividades enzimáticas das frações provenientes do fracionamento com sulfato de amônio	24
4.1.2 Cromatografia de exclusão molecular	25
4.1.3 Cromatografia de afinidade em Quitina	26
4.1.4 Cromatografia de troca iônica	28

4.1.5 Cromatografia em Hidroxiapatita	29
4.1.6 Análise das etapas de purificação protéica	31
4.2 PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE	32
4.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE PUREZA E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	33
4.4 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA β-N-ACETILHEXOSAMINIDASE	33
4.4.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten e Velocidade máxima	34
4.4.2 Influência da concentração da β-N-acetilhexosaminidase na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	35
4.4.3 Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	35
4.4.4 Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	38
4.4.5. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	39
4.4.6. Efeito de diversos sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	40
4.4.7. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo	41
4.4.8 Teste de especificidade enzimática com carboidratos	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGS) são polissacarídeos ácidos, altamente sulfatados, complexos e lineares. Estes compostos podem ser agrupados em quatro classes: (1) ácido hialurônico, (2) queratam sulfato, (3) condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), (4) heparam sulfato (HS) e heparina (HEP) (Figura 1). São dotados de estruturas formadas por dissacarídeos repetitivos com uma *N*-acetilhexosamina (*N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina) (Figura 2) e um ácido urônico (glucurônico ou idurônico) ou um açúcar neutro (galactose, no caso do queratam sulfato). O ácido hialurônico é o único glicosaminoglicano não-sulfatado, os outros são modificados pela (1) adição de grupos *O*-sulfato nas várias hidroxilas, (2) 5-epimerização de alguns resíduos de ácido glucurônico para formar resíduos de ácido idurônico (dermatam sulfato, heparam sulfato, heparina), e (3) remoção de resíduos acetil de algumas hexosaminas substituídas com *N*-sulfatos (heparam sulfato e heparina). Estas modificações introduzem heterogeneidades dentro das cadeias e frequentemente têm papéis numa ampla variedade de processos biológicos e farmacológicos. Com a exceção do ácido hialurônico, os glicosaminoglicanos são covalentemente ligados a um *core* de proteínas, formando macromoléculas chamadas proteoglicanos. São encontrados no interior das células, nas suas superfícies ou nas matrizes extracelulares, desempenhando importantes papéis biológicos estando desta forma envolvidos numa grande variedade de patologias (VOLPI, 2005).

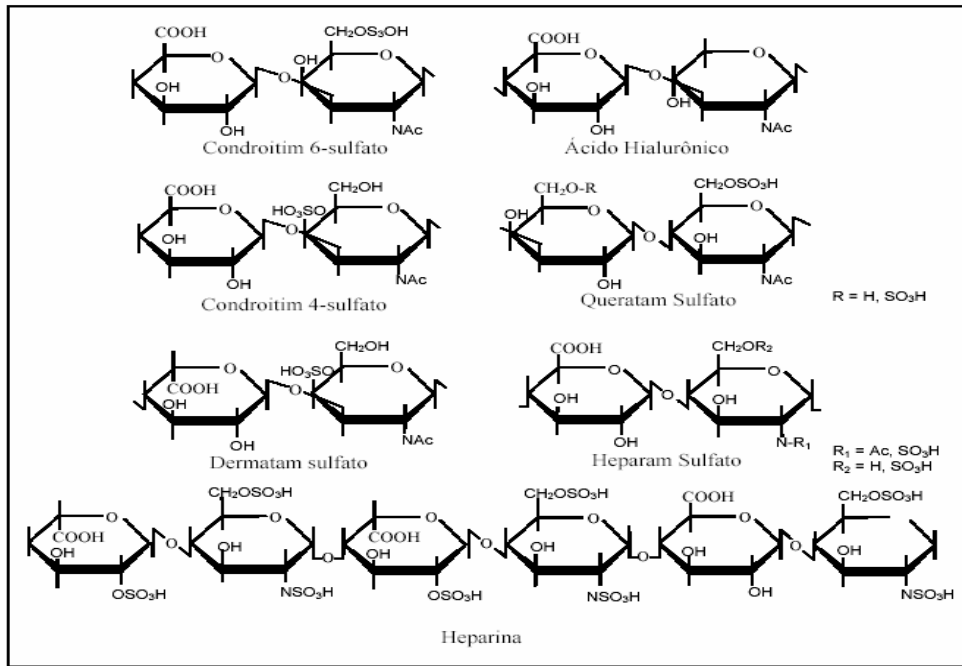


Figura 1: Tipos de glicosaminoglicanos (GAGS).

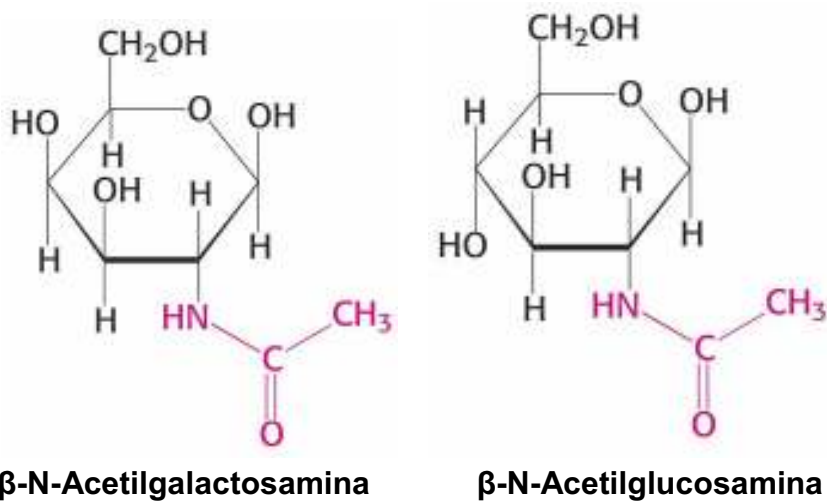


Figura 2: Hexosaminas constituintes dos glicosaminoglicanos.

Os glicosaminoglicanos desempenham inúmeras funções essenciais ao organismo como: organogênese e controle do crescimento, adesão celular, sinalização, inflamação, tumorigênese e interações com patógenos (DIETRICH, 1984; NADER & DIETRICH, 1989; ESKO 1991; ROSTAND e ESKO, 1997; SCHMIDTCHEN *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que certas quimocinas requerem interações com glicosaminoglicanos para seu funcionamento *in vivo* (HANDEL, 2005). Estas funções variam de acordo com as particularidades estruturais dos compostos bem como com o tipo de tecido onde os mesmos estão presentes. Esses compostos abrangem uma gama tão grande de funções, que encontramos até relações com as doenças causadas por príons, uma vez que há várias linhas de evidências sugerindo que glicosaminoglicanos e, em particular, o heparan sulfato pode desempenhar um papel no processo de conversão do PrP^C (gene “priônico” não-expresso) à PrP^{Sc} (gene “priônico” expresso). Em relação a esse último, tem sido proposto que seu acúmulo possa induzir ativação anormal de atividade lisossomal, que por sua vez estaria relacionada ao metabolismo dos glicosaminoglicanos (MAYER-SONNENFELD, 2005).

Muitos glicosaminoglicanos purificados de diferentes tecidos animais apresentam várias atividades farmacológicas *in vitro*, sendo utilizados como base para importantes drogas de uso nas áreas clínicas e farmacêuticas (VOLPI, 2005).

No metabolismo de glicosaminoglicanos e proteoglicanos existem diversos complexos multienzimáticos, envolvidos em suas sínteses e degradações. Especificamente em seu catabolismo faz-se necessária a participação de glicosidases. Distúrbios no metabolismo degradativo dos

glicosaminoglicanos culminam em mucopolissacaridoses, que levam ao acúmulo celular destes compostos, produzindo anormalidades físicas e mentais, podendo inclusive, levar à morte. Em MATSUZAWA, 2005, por exemplo, é relatada a ocorrência da doença de Fabry, a qual se trata de um distúrbio genético ligado ao cromossomo X, resultante de uma deficiência de atividade α -galactosidásica (E. C. 3.2.1.22). Já no caso de algum distúrbio da enzima \square -N-Acetilhexosaminidase (E. C. 3.2.1.52), caracteriza-se a doença de Tay-Sachs, que é causada por uma mutação na subunidade β da hexosaminidase. A partir daí, é evidenciado um distúrbio neurodegenerativo progressivo onde se dá um acúmulo de gangliosídeos GM2, particularmente em neurônios, e é clinicamente indistinguível de outra mucopolissacaridose, a doença de Tay-Sachs (CAZy – Carbohydrate-Active enZYmes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>). Dentre as 50 ou mais enzimas lisossomais, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lípases, fosfolípases, fosfatases e sulfatases, a \square -N-Acetilhexosaminidase está entre as mais abundantes; fato esse que justifica o fato da doença de Tay-Sachs ser tão importante, ocorrendo numa proporção de 1:3600 recém-nascidos (MAHURAN, 1995).

Glicosidases

Glicosidases são enzimas que estão envolvidas em várias funções importantes nos processos biológicos, e por modificar ou bloquear tais processos, são importantes para aplicações terapêuticas ou biotecnológicas (AWAD *et al.*, 2004), como, por exemplo, a remoção de cadeias laterais de matrizes polissacarídicas (FRY, 1995) ou a análise estrutural de glicosaminoglicanos (YAMAGISHI, 2003). São moléculas protéicas

responsáveis pela hidrólise de glicosídeos O-, N- e S- ligados (SPENCER & DAVIES, 2001), podendo ser usadas como biocatalizadores na síntese de oligossacarídeos (BRUINS *et al.*, 2003). Além disso, seu estudo constitui importante contribuição para o esclarecimento das características estruturais dos carboidratos (SPENCER & DAVIES, 2001). Essas enzimas, por exemplo, desempenham um papel crucial numa completa e rápida degradação de xilanas ramificadas, as quais são os maiores componentes das frações hemicelulósicas em plantas (SHAO & WEIGEL, 1992). Glicosidases também estão envolvidas na degradação parcial do exoesqueleto “velho” durante a pré-muda de artrópodes, revelando mais uma vez sua importância (ROER, 2001).

A atividade enzimática β -N-Acetilhexosaminidásica (E.C. 3.2.1.52) está incluída na Família 3 das Glicosil Hidrolases, juntamente com as atividades β -Glucosidásica (3.2.1.21), α -L-arabinofuranosidásica (EC 3.2.1.55), Glucan 1,4- β -glucosidásica (EC 3.2.1.74), dentre outras. Possui como sinônimos: N-acetil- β -glucosaminidase, β -N-acetilhexosaminidase e quitobiase (CAZy – Carbohydrate-Active enZYmes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>).

As glicosidases podem ser classificadas como endoglicosidases que clivam cadeias polissacarídicas liberando dissacarídeos e oligossacarídeos ou exoglicosidases, as quais clivam estas cadeias polissacarídicas a partir de sua porção não redutora liberando monossacarídeos (MALEY *et al.*, 1989). Pode haver ainda, subclassificações de acordo com o substrato sobre os quais essas enzimas atuam.

O interesse em estudos por novas atividades glicosidásicas reside no campo da biotecnologia e está focado, principalmente, na exploração destas enzimas para a síntese de oligossacarídeos e a possibilidade de manipulação

genética destas para a produção de um catalisador sintético eficiente (ANDREOTTI, 2005).

Endo- β -N-acetilglucosaminidase

As enzimas endo- β -N-acetilglucosaminidases são responsáveis pela hidrólise da ligação glicosídica entre um resíduo de N-acetil- β -D-glucosamina e um monossacarídeo adjacente dentro de uma cadeia polissacarídica. KARAMANOS (1997) classifica estas enzimas em três grupos: as que degradam mureína, quitina ou N-glicanos. Uma das aplicações para esse tipo de enzima, está no estudo para a elucidação da função fisiológica de N-glicanos livres no crescimento e desenvolvimento de células vegetais (WOO, 2004). As endo- β -N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.96, endo- β -GlcNAc-ase) hidrolisam as ligações glicosídicas na metade de N, N'-diacetilquitobioses ou oligossacarídeos N-ligados de glicoproteínas ou glicopeptídeos, liberando oligossacarídeos com um resíduo N-acetilglucosamina em seus terminais redutores (KATO, 2002). FUJITA, 2002 demonstrou que a endo- β -N-acetilglucosaminidase de *Arthrobacter protophormiae* tem atividade de transglicosilação, e oligossacarídeos ricos em manose são transferidos a glicosidases como substratos aceptores, sendo esse um atrativo método para remodelagem de glicoproteínas ou síntese de neogliconconjugados. Além disso, as endo- β -GlcNAc-ases de fontes bacterianas como *Streptomyces plicatus* (TARENTINO & MALEY, 1974) e *Streptococcus pneumoniae* (KOIDE & MURAMATSU, 1974; MURAMATSU *et al.*, 2001) têm sido estudadas em detalhes e usadas como ferramentas em estudos de glicanos N-ligados.

Exo-β-N-acetilglucosaminidase

As exo-β-N-acetilglucosaminidases pertencem a um grupo de enzimas que removem resíduos de N-acetil-β-D-glucosamina dos terminais não redutores das cadeias de carboidratos, sendo assim consideradas exoglicosidases (HORSCH *et al.*, 1997). Estas enzimas também são denominadas de β-N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1.52), devido ao fato de possuírem atividade β-N-acetilglucosaminidásica bem como atividade β-N-acetilgalactosaminidásica (KRESSE & GLÖSSL, 1987; HORSCH *et al.*, 1997; NIIMI *et al.*, 2001). O papel bioquímico dessa enzima tem sido elucidado em bactérias, fungos e artrópodes; já 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 exo-β-N-acetilglucosaminidases, atuam também sobre os p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminídeos (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-β-D-glucosamina. Em meio básico o p-nitrofenol transforma-se em p-nitrofenolato que absorve no comprimento de onda de 405 nm.

