

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

BÁRBARA MARIA SANTANO CHALCOSKI

**HIDROLASES DO SUCO DIGESTIVO DO MOLUSCO-PRAGA
*Achatina fulica***

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2018

BÁRBARA MARIA SANTANO CHALCOSKI

HIDROLASES DO SUCO DIGESTIVO DO MOLUSCO-PRAGA

Achatina fulica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

HYDROLASES FROM THE DIGESTIVE JUICE OF THE SNAIL-PLAGUE

Achatina fulica

CURITIBA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C436h Chalcoski, Bárbara Maria Santano
2018 Hidrolases do suco digestivo do molusco-praga Achatina
fulica / Bárbara Maria Santano Chalcoski.-- 2018.
93 f: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.
Texto em português com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2018.
Bibliografia: p. 75-84

1. Caramujo gigante africano. 2. Enzimas. 3. Fosfatase
alcalina. 4. Tecnologia ambiental - Dissertações.
I. Fontana, José Domingos, orient. II. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação
em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba
|Bibliotecária Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 090

A Dissertação de Mestrado intitulada Hidrolases do suco digestivo do molusco-praga *Achatina fulica*, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Bárbara Maria Santano Chalcoski**, no dia 23 de fevereiro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). José Domingos Fontana- Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Couto –UTFPR

Prof(a). Dr(a). Rossana Calegari dos Santos –UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba 23 de fevereiro de 2018

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e coragem para enfrentar todos os obstáculos da minha vida.

A minha família, que sempre me apoiou nas minhas escolhas, principalmente a minha mãe Joseane que sempre esteve do meu lado nos momentos mais difíceis e ao meu pai Noraldo, que infelizmente não pode estar presente neste momento, mas com absoluta certeza está olhando por mim.

Ao meu orientador José Domingos Fontana, que foi o responsável por tornar esta pesquisa possível e me ajudou não só no meu desenvolvimento profissional, mas também pessoal.

Ao meu amor Caio que esteve presente e me apoiou nesse e em outros momentos difíceis na minha vida.

Aos meus colegas do LQBB/UTFPR Cibelle, Tatiana, Angélica, Leonardo e Rafael que tornaram o ambiente de trabalho mais alegre e me auxiliaram nas análises e em muitos outros aprendizados.

Aos colegas que fiz no PPGCTA que ficarão para vida toda.

A minha cachorrinha Jade, que é minha alegria quando eu chego em casa após um dia árduo de trabalho.

Aos professores Gustavo Henrique Couto e Rossana Calegari que se disponibilizaram a participar da banca.

Ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, bem como ao seu Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

A todos que participaram direta e indiretamente e contribuíram na conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin

RESUMO

CHALCOSKI. B. M. S. **Hidrolases do suco digestivo do molusco-praga *Achatina fulica***. 98 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Achatina fulica, popularmente denominado caramujo africano, é um molusco terrestre pulmonado que atualmente está na lista das 100 piores espécies invasoras do mundo, sendo encontrada em quase todos os continentes, causando desequilíbrio ambiental. O suco digestivo de *Achatina fulica* (SDAf) é uma fonte de enzimas muito atraente ao ponto de vista biotecnológico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o suco digestivo quanto a sua diversidade enzimática e induzir através de alimentação específica, a produção de enzimas de interesse, como exemplo a fosfatase alcalina, para posteriormente realizar a purificação da desta enzima pela metodologia de espumação, ou separação adsortiva por bolhas (“foaming”), comparadamente a outras técnicas conhecidas. As quantidades de proteínas totais dos SDAf foram determinadas por quatro métodos distintos Bradford, BCA, Biureto e Lowry, sendo o último, como padrão. Foram encontradas atividades frente aos substratos polissacarídicos amilopectina de arroz, arabana de maçã, arabinogalactana de café cereja, celulose bacteriana, celulose-Kfaft de *P. taeda*, goma guar, fitoglicogênio de milho, hemicelulose de bagaço de cana, inulina, paredes celulares de *Neurospora crassa*, pectina cítrica, pululana e xiloglucana de tamarindo. A indução alimentar dos indivíduos não proporcionou diferenças significativas nos níveis enzimáticos especificamente visados quando os substratos foram inulina ou pectina. Foram encontradas elevadas atividades enzimáticas correlatas a glicosidases do tipo dissacaridases frente aos substratos pNF-glucosídeos. Os maiores níveis de atividades específicas foram para β – Glucosidase, β – Glucuronidase e β – Galactosidase. O mesmo foi observado para uma enzima de maior valor comercial, a fosfatase alcalina (ALP). A hidrólise com o substrato P-nitrofenil-fosfato e, neste caso, o indutor inulina na dieta, favoreceu a secreção de maior atividade enzimática. A presença da ALP no SDAf foi confirmada através de um zimograma. A purificação para a ALP com as colunas de cromatografia de troca iônica e fracionamento por precipitação de sulfato de amônio não propiciaram bons resultados, o que foi logrado através de coluna de espumação (“foaming”). Em comparação com a enzima nativa, a inclusão de saponina a 0,25 mg/mL permitiu um enriquecimento na ordem de 19%.

Palavras chave: *Achatina fulica*. Caramujo africano. Enzimas. Fosfatase alcalina. Foaming.

ABSTRACT

CHALCOSKI.B. M. S. **HYDROLASES FROM THE DIGESTIVE JUICE OF THE SNAIL-PLAGUE *Achatina fulica***. 98 p. Dissertação. Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Achatina fulica, popularly known as the African snail, is a pulmonary terrestrial mollusc that is currently on the list of the 100 worst invasive species in the world, being found in almost all continents, causing environmental imbalance. The digestive juice of *Achatina fulica* is a very attractive source of enzymes from a biotechnological point of view. This work aimed to characterize the digestive juice (SDAf) as to its enzymatic diversity and to induce through specific feeding, the production of enzymes of interest, for example alkaline phosphatase, to later carry out the purification of this enzyme by the foaming methodology, or foaming adsorption, compared to other known techniques. Total protein amounts of SDAf were determined by four distinct methods Bradford, BCA, Biureto and Lowry, the latter being determined as standard. The following activities were found in relation to the polysaccharide substrates: rice amylopectin, apple arabana, cherry coffee arabinogalactan, bacterial cellulose, P. taeda cellulose-Kfaft, guar gum, corn phytoglycogen, bagasse hemicellulose, inulin, *Neurospora* cell walls citrus pectin, pullulan, tamarind xyloglucan. However, the dietary induction of the subjects did not provide significant differences in the enzymatic levels when the substrates were inulin or pectin. High enzymatic activities correlated with glycosidases of the disaccharidases type were found against the pNF-glucoside substrates. The highest levels of specific activities were for β - Glucosidase, β - Glucuronidase and β - Galactosidase. The same was observed for a commercially available enzyme, alkaline phosphatase (ALP), to hydrolyze with the substrate pNFF. The presence of ALP in the SDAf was confirmed by a zymogram. Purification for ALP with ion exchange chromatography columns and fractionation by ammonium sulfate precipitation did not provide good results, which was achieved through a foaming column. In comparison with the native enzyme, the inclusion of saponin at 0.25 mg / mL allowed for a 19% enrichment.