Sotalia fluviatilis

É também chamado de boto cinza ou tucuxi. É o menor cetáceo conhecido, não chegando a atingir 1,5 m na maioria das vezes, pesando em média 42 kg, *Sotalia fluviatilis* possui coloração cinza-escuro com uma variável tonalidade de marrom no dorso; a região ventral, da garganta ao ânus, é

branco-amarelada. Tanto a cauda como as nadadeiras e a aleta dorsal são da mesma coloração da dorsal. Os botos cinzas são normalmente encontrados em grupos e no Amazonas podem ser às vezes observados em associação com *Inia geoffrensis* (boto-cor-de-rosa). Alimentam-se de peixes e crustáceos. (Boto cinza – *Sotalia fluviatilis*, <http://www.geocities.com/maquaticos/tucuxi.htm>).

O *Sotalia fluviatilis* apresenta duas formas geográficas: uma fluvial e outra costeira (SILVA & BEST, 1994). A forma fluvial é endêmica da bacia do Rio Amazonas, enquanto a costeira distribui-se desde a costa meridional de Santa Catarina, Brasil 27° S até Honduras 15° N, na América Central (SILVA & BEST, 1996). *Sotalia fluviatilis* está incluída na categoria de “insuficientemente conhecida”, na lista de espécies cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais – IUCN (REEVES & LEATHERWOOD, 1994). Há vários estudos sobre essa espécie, os quais abrangem aspectos relacionados à: ocorrência de organoclorados (YOGUI *et. al.*, 2004, YOGUI, 2002), captura acidental (SCHMIEGELOW, 1990), encalhes e foto-identificação (SANTOS, 1999), análise superficial de dieta (MONTEIRO-FILHO, 1991, SANTOS, 2001), crescimento (CARVALHO, 1963), reprodução (ROSAS, 2000), comportamento (GEISE, 1989) e contaminação por metais pesados e íons (KUNITO *et. al.*, 2004, MONTEIRO-NETO, 2003).

Objetivos

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas em nossos laboratórios, com a finalidade de identificar e caracterizar atividades glicosidásicas e sulfatásicas em organismos marinhos, levando a uma melhor compreensão da distribuição destas enzimas nos seres vivos, assim como sua atuação na degradação de

diferentes carboidratos, em particular os glicosaminoglicanos e carboidratos complexos de algas marinhas e fungos. Desta forma são utilizados como ferramentas moleculares que ajudam a elucidar a estrutura química destes polissacarídeos. Vale ressaltar que não existem relatos na literatura sobre estudos de glicosidases em mamíferos marinhos, e devido a sua importância já mencionada, justifica-se o presente trabalho. Nossos resultados poderão ser utilizados no estudo filogenético e evolutivo destas enzimas.

Com base nas razões acima discutidas, os objetivos do presente estudo foram:

- Identificar atividades exoglicosidásicas presentes nos extratos hepáticos do mamífero marinho *Sotalia fluviatilis*;
- Purificar a β -N-Acetilhexosaminidase através de métodos cromatográficos e não-cromatográficos;
- Determinar a massa molecular por espectrometria de massa da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica;
- Caracterizar cineticamente a β -N-Acetilhexosaminidase.

2. MATERIAIS

O espécime utilizado no estudo encontrava-se encalhado em uma praia no município de Barra de Cunhaú - RN, quando veio a óbito. Ele foi imediatamente transportado pelos integrantes do REMANE (Rede de Encalhe de Mamíferos Aquáticos do Nordeste) até o Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foi realizada a necropsia. Uma vez removido, o fígado foi acondicionado a -20°C até sua utilização.

Reino: *Eukaryota*

Filo: *Chordata*

Classe: *Mammalia*

Ordem: *Cetacea*

Família: *Delphinidae*

Gênero: *Sotalia*

Espécie: ***Sotalia fluviatilis***



Figura 3: *Sotalia fluviatilis* (boto-cinza ou tucuxi).

Foto pessoal de Cleysyvan de Souza Macedo.

2.1. Substratos sintéticos

p-nitrofenil β -D-manopiranosídeo; p-nitrofenil β -D-glucuronídeo; p-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo; p-nitrofenil N-acetil- β -D-galactosaminídeo; p-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo; p-nitrofenil β -D-fucopiranosídeo e p-nitrofenil sulfato foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA).

2.2. Matrizes para cromatografias

Foram utilizadas matrizes da Bio Rad Laboratories (Richmond, CA, EUA) para gel filtração (Biogel A 1.5 m), afinidade em hidroxiapatita e troca iônica (DEAE-Biogel). Para a afinidade em quitina, foram utilizados flocos extraídos do exoesqueleto de lagostas do gênero *Panulirus*; gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marconi Ginane do Departamento de Química da UFRN.

2.3. Outros compostos

Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e Fosfato de Sódio Monobásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da VETEC Química Fina LTDA – RJ; Fosfato de Sódio Bibásico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) da Nuclear CAE – Casa da Química Ind. E Com. LTDA; Ácido Tricloroacético (CCl_3COOH)-MERCK – Rio de Janeiro; 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; Persulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, Glicina, N, N, N', N'-Tetra-Metileno Diamino (TEMED), e Coomassie Brilliant Blue ER 250, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Fair Lawn, NY, EUA); padrões de massa

molecular para eletroforese Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers RPN 800 (Amersham Biociences).

2.4. Equipamentos

Aagitador orbital, modelo 2525, FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil); banhos e estufas de temperaturas constantes FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil); bomba peristáltica da Pharmacia Biotech, (Uppsala, Suíça); centrífuga refrigerada, modelo CR 21 Hitachi; espectrofotômetro U 2000 da Hitachi (Japão); fontes de corrente contínua reguláveis, desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda., Indústria Comércio (São Paulo, SP, Brasil); medidor de pH Digimed (São Paulo, SP, Brasil); Voyager-DETM STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, US).

3. MÉTODOS

3.1. Purificação da β -N-Acetilhexosaminidase dos extratos hepáticos do mamífero marinho *Sotalia fluviatilis*

Para a purificação da β -N-Acetilhexosaminidase, foi montado um protocolo com os passos seqüenciais: fracionamento dos extratos protéicos com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular (Biogel A 1.5 m), cromatografia de afinidade (Quitina), cromatografia de troca iônica (DEAE Biogel) e cromatografia em hidroxapatita.

3.1.1. Obtenção dos extratos protéicos

Para a realização deste trabalho, cerca de 580g de tecido hepático foi homogeneizado em dois volumes de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0. Em seguida, o homogenato foi submetido a uma centrifugação a 27000 rpm, a 4°C, onde o precipitado, por constituir-se basicamente de restos celulares, foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para o fracionamento enzimático. Procedeu-se a delipidação do extrato, ao qual foram acrescentados dois volumes de acetona P.A. e acondicionado a 4°C por 18 horas. Então, esse material foi submetido a uma nova centrifugação a 27000 x g, a 4 °C. O precipitado foi utilizado e o sobrenadante, por ser constituído de lipídios dissolvidos em acetona P.A., foi descartado. Após esse último passo, o material, denominado de extrato bruto, foi submetido a fracionamentos seqüenciais com sulfato de amônio.

3.1.2. Fracionamento com sulfato de amônio

Este método é empregado como primeiro passo de separação protéica, e utiliza a competição entre as moléculas do sal dissociadas e as que solubilizam as proteínas, fazendo estas últimas a precipitar. O fracionamento utilizado neste trabalho consistiu em três etapas de saturação com sulfato de amônio: 0-30%, 30-50% e 50-80%. Após 18 horas da adição do sal em cada etapa, a solução foi centrifugada a 27000 x g, a 4°C. Cada precipitado foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, e o sobrenadante submetido ao próximo fracionamento. Os precipitados foram então dialisados contra o mesmo tampão a 4°C, realizando-se três trocas a cada 3 horas. Essas frações foram denominadas FI, FII e FIII, respectivamente (Figura 4).

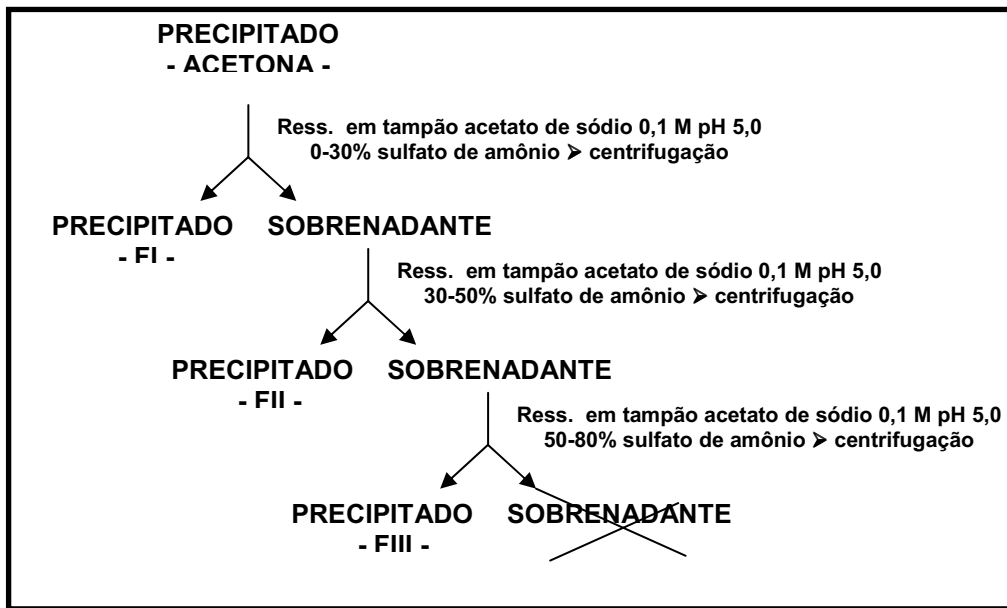


Figura 4: Esquema do fracionamento com sulfato de amônio.

3.1.3. Cromatografia de exclusão molecular (Biogel A 1.5 m)

Um volume de 182,5 mL (304,8 mg de proteínas) obtido da fração FI foi submetido a uma concentração protéica com sulfato de amônio 0-90% e, após 18 horas, a uma centrifugação. A partir daí, foram feitas oito aplicações protéicas (6,179 mg cada) numa coluna Biogel A 1.5 m (72 cm x 1,8 cm) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, sendo coletadas frações com aproximadamente 2 mL (fluxo constante de 0,6 mL/min). O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, enquanto o perfil da atividade com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

3.1.4. Cromatografia de afinidade (Quitina)

Cerca de 182 mL (87,2 mg de proteína) oriundo da Biogel A 1.5 m foi aplicado numa coluna de quitina (3 cm x 1,1 cm). A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M; pH 5,0; sendo eluída (fluxo de 36 mL/hora), após a aplicação da amostra, com o mesmo tampão em valores de pH decrescentes (5,0; 3,5 e 2,0) e por fim HCl 1 mM pH próximo de 1. Frações de 1 mL de cada pH foram coletadas e dialisadas (exceto a primeira fração) contra tampão acetato de sódio 0,1 M; pH 5,0 durante três horas, com trocas a cada hora. A monitoração do perfil de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil da atividade com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

3.1.5. Cromatografia de troca iônica (DEAE Biogel)

Aproximadamente 190 mL (70,7 mg de proteína) oriundo da coluna de Quitina foi aplicado numa coluna de DEAE Biogel (1,5 cm x 1,5 cm x 2,0 cm). A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0; sendo eluída, após a aplicação da amostra, com o mesmo tampão com valores crescentes de cloreto de sódio (0,05M, 0,1M, 0,3M, 0,5M, 0,7M e 1,5M). Frações de 1 mL de cada concentração foram coletadas e dialisadas (exceto a primeira fração) contra tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, durante três horas, com trocas a cada hora. A monitoração do perfil de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil da atividade com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

3.1.6. Cromatografia em Hidroxiapatita

Um volume de 198 mL (47,12 mg de proteína) oriundo da DEAE Biogel foi aplicado numa coluna de hidroxiapatita (1,5 cm x 1,0 cm). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 7,6, sendo eluída, após a aplicação da amostra, com o mesmo tampão com valores crescentes de fosfato de sódio monobásico (0,05M, 0,07M, 0,09M, 0,1M, 0,3M e 0,5M). Frações de 1 mL de cada concentração foram coletadas e dialisadas contra tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 durante três horas, com trocas a cada hora. A monitoração do perfil de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil da atividade com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

3.2. Determinação das atividades enzimáticas com p-nitrofenis derivados de açúcar

Alíquotas de 20 μL (2,13 μg) de cada fração, tanto provenientes das precipitações com sulfato de amônio quanto das cromatografias, foram incubadas a 37°C durante 1 hora, com os diferentes p-nitrofenis derivados de açúcares a uma concentração final de 0,15 mM, em um volume final de 100 μL . As incubações foram interrompidas após a adição de 1 mL de NaOH (0,25 N) e o p-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Para cada ensaio, foram feitos os controles negativos dos substratos e das frações protéicas. Uma unidade enzimática (1 U) corresponde a 0,01 unidades de absorbância liberada por hora. As atividades específicas foram calculadas pela relação entre a quantidade de p-nitrofenol liberado em uma hora e a massa em μg de proteína adicionada ao ensaio enzimático.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas com SDS

Para avaliar o grau de pureza da β -N-Acetilhexosaminidase, alíquotas das frações oriundas dos padrões de massas moleculares, do extrato bruto e da hidroxiapatita foram submetidas à 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%), alíquotas com aproximadamente 20 μg de proteína foram aplicadas no gel (10 cm x 14 cm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 40 mA e uma voltagem de 110 V, por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado em solução de Coomassie Blue R 250 0,1% contendo 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 Coomassie Blue, foi desidratado com etanol a 50% (três trocas a cada 20 minutos) sendo, 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 μ L de formaldeído 37%) por 20 minutos. Novamente o gel foi lavado três vezes com água destilada e por fim, foi adicionada a solução reveladora (100 mL solução de carbonato de sódio 6%, 50 μ 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 10 kDa a 250 kDa, da Amersham Biociences.

3.4. Determinação da concentração de proteínas

Para determinar a concentração de proteínas das amostras foi utilizado um método que envolve a ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 às proteínas, onde há a eliminação da maioria dos problemas descritos. Esta ligação causou uma mudança no máximo de absorção do corante de 365 nm a 595 nm. Este incremento na absorção foi monitorado. O reagente foi utilizado numa concentração final de 0,01% (w/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) de etanol e 8,5% (w/v) de ácido fosfórico. Cem microlitros de cada amostra foram misturados com um mililitro do reagente e homogeneizados em vortex, as absorbâncias a 595 nm foram mensuradas e as quantificações

protéicas foram realizadas utilizando como padrão a albumina sérica bovina (Bradford, 1976).

3.5. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular por espectrofotometria de massa (MALDI-TOF)

O grau de pureza e a massa molecular da β -N-Acetilhexosaminidase foram determinados pelo MALDI-TOF/MS (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando calibração externa fechada sujeita ao modo linear. Aproximadamente 20 nmol da amostra liofilizada foi dissolvida em água Milli-Q, misturada a uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, aplicada numa placa de amostra MALDI, e seca a temperatura ambiente.

3.6. Determinação da constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima

Com o objetivo de se determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo, incubações com alíquotas de 20 μ L (2,13 μ g) da β -N-Acetilhexosaminidase foram realizadas a 37°C durante uma hora, com um volume final de cem microlitros e com concentrações crescentes (0,1 a 10 mM) deste substrato. Os ensaios foram interrompidos com um mililitro de hidróxido de sódio 0,25N e o p-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram submetidos a linearização de Lineweaver-Burk para melhor determinação destes parâmetros. Os dados obtidos foram analisados pelo software Origin.

3.7. Estudos cinéticos

Uma vez determinado o K_m e a $V_{m\acute{a}x.}$, testes cinéticos foram realizados para a hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo, para isso testamos a hidrólise do substrato sintético (em concentração saturante final de 3 mM) frente a diferentes concentrações de enzima, diferentes temperaturas e pH. Além disso, foram analisadas a influência do tempo, o efeito de sais, de grupos catalíticos e de carboidratos sobre a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica. As incubações foram realizadas em volume final de cem microlitros, em duplicatas, com seus respectivos controles negativos.

3.7.1. Influência da concentração da β -N-acetilhexosaminidase na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Com o objetivo de avaliar a proporcionalidade entre as quantidades da enzima e de p-nitrofenol liberados durante os ensaios, alíquotas de 20 μ L (2,13 μ g), com quantidades variáveis (1,0, 0,5, 0,25, 0,12, 0,063 e 0,032 μ g) da β -N-acetilhexosaminidase foram ensaiadas a 37 °C com o substrato sintético. Após transcorrido 1 hora, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

3.7.2. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Para avaliarmos o efeito da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo, alíquotas de 20 μ L (2,13 μ g) da β -N-acetilhexosaminidase foram incubadas a diferentes temperaturas (5, 25, 37, 45, 50, 60, 65, 70 e 80°C). Depois de transcorrido 1 hora, 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, pré-incubações a 5, 28, 37, 45, 60 e 70°C foram realizadas com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo durante 15 minutos e, em seguida, foram procedidos ensaios a 37°C. 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.

Continuando com os experimentos relacionados à influência da temperatura sobre a hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo, a enzima foi pré-incubada a 37°C em diferentes tempos (5, 10, 20, 40, 160 e 320 minutos). Transcorrida essa etapa adicionamos o substrato e incubamos a 37°C durante 1 h. Os ensaios foram então interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

3.7.3. Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo

Com o objetivo de avaliarmos a influência do pH sobre a hidrólise do substrato sintético, foram preparados tampões em diferentes: acetato de sódio 0,1 M pH 3,0, 3,7, 4,0, 5,0 e 5,5; fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5 e 6,8 e tris-HCl 0,1 M pH 7,0, 7,5 e 8,5. Alíquotas de 100 μL (10,6 μg) da β-N-Acetilhexosaminidase foram dialisadas durante 18 horas contra os tampões acima citados. Em seguida, foram realizados ensaios enzimáticos com 20 μL da β-N-acetilhexosaminidase com o substrato sintético a 37°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.

3.7.4. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo

Para avaliar a influência do tempo na atividade β-N-Acetilhexosaminidásica, 2,13 μg de enzima foram incubadas em diferentes tempos (5, 10, 15, 30 minutos, 1, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 horas) a 37°C, sendo os ensaios interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

3.7.5. Efeito de sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo

Alíquotas de 20 μL (2,13 μg) da β-N-Acetilhexosaminidase foram pré-incubadas a 60°C, durante 15 minutos, na presença de diversos sais (concentração final de 1mM). Transcorrido esse tempo, foi adicionado o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo, como já descrito, a uma concentração final de 3 mM e foi procedido um ensaio de 37°C, e após 1 hora, 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 os seguintes: cloreto de bário (BaCl₂), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de lítio (LiCl), cloreto de mercúrio (HgCl₂), dodecil sulfato de sódio (SDS), fosfato de sódio dibásico (Na₂H₂PO₄), fosfato de sódio monobásico (Na₂HPO₄), nitrato de prata (AgNO₃), selenato de sódio (Na₂SeO₄), sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de zinco (ZnSO₄) e tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), como controle, simplesmente, não foi adicionado sal algum.

3.7.6. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo

Alíquotas de 20 μL (2,13 μg) da β-N-Acetilhexosaminidase foram pré-incubadas a 37°C, durante 15 minutos, na presença de 1 mM final de vários compostos que inibem especificamente radicais aminoácidos. Transcorrido esse tempo, foi adicionado o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo numa concentração final de 3 mM e ensaios foram realizados a 37°C. Após 1 h, as reações foram interrompidas 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: dicetona-2,4-pentanediona (C₅H₆O₂), dietilpirocarbonato (C₆H₁₀O₅), iodoacetamida (C₂H₄INO), N-etilmaleimida (C₆H₇NO₂) e PMSF (C₇H₇FO₂S).

3.7.7. Teste de especificidade enzimática com carboidratos

Alíquotas de 20 μL (2,13 μg) da β-N-acetilhexosaminidase foram incubadas com monossacarídeos e dissacarídeos em concentrações finais equimolares ao p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminídeo (final 3 mM), enquanto que as concentrações finais dos polissacarídeos foram de 4,5 mM. Os ensaios transcorreram a 37°C durante 1 hora, e após este período, foram interrompidos pela adição de 1ml de NaOH 0,25N, e o p-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405nm. Os carboidratos utilizados nesse experimento foram: ácido glucurônico, galactose, glicose, lactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, frutose, maltose, sacarose, condroitim-6-sulfato, fucoidano de *Fucus vesiculosus* e heparina.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da β -N-acetilhexosaminidase

Para a purificação da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica, foram utilizados cinco passos: fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de afinidade em quitina, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade em hidroxiapatita. Em cada uma destas etapas acompanhamos o perfil de eluição das proteínas e o perfil de eluição da atividade enzimática desejada. Isto nos permitiu a escolha das frações com altas atividades específicas para serem utilizadas nos experimentos subseqüentes.

4.1.1. Determinação das atividades enzimáticas das frações provenientes do fracionamento com sulfato de amônio

As maiores atividades específicas obtidas nas frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio foram: β -N-Acetilgalactosaminidásica e β -N-Acetilglucosaminidásica na fração F1, como mostrado na figura 5, e, por esse motivo, essa fração foi selecionada para dar prosseguimento aos passos de purificação.

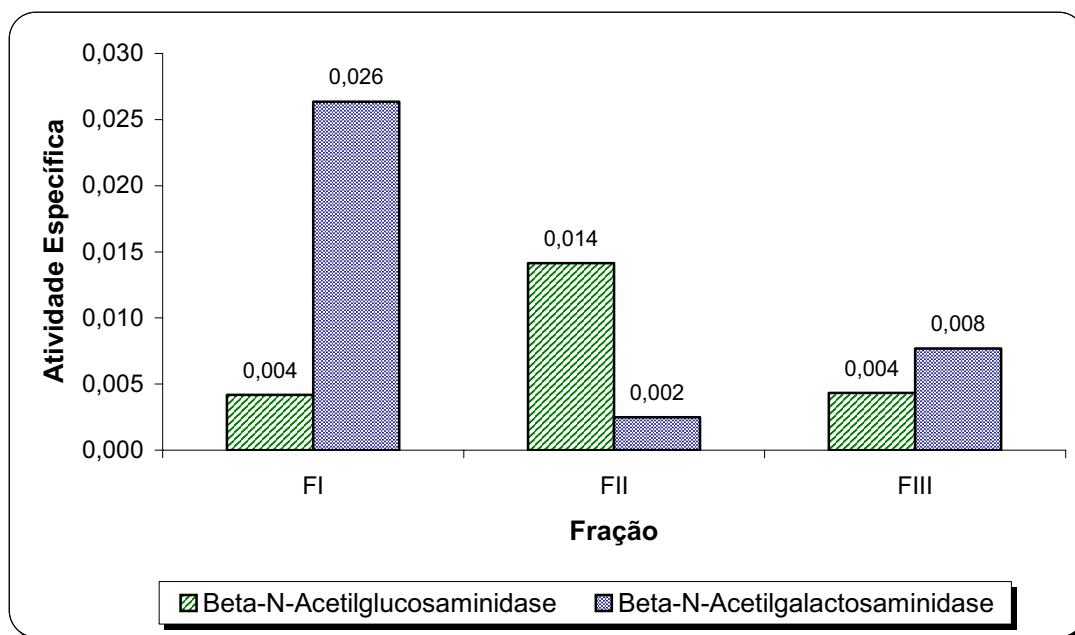


Figura 5: Atividades específicas das frações enzimáticas extraídas de *Sotalia fluviatilis* obtidas pela precipitação com sulfato de amônio. A atividade específica (D. O. 405 nm/ μg de proteína/ 37° C/ hora) foi calculada através da relação entre a quantidade de p-nitrofenil liberado e a massa em μg de proteínas de cada fração contida no ensaio, por um período de uma hora.

4.1.2. Cromatografia de exclusão molecular

Por ter apresentado maior atividade específica sobre o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-galactosaminídeo e o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo, a fração FI foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em Biogel A 1.5 m. Nesta cromatografia observamos a eluição coincidente destas duas atividades nas frações entre os tubos 10 e 16 (Figura 6), as quais foram reunidas para posterior cromatografia em quitina. Essas frações foram selecionadas por apresentar melhor atividade específica para os p-nitrofenis testados, uma vez que não seria interessante utilizar as frações onde o pico protéico é mais pronunciado, já que as atividades em questão não são representativas nessa área. Mas, vale ressaltar,

que esse passo cromatográfico mostrou-se eficiente, ocorrendo uma separação satisfatória de proteínas que não eram de interesse; fato esse, observado pelo grande pico protéico obtido a 280 nm.

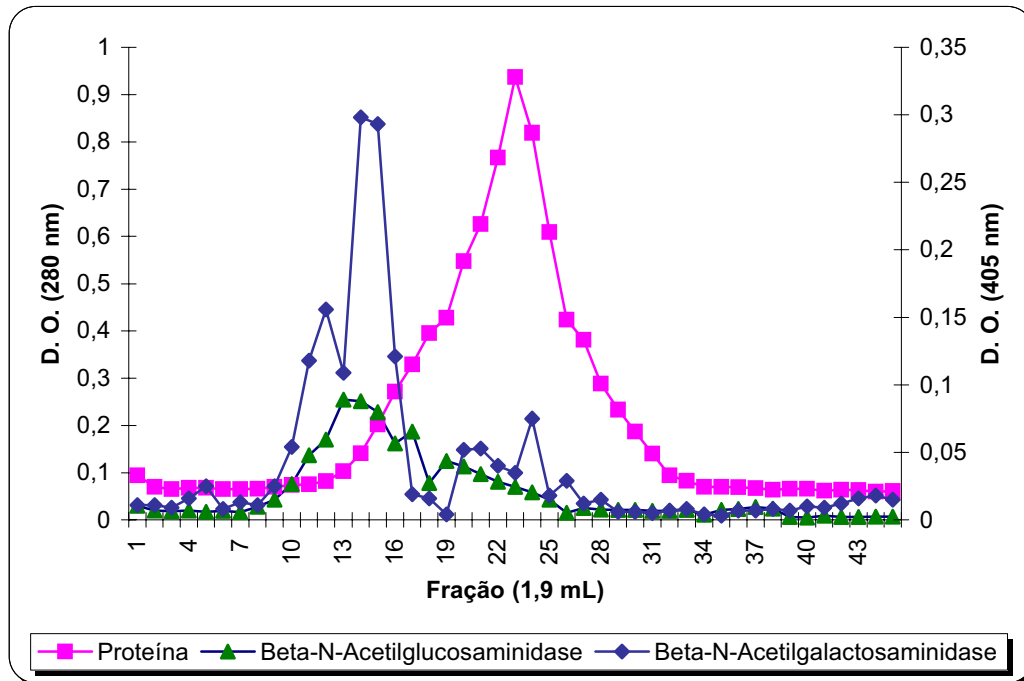


Figura 6: Perfil de eluição em cromatografia de exclusão molecular em Biogel 1.5 A m das proteínas e atividades enzimáticas no extrato FI de *Sotalia fluviatilis*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 2 mL. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil das atividades com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo e p-nitrofenil- β -N-acetilgalactosaminídeo determinadas por leitura a 405 nm.