KEYWORDS: African Snail, Enzymes, Alkaline Phosphatase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) <i>Achatina fulica</i> b) Concha de <i>A. fulica</i>	19
Figura 2: Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase na degradação da estrutura da celulose	25
Figura 3: Modo de ação da inulinase.	27
Figura 4: Modo de ação de pectinases	30
Figura 5: Mecanismo de ação das xilanases.....	31
Figura 6: Ação das endo e exoamilases.	33
Figura 7: Esquema de purificação de proteínas pelo método de espumação.	37
Figura 8: (A) <i>Achatina fulica</i> (B) Sistema digestivo completo dissecado com partes identificadas. Ênfase em vermelho na glândula digestiva.....	39
Figura 9: REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO.....	42
Figura 10: Reação para determinação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico.	44
Figura 11: Parte do sistema digestório de uma galinha. As partes utilizadas estão indicadas pelas setas.	49
Figura 12: <i>Litopenaeus vanammei</i> utilizado no experimento. Seta indicando a região onde está localizado o hepatopâncreas (glândula digestiva).	51
Figura 13: Coluna de espumação de tamanho reduzido.	54
Figura 14: Grupo de <i>A. fulica</i> mantido em caixa plástica adaptada. Fonte: O autor.	56
Figura 15: Amostras dos sucos gastrointestinais dos <i>A. fulica</i> dos três grupos alimentados com diferentes indutores : Glicerofosfato, Inulina+pectina e controle, respectivamente.	57
Figura 16: Espectro UV-VIS do SDAf controle.	58
Figura 17: Espectro UV-VIS do SDAf Gli-P	58
Figura 18: Espectro UV-VIS do SDAf in/pect.....	58
Figura 19: CCD's ilustrando a ação enzimática do SDAf nos substratos polissacarídicos.....	65
Figura 20: CCD ilustrando a atividade enzimática do SDAf com o substrato PNFF.....	72
Figura 21: Eletroforese e zimograma em Cellogel. A) -> B) -> C) em ordem operacional. A) Fita de Cellogel sem corante. B) Zimograma com o substrato pNFF C) Revelado com o CBB.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enzimas encontradas no suco gastrointestinal do <i>Achatina fulica</i> .	22
Tabela 2: Definição dos grupos, alimentos que foram utilizados e enzimas de interesse.....	38
Tabela 3: COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS)	42
Tabela 4: Substratos para determinação de enzimas alvo.	46
Tabela 5: Substratos utilizados nas com hidrólises com SDAf, suas respectivas enzimas alvo e curvas de calibração utilizadas nos cálculos.	47
Tabela 6: Quantidades em µL colocadas nas amostras.	53
Tabela 7: Peso em gramas dos 3 grupos ao longo do experimento.	56
Tabela 8: Determinação de proteínas por diferentes métodos colorimétricos	59
Tabela 9: Concentração valores de açúcares redutores (µg.mL ⁻¹) liberados nos substratos em 24h. Expressos como média (± desvio padrão). Tukey/anova comparadas ao controle * P<0,05** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001	62
Tabela 10: Concentração valores de açúcares redutores (µg.mL ⁻¹) liberados nos substratos em 24h. Expressos como média (± desvio padrão). Tukey/anova comparadas ao controle * P<0,05** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,000	63
Tabela 11: Substratos e padrões numerados nas CCD's para determinação de atividade enzimática.	65
Tabela 12: Atividade enzimática pelo teste <i>P</i> -nitrofenil- glucosídeo. Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001	69
Tabela 13: Atividade específica pelo teste do <i>P</i> -nitrofenil- glucosídeo Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001.....	69
Tabela 14: Concentração de proteínas e atividade das amostras por mg de proteínas a partir do substrato PNFF. Entre parênteses desvio padrão. Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001	70
Tabela 15: Substratos e padrões numerados nas CCD's para determinação de atividade enzimática.	72
Tabela 16: Resultados do fracionamento por sulfato de amônio do SDAf, quantidade de mg/ mL de proteína, atividade enzimática e específica. Entre parênteses desvio padrão das replicatas.....	74
Tabela 17: Atividades específicas para as enzimas β-glucosidase e fosfatase alcalina. Tukey/anova comparadas aos SDAf controles * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001.	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade por mg de proteína do substrato pNFF nas frações eluídas com água e acetato de amônio nas colunas de troca iônica. Tukey/anova comparadas ao controle com água * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001.	73
Gráfico 2: Curva Analítica do método de Biureto.....	94
Gráfico 3: Curva Analítica do método de Bradford	94
Gráfico 4: Curva Analítica do método deLowry	94
Gráfico 5: Curva Analítica do método de BCA.....	95