4.1.3. Cromatografia de afinidade em Quitina

O perfil de eluição das frações provenientes da cromatografia em Biogel quando submetidas à cromatografia de afinidade com quitina apresentou também perfis de eluição coincidentes nas atividades β -N-Acetilgalactosaminidásica e β -N-Acetilglucosaminidásica nas frações que não adsorveram na coluna, frações 1-4 (Figura 7). Fato esse que não era esperado,

uma vez que hexosaminidases purificadas em nosso grupo de trabalho tiveram afinidade a essa matriz. Esse perfil pode ser explicado pela origem do material protéico e as diferentes propriedades, pois é inédita a utilização de enzimas de vertebrados em nosso grupo. Analisando esta figura, observamos também a eluição de proteínas nos pH 3,5, 2,0 e 1,0 que não apresentaram atividades para os substratos testados.

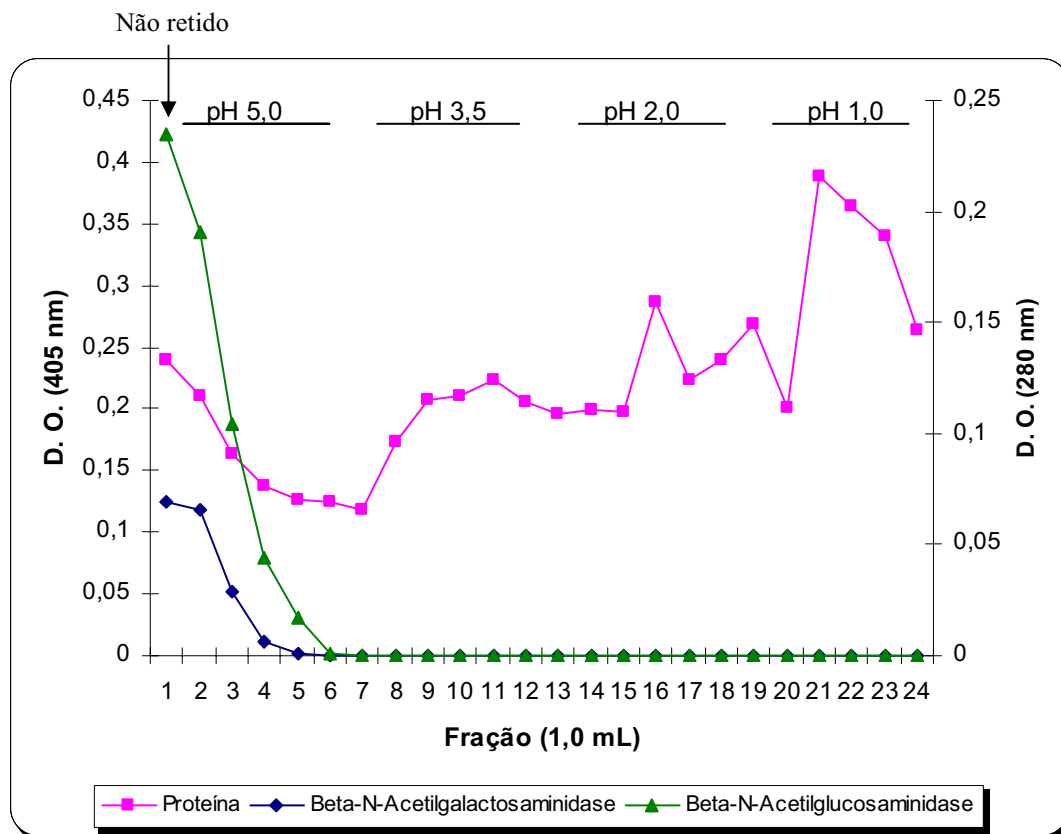


Figura 7: Perfil de eluição em cromatografia de afinidade em quitina das proteínas e atividades β -N-acetilglucosaminidásica e β -N-acetilgalactosaminidásica. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M; pH 5,0; sendo eluída, após a aplicação da amostra, com o mesmo tampão em valores de pH decrescentes (5,0; 3,5 e 2,0) e por fim HCl 1 mM com pH próximo de 1. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm e o perfil das atividades enzimáticas com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo e p-nitrofenil- β -N-acetilgalactosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

4.1.4. Cromatografia de troca iônica

As frações de 1 a 4 da quitina foram reunidas e submetidas à cromatografia de troca iônica em DEAE Biogel. O perfil de eluição nesta coluna demonstrou que as atividades β -N-Acetilglucosaminidásica e β -N-Acetilgalactosaminidásica foram eluídas novamente juntas nas frações 2-4, numa concentração de 0,05M de cloreto de sódio (Figura 8). Outros picos de proteína foram eluídos nas frações 7, 10, 12 e 17.

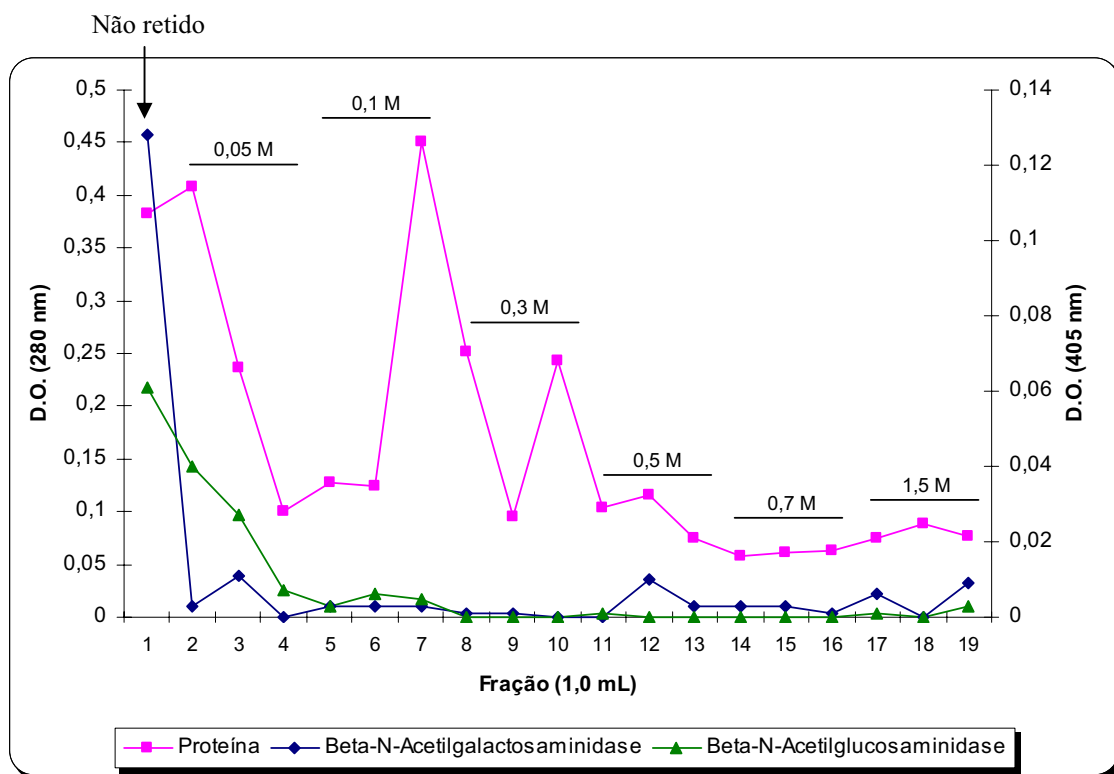


Figura 8: Perfil de eluição em cromatografia de troca iônica em DEAE Biogel das proteínas e atividades β -N-Acetilglucosaminidásica e β -N-Acetilgalactosaminidásica. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0; sendo eluída, após a aplicação da amostra, com o mesmo tampão com valores crescentes de cloreto de sódio (0,05M, 0,1M, 0,3M, 0,5M, 0,7M e 1,5M). 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 e p-nitrofenil- β -N-acetilgalactosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

4.1.5. Cromatografia em Hidroxiapatita

As frações 2 a 4 da DEAE Biogel foram reunidas e submetidas à cromatografia de afinidade em hidroxiapatita. O perfil de eluição nesta coluna revelou uma acentuada atividade β -N-Acetilglucosaminidásica, a qual acompanha o perfil protéico nessa cromatografia (Figura 9). As análises demonstraram que houve uma perda quase que total da atividade da β -N-acetilgalactosaminidase.

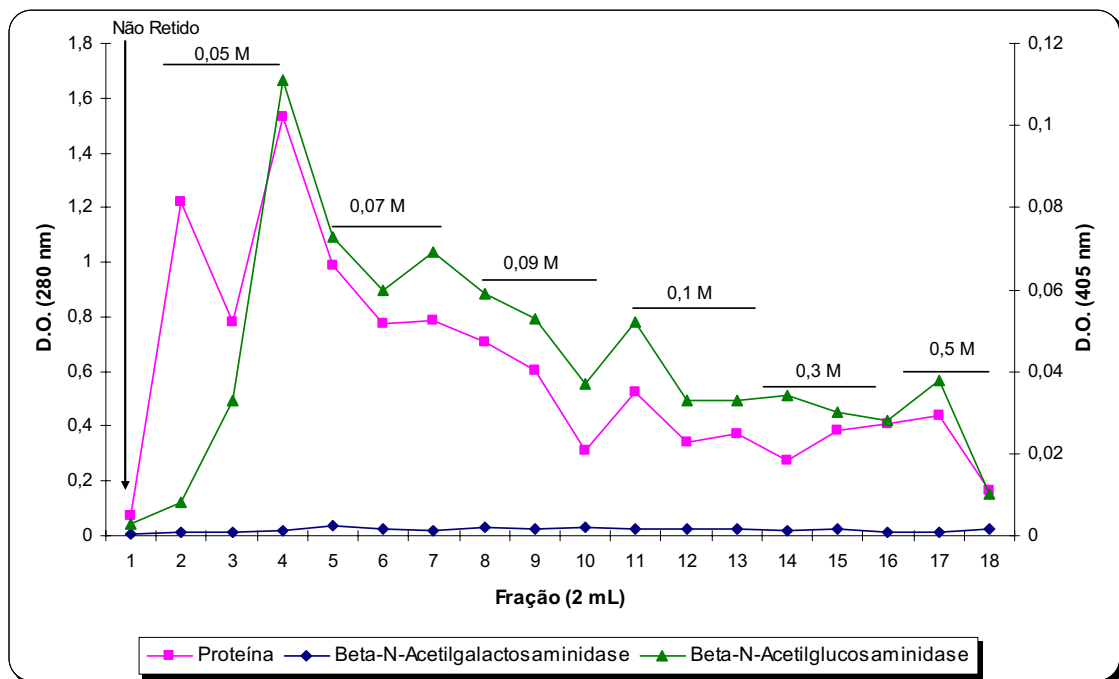


Figura 9: Perfil de eluição em cromatografia de afinidade em hidroxiapatita das proteínas e atividades β -N-Acetilglucosaminidásica e β -N-Acetilgalactosaminidásica. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 7,6. Após a aplicação da amostra, foram coletadas frações de 2 mL com o mesmo tampão com valores crescentes de fosfato de sódio monobásico (0,05M, 0,07M, 0,09M, 0,1M, 0,3M e 0,5M). 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 e p-nitrofenil- β -N-acetilgalactosaminídeo em ensaios descritos no item 4.2.

As frações 3-5 (F-1), eluídas numa concentração de 0,05 - 0,07M de fosfato de sódio monobásico; 6-9 (F-2), eluídas numa concentração de 0,07 - 0,09M de fosfato de sódio monobásico; 10-13 (F-3), eluídas numa concentração de 0,09 - 0,1M de fosfato de sódio monobásico e 14-17 (F-4), eluídas numa concentração de 0,3 - 0,5M de fosfato de sódio monobásico foram reunidas para a quantificação de proteínas e de atividades (Figura 10). Sendo a fração F-4 selecionada para dar prosseguimento com os demais experimentos, devido a sua maior atividade específica.

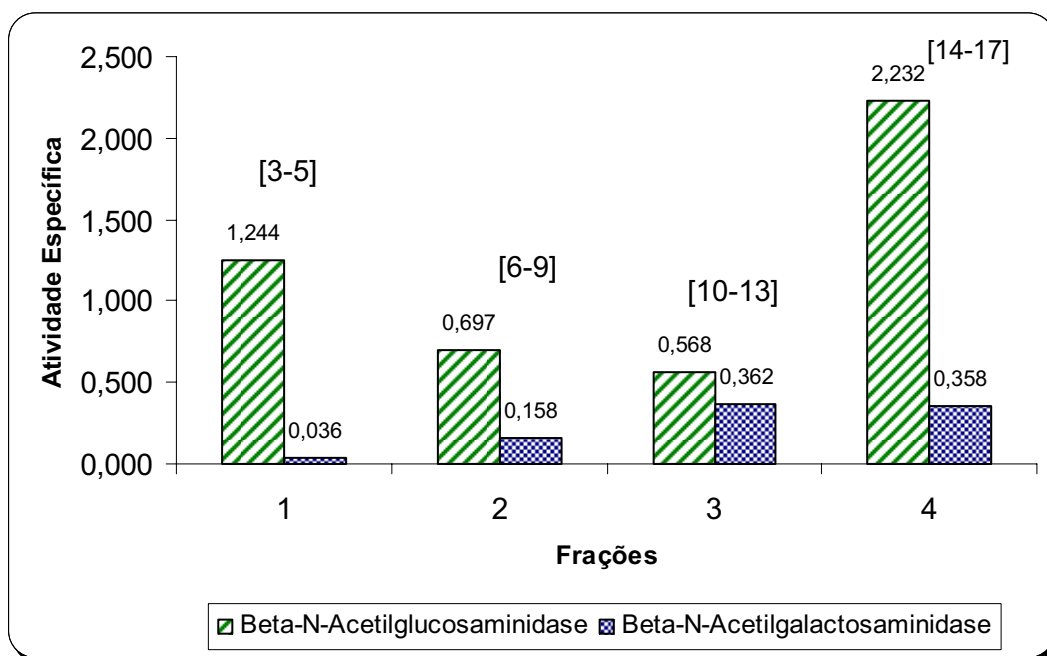


Figura 10: Atividades específicas das frações reunidas da cromatografia em hidroxiapatita. Atividade específica corresponde ao valor da absorbância a 405 nm do ensaio enzimático/mg de proteína do ensaio/hora a 37 °C. Onde: 1= Frações reunidas entre 3 e 5; 2 = Frações reunidas entre 6 e 9; 3 = Frações reunidas entre 10 e 13; 4 = Frações reunidas entre 14 e 17. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford, 1976 (métodos 4.4) e as atividades com o p-nitrofenil-N-Acetil-β-D-glicosaminideo e p-nitrofenil-β-N-acetilgalactosaminideo em ensaios descritos no item 4.2.