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ABF	- Azul de bromofenol
A.GAL	- Ácido galacturônico
ALP	- Fosfatase alcalina
BCA	- Ácido bicinconínico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CEL	- Celulose
DNS	- Ácido dinitrosalicílico
EPI	- Equipamentos de proteção individual
FRU	- Frutose
GAL	- Galactose
Gli- P	- Grupo Glicerofosfato de sódio
GLU	- Glucose
HEMI	- Hemicelulose
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IN	- Inulina
Inu/Pect	- Grupo Inulina + Pectina
LOS	- Lamnooligosacarídeos
LQBB	- Laboratório de quimio/biotecnologia de biomassas
PECT	- Pectina
PMSF	- Fenil metil sulfonil fluoreto
PNF	- <i>P</i> -nitrofenil
pNFF	- <i>P</i> - nitrofenil- fosfato
SDAf	-SDAf Suco digestivo de <i>Achatina fulica</i>
SISBio	- Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
U	- Atividade enzimática
U/mg	- Atividade específica por mg de proteína
XC	- Xilenocianol

XIL

- Xilose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	<i>ACHATINA FULICA</i>	19
3.2	ENZIMAS	23
3.2.1	<i>Celulase</i>	24
3.2.2	<i>Inulinase</i>	27
3.2.3	<i>Pectinase</i>	29
3.2.4	<i>Xilanases</i>	31
3.2.5	<i>Amilase</i>	32
3.2.6	<i>Dissacaridases</i>	34
3.2.7	<i>Fosfatase alcalina</i>	34
3.3	PURIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE ESPUMAÇÃO (SEPARAÇÃO ADSORTIVA POR BOLHAS) OU “FOAMING”	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	COLETA, TRANSPORTE E MANUTENÇÃO DO <i>ACHATINA FULICA</i>	38
4.2	COLETA DAS ENZIMAS GÁSTRICAS.....	39
4.3	DESCARTE DO MATERIAL ORGÂNICO DO <i>A. FULICA</i>	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO SUCO DIGESTIVO.....	39
4.4.1	<i>Determinação de proteínas</i>	40
4.4.1.1	Biureto	40
4.4.1.2	Lowry (Folin-Ciocalteu)	40
4.4.1.3	Bradford	41
4.4.1.4	Ácido Bicinconínico (BCA)	41
4.4.2	<i>Determinação de açúcares</i>	42
4.4.2.1	Dns - DiNitroSalicilato para Açúcares Redutores	42
4.4.2.2	Fenol-sulfúrico para Açúcares Totais	43
4.4.3	<i>Análise UV-VIS</i>	45
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	45
4.5.1	<i>Teste P-nitrofenil-glicosídeos para Glicosidases / Disacaridases</i>	45
4.5.2	<i>Ensaio com Substratos Polissacarídicos</i>	47
4.5.3	<i>Cromatografia em camada delgada</i>	48
4.5.4	<i>Determinação de fosfatases alcalinas</i>	49
4.5.4.1	Preparação do intestino e moela de galinha.....	49
4.5.4.2	Preparação do leite de vaca.....	50

4.5.4.3	Preparação da amostra de hepatopâncreas de camarão	50
4.5.4.4	Preparação das amostras de SDAf	51
4.5.4.5	Método para determinação por pNFF	51
4.6	SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	52
4.7	FRACIONAMENTO POR FORÇA IÔNICA DE SULFATO DE AMÔNIO.....	52
4.8	SISTEMA DE PURIFICAÇÃO POR ESPUMAÇÃO (FOAMING).....	53
4.9	ELETROFORESE	54
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	59
5.2	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES	60
5.2.1	<i>Quantificação de açúcares redutores</i>	<i>61</i>
5.2.2	<i>Quantificação de açúcares totais</i>	<i>63</i>
5.2.3	<i>Análise por cromatografia em camada delgada</i>	<i>65</i>
5.3	TESTE P-NITROFENIL-GLICOSÍDEOS.....	66
5.4	DETERMINAÇÃO DE FOSFATASES ALCALINA	70
5.4.1	<i>Atividade da fosfatase alcalina entre as amostras</i>	<i>70</i>
5.4.2	<i>Separação por Cromatografia de troca iônica.....</i>	<i>72</i>
5.4.3	<i>Fracionamento por força iônica de sulfato de amônio.....</i>	<i>73</i>
5.4.4	<i>Purificação pela metodologia de espumação.....</i>	<i>74</i>
5.5	CARACTERIZAÇÃO POR ELETROFORESE	76
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