4.1.6. Análise das etapas de purificação protéica

As etapas utilizadas na purificação da β -N-Acetilhexosaminidase estão sumarizadas na Tabela 1. Analisando-se esta tabela observou-se um índice de purificação final de 2232 vezes e uma recuperação de 8,4%. O passo mais eficiente na separação protéica foi à cromatografia em hidroxiapatita, tendo-se retirado aproximadamente 97,6% de outras proteínas.

Tabela 1
Purificação da β -N-Acetilhexosaminidase

Fração	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica	Purificação (X)	Recuperação (%)
Bruto	650	5096,00	29,8	0,001	1	100
Fl	182,5	304,78	10,3	0,033	33	34,6
Biogel	182	87,18	8,1	0,093	93	27,2
Quitina	188	70,69	7,4	0,105	105	24,8
DEAE	198	47,12	6,0	0,127	127	20,1
F- 4	10,5	1,12	2,5	2,232	2232	8,4

Onde: Volume= volume total da fração; Proteína total = Volume total x concentração protéica da fração determinada pelo método de Bradford, 1976; Atividade Total (U) = 1U corresponde a 0,01 unidade de absorbância a 405 nm; Atividade específica = Atividade da fração/ Proteína do ensaio; 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 à atividade total no extrato bruto (100%).

4.2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE

Para avaliar o grau de pureza e determinar a massa molecular aproximada da β -N-Acetilhexosaminidase, alíquotas do extrato bruto e da enzima (F – 4) 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 β -N-Acetilhexosaminidase, onde somente uma banda protéica é observada na região de 10 kDa.

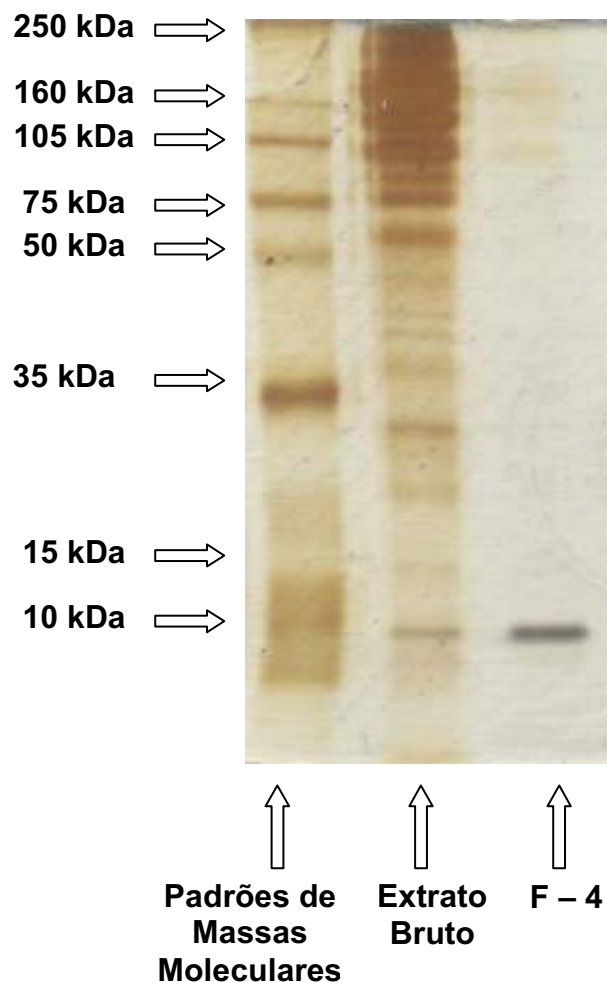


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das frações protéicas.

4.3. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular por espectrofotometria de massa (MALDI-TOF)

Com o objetivo de confirmar o resultado obtido na SDS-PAGE, a F - 4 foi submetida a uma análise por espectrofotometria de massa. Os resultados também mostraram um único pico bem definido indicando um alto grau de pureza dessa fração com uma massa molecular de 10 kDa (figura 12).

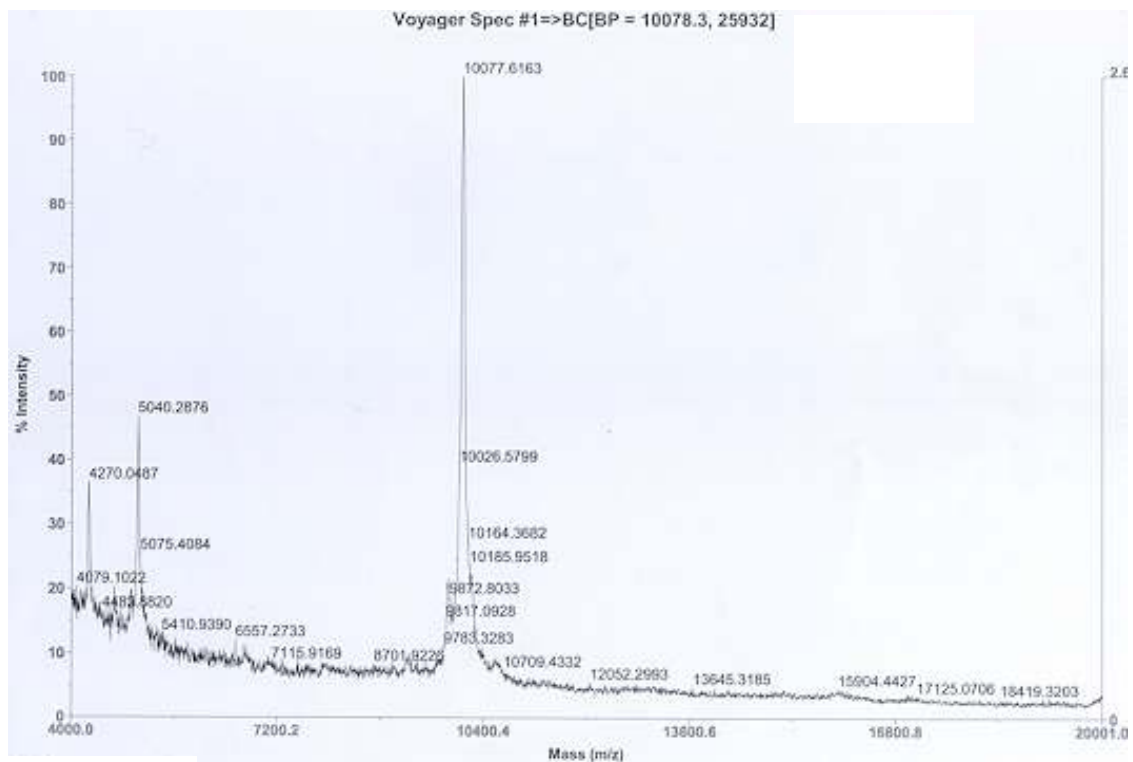


Figura 12: Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular da β -N-Acetilhexosaminidase por MALDI-TOF.

4.4. Caracterização cinética da β -N-Acetilhexosaminidase

Foi realizada a caracterização da β -N-Acetilhexosaminidase, inicialmente, pela determinação do K_m e da $V_{m\acute{a}x.}$ para a hidrólise do p-nitrofenil- β -N-Acetilglucosaminídeo. Feito isso foram realizados os testes cinéticos com

diferentes parâmetros: tempo, concentrações de enzima, temperatura e pH. Além disso, foi analisada a influência de sais, de grupos catalíticos e de carboidratos sobre a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica.

4.4.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten e Velocidade máxima

Observamos na figura 13 a ação da β -N-Acetilhexosaminidase sobre diferentes concentrações do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo. Os resultados demonstraram um K_m aparente de 2,72 mM e uma velocidade máxima de 0,572 nmol/mg/min.

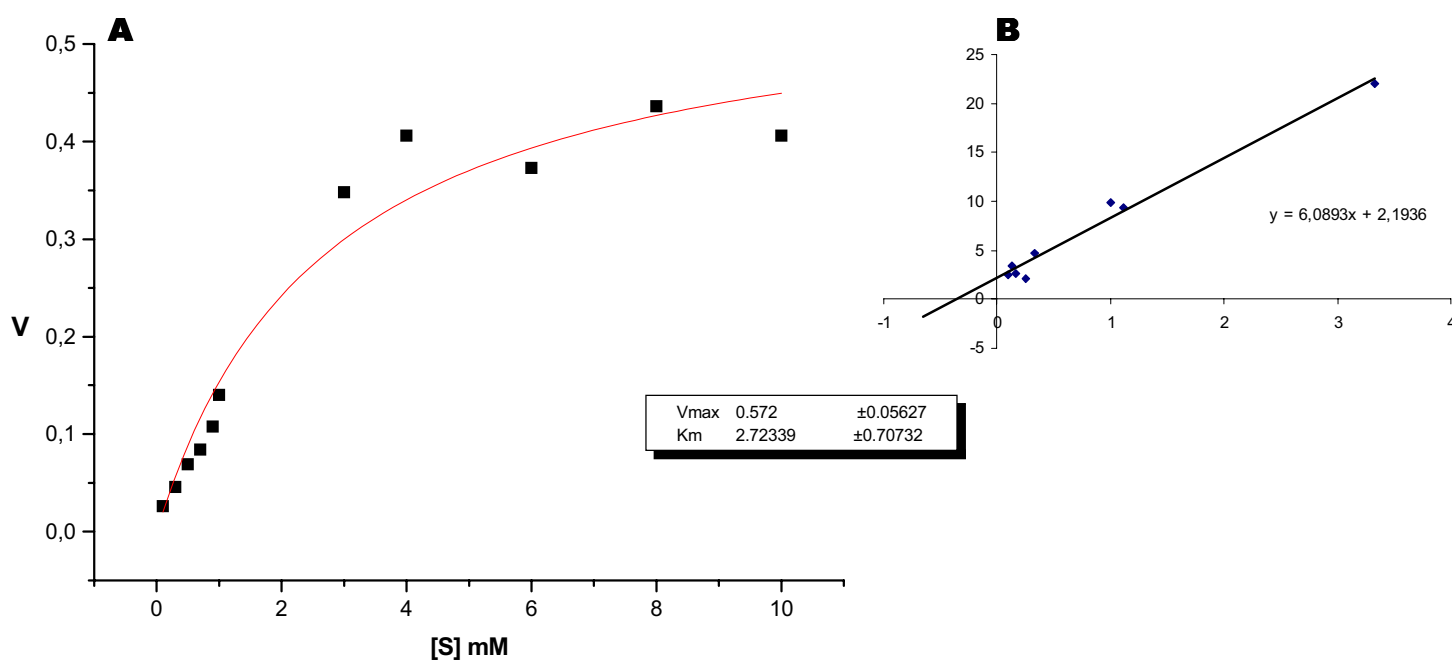


Figura 13: **A.** Determinação do K_m e da $V_{m\acute{a}x}$ na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo. **B.** Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, 1934. A enzima foi incubada com o substrato p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo em diferentes concentrações (0,1 – 10 mM), durante 1 hora a 37°C.

4.4.2. Influência da concentração da β -N-Acetilhexosaminidase na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Observando a figura 14, notamos que há uma estreita correlação entre as quantidades da enzima e de p-nitrofenolato liberados, indicando que há uma proporcionalidade direta entre os dois parâmetros.

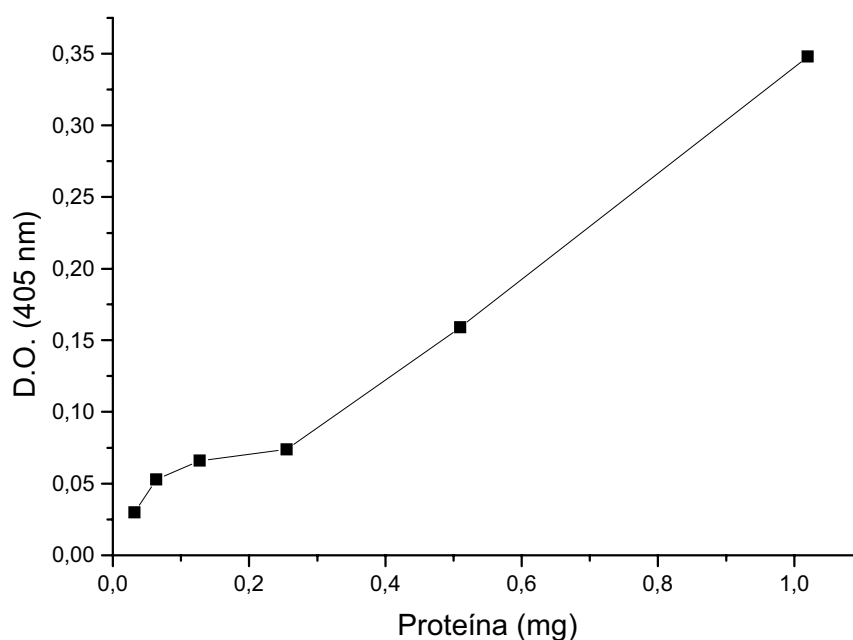


Figura 14: Efeito da concentração protéica na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo. Diferentes concentrações da β -N-acetilhexosaminidase foram incubadas com o substrato p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.3. Influência da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Ao observarmos a figura 15, percebemos que a velocidade da β -N-Acetilhexosaminidásica aumenta até 60°C, após isso, decresce rapidamente até se extinguir numa temperatura de 80°C.

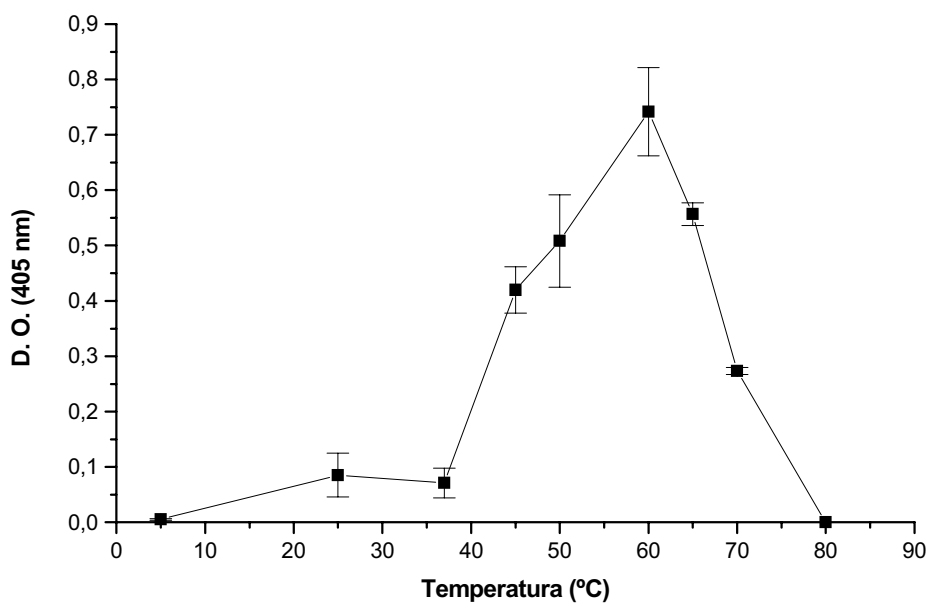


Figura 15: Efeito da temperatura na hidrólise do p-nitrofenil- β -D-glicosaminídeo.

A enzima β -N-acetilhexosaminidase foi incubada com o substrato em diferentes temperaturas. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

Após pré-incubações a diferentes temperaturas, foi observado, na figura 16, que a atividade residual da β -N-Acetilhexosaminidase apresentou-se estável até 60°C e, a 70°C, perde 80% da atividade.

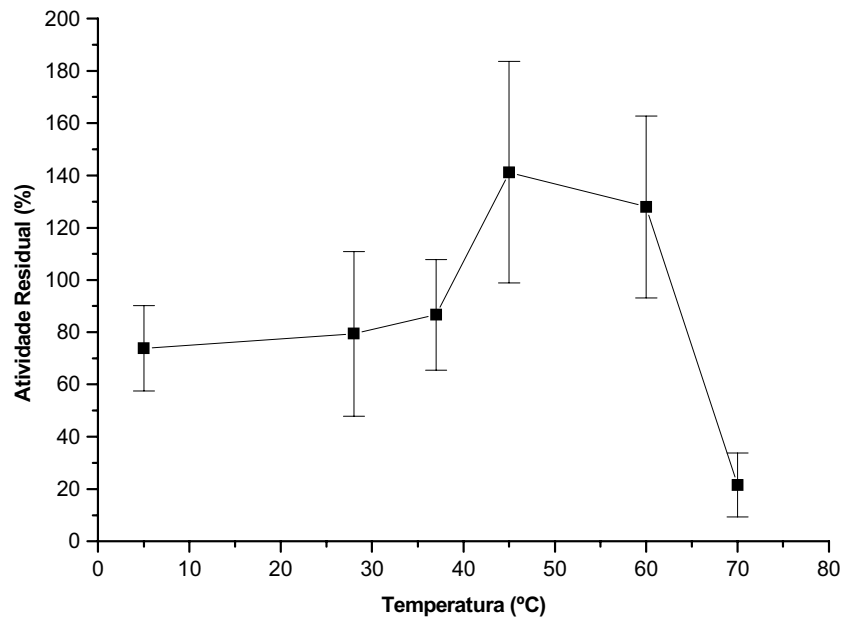


Figura 16: Estabilidade térmica da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica. Pré-incubações a 5, 28, 37, 45, 60 e 70°C foram realizadas com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo durante 15 minutos e, em seguida, foram procedidos ensaios a 37°C durante 1 hora. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

Ao analisarmos a figura 17, infere-se que a β -N-Acetilhexosaminidase é bastante resistente a uma temperatura de 37°C até 320 minutos, permanecendo praticamente estável, não desnaturando facilmente.

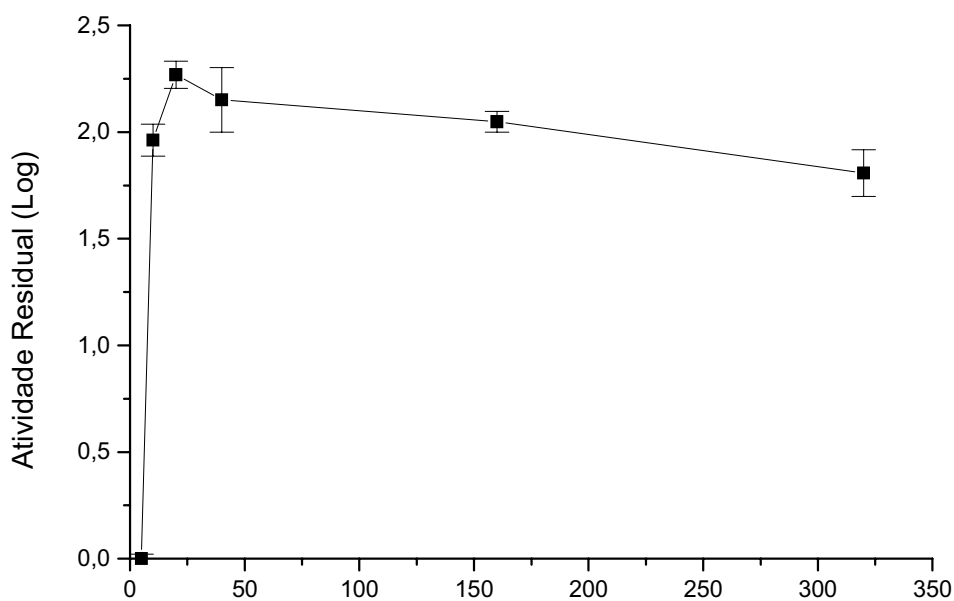


Figura 17: Desnaturação térmica da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica. Pré-incubações da enzima a 37°C foram realizadas em diferentes tempos: 5, 10, 20, 40, 160 e 320 minutos. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.4. Influência do pH na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Como mostrado na figura 18, a β -N-Acetilhexosaminidase apresenta uma atividade máxima no pH 5,0, e após isso, decresce até não ser mais detectável.

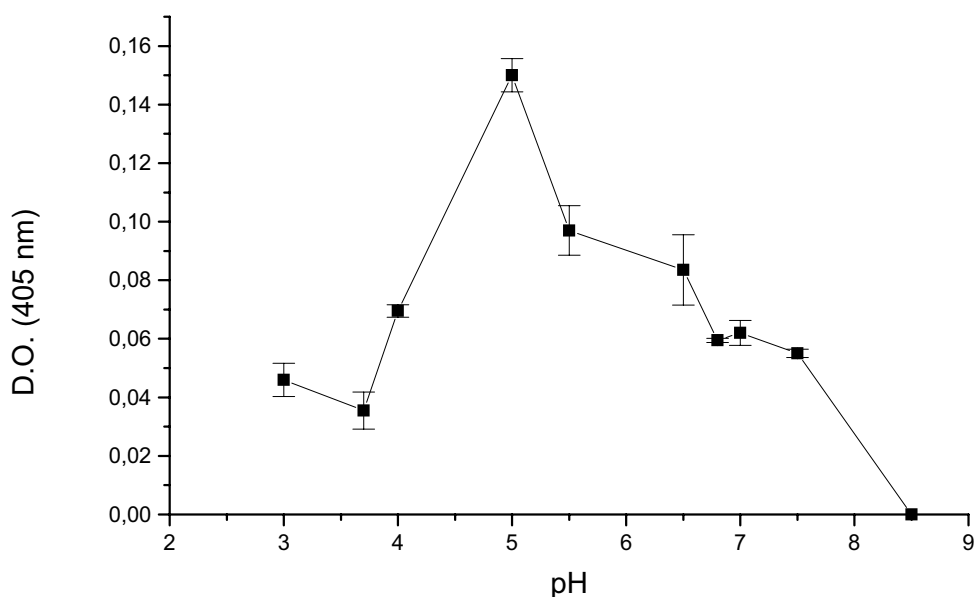


Figura 18: Efeito do pH na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica. A enzima foi incubada com o substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo em diferentes pHs a 37°C, por 1 hora, sendo utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 0,1 M pHs 3,0, 3,7, 4,0, 5,0 e 5,5; fosfato de sódio 0,1 M pHs 6,5 e 6,8 e tris-HCl 0,1 M pHs 7,0, 7,5 e 8,5. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.5. Influência do tempo na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

O efeito do tempo sobre a β -N-Acetilhexosaminidase revela que a atividade enzimática aumenta até 3,5 horas e, a partir daí estabiliza-se (Figura 19). Este fenômeno deve-se provavelmente a: 1 - perda da atividade catalítica da enzima por desnaturação, 2 - falta de substrato ou 3 - alta concentração de produto no ensaio. De acordo com o coeficiente de extinção molar do substrato ($12,4 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$), a quantidade deste no experimento (3 mM) e nossos resultados, estas duas últimas possibilidades não são possíveis.

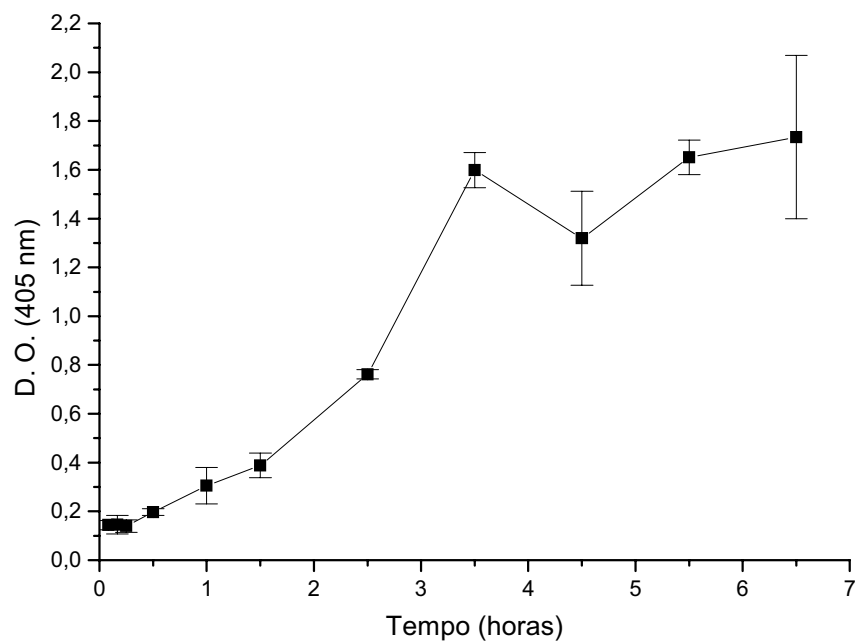


Figura 19: Efeito do tempo sobre a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica. A β -N-acetilhexosaminidase foi incubada em diferentes tempos (5, 10, 15, 30 minutos, 1, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 horas) a 37°C. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.6. Efeito de sais na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

Diversos sais atuaram potencializando ou inibindo a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2**Efeito de sais na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica**

Sais Inorgânicos	Atividade Residual (%)
ZnSO ₄	130,3
CaCl ₂	121,9
BaCl ₂	121,7
LiCl	119,7
Na ₂ H ₂ PO ₄	119,7
NaH ₂ PO ₄	117,2
AgNO ₃	115,4
CuSO ₄	112,9
Na ₂ S ₂ O ₃	90,68
HgCl ₂	30,1
SDS	21,3
Controle	100

A enzima foi incubada com o substrato p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo na presença de concentrações finais de: 1 mM de sulfato de zinco (ZnSO₄), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de bário (BaCl₂), cloreto de lítio (LiCl), fosfato de sódio dibásico (Na₂H₂PO₄), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), selenato de sódio (Na₂SeO₄), nitrato de prata (AgNO₃), sulfato de cobre (CuSO₄), tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), cloreto de mercúrio (HgCl₂) e dodecil sulfato de sódio (SDS). As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.7. Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo

A participação de grupamentos envolvidos na catálise da β -N-Acetilhexosaminidase foi testada numa concentração de 1 mM. Como

mostrado na tabela 3, nenhum influenciou a ação da enzima sobre o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo.

Tabela 3

Influência de grupos catalíticos na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica

Grupo Catalítico	Atividade Residual (%)
PMSF	174,22
Dicetona-2,4-Pentanodiona	154,88
N-etilmaleimida	137,63
Dietilpirocarbonato	136,76
Iodoacetamida	102,09
Controle	100

Pré-incubações foram realizadas com a β -N-Acetilhexosaminidase a 37°C, durante 15 minutos, na presença de 1 mM final de vários compostos que inibem especificamente radicais aminoacídicos. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

4.4.8. Teste de especificidade enzimática com carboidratos

Para analisar a especificidade da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica, diversos carboidratos numa concentração de 4,5 mM foram ensaiados com a enzima e com o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo. Foi percebido nas tabelas 4 e 5, que todos os carboidratos testados não interferiram na atividade da β -N-Acetilhexosaminidase sobre o substrato sintético.

Tabela 4Efeito de mono- e dissacarídeos na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica

Mono e dissacarídeos	Atividade Residual (%)
Galactose	180,4
Lactose	170,7
<i>Ácido glucurônico</i>	165,1
Glicose	164,2
Frutose	157,7
Maltose	156,3
Sacarose	143,7
N-acetilglucosamina	138,3
N-acetilgalactosamina	109,2
Controle	100

A enzima foi incubada com monossacarídeos e dissacarídeos (galactose, lactose, ácido glucurônico, glicose, frutose, maltose, sacarose, N-Acetilglucosamina, N-Acetilgalactosamina) em concentrações finais equimolares ao p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo (final 3 mM) durante 1 hora a 37°C. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

Tabela 5

Efeito de polissacarídeos na atividade β -N-Acetilhexosaminidásica

<i>Polissacarídeos</i>	Atividade Residual (%)
Heparina	150,9
Condroitim-6-sulfato	159,5
<i>Fuoidan</i>	111,7
Controle	100

A enzima foi incubada com polissacarídeos (condroitim 6-sulfato, heparina e fuoidan) em concentrações finais de 4,5 mM durante 1 hora a 37°C. As reações foram interrompidas com hidróxido de sódio 0,25 N e o p-nitrofenol lido a 405 nm em espectrofotômetro, como descrito em materiais e métodos.

5. DISCUSSÃO

Atividades glicosidásicas foram identificadas nos extratos hepáticos de *Sotalia fluviatilis*, e as que apresentaram maior atividade foram: β -N-Acetilgalactosaminidásica e β -N-Acetilglucosaminidásica. Esse resultado corrobora com o trabalho descrito por SCIGELOVA, (1999), onde foi demonstrada a presença da atividade β -N-Acetilglucosaminidásica em extratos hepáticos de porco. E reafirmando, o que já foi mencionado, o atual trabalho pretende utilizar ferramentas bioquímicas para propiciar o melhor entendimento de uma espécie de mamífero marinho, *S. fluviatilis*, classificada como “insuficientemente conhecida” pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Adicionalmente, tal atividade foi também observada em muitos trabalhos de nosso grupo de estudo com organismos marinhos, tais como: *Aplysia cervina* (MATTA & ABREU, 2005), *Artemia franciscana* (AQUINO, 2004), *Palythoa caribaeorum* (SOUZA, 2003), *Palythoa variabilis* (FERREIRA, 2003), *Strombus goliath* (ARAÚJO, 2002), *Chiton sp* (VIEIRA, 2002), *Tagelus gibbus* (ABREU, 1999).

A enzima β -N-Acetilglucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) foi reclassificada para β -N-Acetilhexosaminidase (E.C. 3.2.1.52). Essa mudança deveu-se ao fato dela agir em N-Acetilglucosídeos e N-Acetilgalactosídeos, apresentando especificidade em relação a esses açúcares (CABEZAS, 1989). Fato esse que pode explicar a constante coeluição das duas atividades aqui estudadas.

Foi observado que a β -N-Acetilhexosaminidase aqui estudada apresenta massa molecular em torno de 10 kDa. De acordo com a literatura, as glicosidases, geralmente, apresentam massas moleculares maiores, como no

caso de uma β -D-manosidase de *Aplysia fasciata* com massa molecular de 130 kDa (ANDREOTTI, 2005) e uma β -N-Acetilglucosaminidase de *Euphasia suberba* com massa molecular de 150 kDa (PETERS, 1998). No entanto, poucos resultados são descritos para glicosidases com massas moleculares próximas a 20 kDa. Sendo relatado, por exemplo, uma glicosidase xilanólítica de *Aspergillus niger* com massa molecular de 21 kDa (KRISANA, 2005), e uma celulase proveniente de *Mytilus edulis* exibindo massa molecular de 19,7 kDa (XU, 2000). Diante do exposto, é plausível sugerir que a β -N-Acetilhexosaminidase aqui estudada, seria um caso inédito quanto a glicosidases de baixa massa molecular.

O protocolo de purificação aqui apresentado utilizou cinco passos cromatográficos e não-cromatográficos, estando de acordo com os procedimentos utilizados na purificação de β -D-manosidase extraída do molusco *Aplysia fasciata* (ANDREOTTI, 2005), duas endo- β -1,4-glucanases obtidas do molusco *Ampullaria crossean* (LI, 2005 (a)), uma α -amilase do microorganismo *Bacillus subtilis* (NAJAFI, 2005), indicando que, independente do organismo, as propriedades das enzimas purificadas são semelhantes.

Ao término do processo de purificação, foram obtidos 1,12 mg da β -N-acetilhexosaminidase, tendo-se partido de 5096,00 mg de proteínas do extrato bruto, exibindo um índice de purificação de 2232 vezes. Resultado similar foi observado na literatura, para o processo de purificação de uma amilase de *Streptomyces sp.*, com um índice de 2130 vezes. Por outro lado, uma baixa recuperação foi observada (8,4%), sugerindo que, apesar de uma purificação satisfatória, a massa protéica obtida foi baixa. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DUO-CHUAN, 2005 com relação à purificação de

quitinases do fungo *Talaromyces flavus*, e também, aos encontrados para uma β -Hexosaminidase de *Capsicum annuum* (JAGADEESH, 2002), onde foram obtidos valores de 9,0% e 9,7%, respectivamente. Com isso, ficou demonstrado que essas variáveis são, geralmente, inversamente proporcionais, como descrito no artigo de BIRGISSON, (2004), onde uma α -L-arabinofuranosidase proveniente de uma bactéria termofílica foi purificada com uma recuperação de 54% e um índice de purificação de apenas 53 vezes.

A enzima caracterizada exibiu uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de 2,72 mM. Valores similares foram também observados para β -D-manosidase de *Aplysia fasciata* que apresentou um K_m de 2,4 mM (ANDREOTTI, 2005), α -amilase de *Bacillus subtilis* exibindo um K_m de 3,3 mM (NAJAFI, 2005), α -manosidase de *Drosophila melanogaster* com um K_m de 2,52 mM (CATTANEO, 2002), demonstrando que essas enzimas possuem afinidade por seus respectivos substratos. Já em relação à velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), foi exibido um valor de 0,572 nmol/mg/min, que também é encontrado para β -hexosaminidase de *Drosophila melanogaster* com uma velocidade máxima de 0,52 nmol/mg/min (CATTANEO, 2002). Isto veio a demonstrar que, geralmente, são requeridas quantidades de substrato maiores para saturar os sítios ativos das glicosidases.

A β -N-Acetilhexosaminidase apresentou maior atividade no pH 5,0, relacionando-se com as atividades exibidas para as enzimas endo-1,4- β -xilanasase de *Aspergillus niger* (KRISANA, 2005), α -glucosidase de sementes de milho (YAMASAKI, 2005) e glucoamilase de um *Bacillus sp.* termofílica (GILL, 2004). Estes resultados demonstram que, em organismos tão diferentes, desde bactérias até mamíferos, glicosidases exibem, *in vitro*, pHs ótimos coincidentes,

fato esse que pode indicar uma preservação dessa atividade durante a evolução.

Em relação à temperatura, a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica de *S. fluviatilis*, *in vitro*, exibiu uma atividade elevada em 60°C, semelhante aos resultados obtidos para as enzimas α -D-manosidase de *Aspergillus phoenicis* (ATHANASOPOULOS, 2005), α -glucosidase de sementes de milho (YAMASAKI, 2005) e β -N-Acetilglucosaminidase de *Trichoderma harzianum* (DE MARCO, 2004). Ao ser testada a estabilidade térmica da atividade β -N-Acetilhexosaminidásica, notou-se que a mesma permaneceu estável até 60°C. Este resultado está em concordância com dados da literatura para quitinase de *Amycolatopsis orientalis* (MURATA, 2005), quitinase extraída de sementes de *Phaseolus mungo* (YE, 2005), demonstrando que, de alguma forma, o substrato estabiliza a atividade enzimática.

No caso dos ensaios cinéticos utilizando sais, foi observado, assim como no caso da β -N-Acetilhexosaminidase aqui estudada (69,9%, numa concentração final de 1mM), que o cloreto de mercúrio pode apresentar forte inibição para glicosidases; corroborando com os trabalhos de DEY, (2002) e JIN, (2002), onde uma amilase de *Bacillus circulans* foi totalmente inibida (100%) por esse sal numa concentração de 10 mM e uma β -N-Acetilhexosaminidase de *Oryza sativa* apresentou grande redução em sua atividade residual, 91,6%, numa concentração de 1mM, e 100%, numa concentração de 10 mM, respectivamente. Além disso, foi observado que a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica foi fortemente inibida em cerca de 80% pelo dodecil sulfato de sódio, assim como no artigo de LI, (2001), onde isoformas purificadas de β -galactosidases de *Vigna radiata* exibiram também

uma forte inibição, variando de 93,4 a 98,5%, com este sal. Nesse caso, foi observado que o SDS ligou-se aos sítios ativos das enzimas competindo com o substrato e, por conseqüência, diminuindo sua atividade.

A especificidade da β -N-Acetilhexosaminidase foi estudada utilizando-se diversos carboidratos, tanto monossacarídeos e dissacarídeos como polissacarídeos. Foi observado que nenhum participou na degradação do p-nitrofenil N-acetil- β -D-glicosaminídeo, revelando uma inespecificidade desses compostos em relação à enzima em estudo. E quanto aos grupamentos catalíticos testados, também foi observada uma não-participação na atividade enzimática, uma vez que não houve inibição da β -N-Acetilhexosaminidase aqui estudada.

A partir desse estudo, temos a perspectiva de ser obtido o sequenciamento da enzima em questão, para futuras pesquisas nos campos evolutivo e filogenético.

6. CONCLUSÕES

- A atividade degradativa sobre o p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo, nos extratos hepáticos do mamífero marinho *Sotalia fluviatilis*, indicou a presença de glicosidases nesse tecido. A β -N-Acetilhexosaminidase foi a enzima que demonstrou melhor atividade específica para os p-nitrofenis testados.
- A β -N-Acetilhexosaminidase extraída do fígado de *Sotalia fluviatilis* foi purificada 2232 vezes com recuperação final de 8,4%.
- A β -N-Acetilhexosaminidase caracterizada nesse trabalho possui massa molecular de 10 kDa, estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida e confirmada pela espectrometria de massa em MALDI-TOF.
- A β -N-Acetilhexosaminidase apresentou uma constante de Michaelis-Menten de 2,72 mM e uma velocidade máxima de 0,572 unidades de absorvância a 405 nm/hora.
- A atividade β -N-Acetilhexosaminidásica exibiu velocidade excelente em pH 5,0 e 60°C, com uma boa estabilidade até 45 °C e não desnaturando facilmente em 37°C.

- A β -N-Acetilhexosaminidase mostrou sua atividade potencializada com a maioria dos sais testados. A enzima foi inibida pelo cloreto de mercúrio e dodecil sulfato de sódio, com inibições de 69,9% e 78,7%, respectivamente.
- O efeito de grupos catalíticos e carboidratos sobre a atividade β -N-Acetilhexosaminidásica foi testado e foi visto que todos os compostos utilizados não interferiram na atividade degradativa do p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-glicosaminídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.R.D. **Purificação e caracterização de uma sulfatase do molusco *Tagellus gibbus*, envolvida no metabolismo de glicosaminoglicanos.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (1999) Tese de Doutorado.

ANDREOTTI, G., GIORDANO, A., TRAMICE, A., MOLLO, E., TRINCONE, A. **Purification and characterization of a β -D-mannosidase from the marine anaspidean *Aplysia fasciata*.** Journal of Biotechnology 119 (2005) 26–35.

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

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

ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. **The production, purification and characterization of two novel α -D-mannosidases from *Aspergillus phoenicis*.** Carbohydrate Research 340 (2005) 609–617.

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 339 (2004), 3, 469-476 (8).

BIRGISSON, H. *et al.* **A new thermostable α -L-arabinofuranosidase from a novel thermophilic Bacterium.** *Biotechnology Letters* 26 (2004) 1347–1351.

Boto cinza – Sotalia fluviatilis,
<http://www.geocities.com/maquaticos/tucuxi.htm>, consultado no dia 05.01.2005.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding.** *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

BRUINS M. E., STRUBEL M., VAN LIESHOUT J. F. T., JANSSEN A. E. M., BOOM R. M. **Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: kinetics and modelling.** *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003), Issue 1, 3-11.

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

CARVALHO, C.T. 1961. ***Stenodelphis blainvillei* na costa meridional do Brasil, com notas osteológicas (Cetacea, Platanistidae)**. Revista Brasileira de Biologia, 21 (1961), n° 4, 443-454.

CATTANEO, F., OGISO, M., HOSHI, M., PEROTTI, M.-E., PASINI, M. E. **Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa**. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32 (2002) 929–941.

CAZy – **Carbohydrate-Active enZYmes**, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>, consultado no dia 23.11.2005.

CHANG, C.T., YOUNG, F.P., CHANG, M.H., SUNG, H.Y. **Purification and properties of β -N-acetylhexosaminidase from cabbage**. Biochem. Mol. Biol. Int 45 (1998) 371–380.

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 pernicios*a**. Appl Microbiol Biotechnol 64 (2004) 70–75.

DEY, G., PALIT, S., BANERJEE, R., MAITI, B. R. J. **Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313**, Ind. Microbiol. Biotechnol. 28 (2002) 193–200.

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

DUO-CHUAN, L. I., CHEN, S., JING, L. U. **Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*.** Mycopathologia 159 (2005) 223–229.

ESKO, J. D. **Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism.** Curr. Opin. Cell. Biol. 3 (1991) 805.

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

FRY, S. C. **Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46 (1995) 497–520.

FUJITA, K., MIYAMURA, T., SANO, M., KATO, I., TAKEGAWA, K. **Transfer of High-Mannose-Type Oligosaccharides to Disaccharides by Endo- β -N-Acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae*.** Journal of Bioscience and Bioengineering. 93 (2002), No. 6, 610-617.

GEISE, L. **Estrutura social, comportamental e *Sotalia sp.* (Gray, 1886) (Cetacea, Delphinidae) na região estuarino-lagunar de Cananéia, SP e na Baía de Guanabara, RJ.** Universidade de São Paulo (1989) Dissertação de Mestrado.

GILL, R. K., KAUR, J. **A thermostable glucoamylase from a thermophilic *Bacillus sp.*: characterization and thermostability.** J Ind Microbiol Biotechnol 31 (2004) 540–543.

HANDEL, T. M., JOHNSON, Z., CROWN, S. E., LAU, E. K., SWEENEY, M., PROUDFOOT, A. E. **Regulation of Protein Function by Glycosaminoglycans – as exemplified by chemocines.** Annu. Rev. Biochem. 74 (2005) 385–410.

HORSCH, M. *et al.* **β -N-Acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents.** Pharmacol. Ther. 76 (1997) 187-218.

JAGADEESH, B. H., PRABHA, T. N. **β -Hexosaminidase, an enzyme from ripening bell capsicum (*Capsicum annuum* var. *variata*).** Phytochemistry 61 (2002) 295–300.

JIN, Y. L., JO, Y. Y., KIM, K. Y., SHIM, J. H., KIM, Y. W., PARK, R. D. **Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from rice seeds.** J Biochem Mol Biol. 35 (2002), N° 3, 313-319.

KANEKO, T., OHNO, T., OHISA, N. **Purification and Characterization of a Thermostable Raw Starch Digesting Amylase from a Streptomyces sp. Isolated in a Milling Factory.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (2005), N° 6, 1073-1081.

KARAMANOS, Y. **Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase and their potential substrates: structure/function relationships.** Res. Microbiol., 148 (1997) 661-671.

KATO, T.; SHIZURI, Y.; IZUMIDA, H.; YOKOYAMA, A. & ENDO, M. **Stylotuanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylotella Aurantium*.** Tetrahedron Letters 36 (1995) 2133-2136.

KATO, T., FUJITA, K., TAKEUCHI, M., KOBAYASHI, K., NATSUKA, S., IKURA, K., KUMAGAI, H., YAMAMOTO, K. **Identification of an endo- β -N-acetylglucosaminidase gene in *Caenorhabditis elegans* and its expression in *Escherichia coli*.** Glycobiology. 12 (2002), N° 10, 581–587.

KOIDE, N., MURAMATSU, T. **Endo- β -N-acetylglucosaminidase acting on carbohydrate moieties of glycoproteins. Purification and properties of the enzyme from *Diplococcus pneumoniae*.** J. Biol. Chem. 249 (1974) 4897–4904.

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

KRISANA, A., RUTCHADAPORN, S., JARUPAN, G., LILY, E., SUTIPA, T., KANYAWIM, K. **Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation.** J Biochem Mol Biol. 38 (2005) 17-23.

KUNITO, T. et. al. **Concentration and subcellular distribution of trace elements in liver of small cetaceans incidentally caught along the Brazilian coast.** Marine Pollution Bulletin 49 (2004) 574–587.

LI, S-C.; HAN, J-W.; CHEN, K-C.; CHEN, C-S. **Purification and characterization of isoforms of β -galactosidases in mung bean seedlings.** Phytochemistry 57 (2001) 349–359.

LI, Y-H. et. al. (a) **Purification and Characterization of Two Endo- β -1,4-glucanases from Mollusca, *Ampullaria crossean*.** Acta Biochimica et Biophysica Sinica 37 (2005), N° 10, 702-708.

LI, Y-Y., JIANG, C-J., WAN, X-C., ZHANG, Z-Z., LI, D-X. (b) **Purification and Partial Characterization of β -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze).** Acta Biochimica et Biophysica Sinica 37 (2005), N° 6, 363-370.

MAHURAN, D. J. **β -Hexosaminidase: Biosynthesis and Processing of the Normal Enzyme, and Identification of Mutations Causing Jewish Tay-Sachs Disease.** Clinical Biochemistry 28 (1995), N° 2, 107-106.

MALEY, F. *et al.* **Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases.** *Anal. Biochem.*, 180 (1989) 195-204.

MATSUZAWA, F., AIKAWA, S., DOI, H., OKUMIYA, T., SAKURABA, H. **Fabry disease: correlation between structural changes in α -galactosidase, and clinical and biochemical phenotypes.** *Hum Genet* 117 (2005) 317–328.

MATTA, L. D. M. & ABREU, L. R. D. **Glicosidases e sulfatases no molusco marinho *Aplysia cervina*.** *Arq. Inst. Biol.* 72 (2005), N° 2, 205-210.

MAYER-SONNENFELD, T., ZEIGLER, M., HALIMI, M., DAYAN, Y., HERZOG, C., LASMEZAS, C. I., GABIZON, R. **The metabolism of glycosaminoglycans is impaired in prion diseases.** *Neurobiology of Disease* 20 (2005) 738 – 743.

MONTEIRO-FILHO, E.L.A. 1991. **Comportamento de caça e repertório sonoro do golfinho *Sotalia brasiliensis* (Cetacea: Delphinidae) na região de Cananéia, Estado de São Paulo.** Universidade de São Paulo (1991) Tese de Doutorado.

MONTEIRO-NETO, C.; ITAVO, R. V.; MORAES, L. E. S. **Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceara, northeast Brazil.** *Environmental Pollution* 123 (2003) 319–324.

MURAMATSU, H., TACHIKUI, H., USHIDA, H., SONG, X., QIU, Y., YAMAMOTO, S., MURAMATSU, T. **Molecular cloning and expression of endo- β -Nacetylglucosaminidase D, which acts on the core structure of complex type asparagine-linked oligosaccharides.** J. Biochem. 129 (2001) 923–928.

MURATA, T. et. al. **Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetyllactosamine-repeating unit releasing activity.** Biochemical and Biophysical Research Communications 336 (2005) 514–520.

MUZZARELLI, R. A. **Analytical biochemistry and clinical significance of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and related enzymes.** EXS. 87 (1999) 235-247.

NADER, H. B., DIETRICH, C. P. **Natural occurrence and possible biological role of heparin.** In: Heparin: Chemical and biological properties, clinical applications. London, Edward Arnold Publishers (1989) 81-96.

NAJAFI, M. F., DEOBAGKAR, D., DEOBAGKAR, D. **Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20.** Protein Expression and Purification 41 (2005) 349–354.

NIIMI, K.; SHEPHERD, M.G.; CANNON, R.D. **Distinguishing *Candida* Species by β -N-acetylhexosaminidase activity.** Journal of Clinical Microbiology 39 (2001) 2089-2097.

OGAWA, M., KITAGAWA, M., TANAKA, H., UEDA, K., WATSUJI, T., BEPPU, T., KONDO, A., KAWACHI, R., OKU, T., NISHIO, T. **A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene cloning, overexpression, purification and characterization.** Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 457–464.

PETERS, G.; SABOROWSKI, R.; MENTLEIN, R. & BUCHHOLZ. **Isoforms of an N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the Antarctic Krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production.** Comparative Biochemistry and Physiology 120B (1998) 743-751.

PONTOH, J., LOW, N. H. **Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*).** Insect Biochemistry and Molecular Biology 32 (2002) 679–690.

PUCHART, V., VRSANSKÁ, M., SVOBODA, P., POHL, J., OGEL, Z. B., BIELY, P. **Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749).** Biochimica et Biophysica Acta 1674 (2004) 239– 250.

REEVES, R.R.; LEATHERWOOD, S. **Dolphins, porpoises and whales: 1994-1998. Action plan for the conservation of cetaceans.** IUCN, Gland (1994).

ROER, R. D., HALBROOK, K. E., SHAFER, T. H. **Glycosidase activity in the post-ecdysial cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*.** *Ž. Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128 (2001) 683-690.

ROSTAND, K.S. & ESKO, J.D. **Microbial adherence to and invasion through proteoglycans.** *Infect. Immun.*, 65 (1997) 1-8.

ROSAS, F.C.W. 2000. **Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Delphinidae e Pontoporiidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil.** Universidade Federal do Paraná, Brasil (2000) Tese de Doutorado.

SANTOS, M.C.O. **Novas informações sobre cetáceos no litoral sul de São Paulo e norte do Paraná com base em estudos sobre encalhes e na aplicação da técnica de foto-identificação individual de *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae).** Universidade de São Paulo (1999) Dissertação de Mestrado.

SANTOS, R. A.; HAIMOVICI, M. **Cephalopods in the diet of marine mammals stranded or incidentally caught along southeastern and southern Brazil (21-34°S).** *Fisheries Research* 52 (2001) 99 – 112.

SCHMIDTCHEN, A., FRICK, I., BJORCK, L. **Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin.** Mol. Microbiol. 39 (2001) 708-713.

SCHMIEGELOW, J.M.M. 1990. **Estudo sobre cetáceos odontocetes encontrados em praias da região entre Iguape (SP) e Baía de Paranaguá (PR) (24° 42' S – 25° 28' S) com especial referência a *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Delphinidae).** Universidade de São Paulo (1990) Dissertação de Mestrado.

SCIGELOVA, M.; SINGH, S; CROUT, D. H.G. **Glycosidases - a great synthetic tool.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 6 (1999) 483 - 494.

SHAO, W., WIEGEL, J. **Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*.** J. Bacteriol. 174 (1992) 5848-5853.

SILVA, V.M.F.; BEST, R.C. Tucuxi. *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853). In: RIDGWAY, S.H.; HARRISON, R.J. (Eds). **Handbook of marine mammals. Volume 5: the first book of dolphins.** Academic Press, London, United Kingdom (1994) 43-69.

SILVA, V.M.F.; BEST, R.C. 1996. *Sotalia fluviatilis*. **Mammalian Species.** 527 (1996) 1-7.

SOBRINHO, I. S. J., BATAUS, L. A. M., MAITAN, V. R., ULHOA, C. J. **Purification and properties of an N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces cerradoensis***. *Biotechnology Letters* 27 (2005) 1273–1276.

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

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

TAIRA, T., TOMA, N., ISHIHARA, M. **Purification, Characterization, and Antifungal Activity of Chitinases from Pineapple (*Ananas comosus*) Leaf**. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005), N° 1, 189-196.

TARENTINO, A. L., MALEY, F. **Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus***. *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 811–817.

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

VOLPI, N. & MACCARI, F. **Glycosaminoglycan Composition of the Large Freshwater Mollusc Bivalve *Anodonta anodonta***. *Biomacromolecules* 6 (2005) 3174-3180.

WEIGNEROVÁ, L., VAVRUSKOVÁ, P., PISVEJCOVÁ, A., THIEM, J., KREN, V. **Fungal β -N-acetylhexosaminidases with high β -N-acetylgalactosaminidase activity and their use for synthesis of β -GalNAc-containing oligosaccharides**. *Carbohydrate Research* 338 (2003) 1003–1008.

WOO, K. K., MIYAZAKI, M., HARA, S., KIMURA, M., KIMURA, Y. **Purification and Characterization of a Co(II)-Sensitive α -Mannosidase from *Ginkgo biloba* Seeds**. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 2547-2556.

XU, B., HELLMAN, U., ERSSON, B., JANSON, J. **Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis***. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4970-4977.

YAMAGISHI, K., SUZUKI, K., IMAI, K., MOCHIZUKI, H., MORIKAWA, K., KYOGASHIMA, M., KIMATA, K., WATANABE, H. **Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Novel Keratan Sulfate Hydrolase, Endo- β -N-acetylglucosaminidase, from *Bacillus circulans***. *The Journal of Biological Chemistry* 28 (2003) 25766-25772.

YAMASAKI, Y., FUJIMOTO, M., KARIYA, J., KONNO, H. **Purification and characterization of an α -glucosidase from germinating millet seeds.** *Phytochemistry* 66 (2005) 851–857.

YAOI, K. & MITSUISHI, Y. **Purification, Characterization, Cloning, and Expression of a Novel Xyloglucan-specific Glycosidase, Oligoxyloglucan Reducing End-specific Cellobiohydrolase.** *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002), N° 50, 48276-48281.

YE, X. & NG, T. B. **A chitinase with antifungal activity from the mung bean.** *Protein Expression and Purification* 40 (2005) 230–236.

YOGUI, G.T. 2002. **Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica).** Universidade de São Paulo (2002) Dissertação de Mestrado.

YOGUI, G. T.; SANTOS, M. C. O.; MONTONE, R. C. **Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananeia estuary, southeastern Brazil.** *The Science of the Total Environment* 312 (2003) 67–78.

ZANOELO, F. F., POLIZELI, M. L. T. M., TEREZI, H. F., JORGE, J. A. **β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose.** FEMS Microbiology Letters 240 (2004) 137–143.

ZHANG, M.; HAGA, A.; SEKIGUCHI, H. & HIRANO, S. **Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia.** International Journal of Biological Macromolecules 27 (2000) 99-105.