As invasões biológicas são consideradas a segunda maior causa da perda de biodiversidade, pois podem afetar negativamente ecossistemas, populações e comunidades de espécies nativas, além de alterar ciclos ecológicos (BYERS et al., 2002). O molusco terrestre *Achatina fulica*, conhecido popularmente como caramujo gigante africano, tornou-se uma espécie invasora pela sua adaptabilidade, fácil reprodução, resistência e por possuir hábitos alimentares bem generalistas COLLEY, EDUARDO; FISCHER (2011). Está listado como uma das 100 piores espécies invasoras do mundo de acordo com a base de dados *Global Invasive Species Database (GISD, 2015)* e é considerado pelo IBAMA como uma praga agrícola (NEVES, 2003). Originário do leste da África, *A. fulica* hoje é encontrado em quase todos os continentes (África, Américas, Leste e Sul da Ásia e Oceania) (RAUT; BARKER, 2002). Foi introduzido ilegalmente no Brasil em 1988 em uma feira de Curitiba por um produtor que visava sua comercialização como ‘escargot’, o que, no entanto, não obtiveram aceitação dos consumidores, com o agravante de liberação exemplares na natureza (COLLEY, EDUARDO; FISCHER, 2011; TELES; FONTES, 2002). É considerado um problema de saúde pública por ser hospedeiro intermediário de duas espécies de parasitas nematóides do gênero *Angiostrongylus*: *A. Cantonensis*, helminto agente etiológico da zoonose meningite eosinofílica e *A. costaricensis* responsável pela angiostrongilíase abdominal (MORERA, 1988; TELES; FONTES, 2002).

Devido a seu hábito alimentar variado, o suco digestivo do *A. fulica* possui uma ampla gama de enzimas hidrolíticas, atraentes para uso industrial e biotecnológico em quantidades relevantes. NEUBERGER; RIVERS (1939) exploraram outro modelo de caracol terrestre, *Helix pomatia* com seu insumo enzimático comercial, a Glusulase® (PERKIN). Estudos anteriores já registraram presença de uma série de enzimas no suco digestivo do *Achatina fulica* (CARDOSO, A. M. et al., 2012; EZERONYE; OKERENTUGBA, 2001; LEPAROUX; COLAS, 1994; MAEDA et al., 1996; SUN et al., 2012). O LQBB-UTFPR, local de execução do projeto, já fez algumas caracterizações de hidrolases presentes no suco digestivo de outro molusco, outrora nativo e abundante no litoral paranaense, o “jatutá” ou *Megalobulimus paranaguensis* (GEBARA, 1989). Ademais, uma enzima muito

estudada na época, a α -4-O-Metil-Glucuronidase também foi caracterizada (FONTANA et al., 1988).

As enzimas possuem funções vitais nos organismos, pois têm a capacidade de catálise, ou seja, transformar e modificar a estrutura química de outras moléculas, inclusive outras proteínas (WALSH, 2001). Sabendo-se da importância das enzimas para o controle metabólico, a partir das primeiras décadas do século XX o desenvolvimento de tecnologias enzimáticas se intensificou, devido às descobertas de novas enzimas integrantes das vias metabólicas, melhor conhecimento de suas propriedades e consolidação de enzimas de interesse industrial (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Atualmente as enzimas estão sendo utilizadas em diversos segmentos da indústria, o que inclui as áreas alimentícia, cosmética, farmacêutica, de nutrição animal e até mesmo para pesquisa e desenvolvimento de novos produtos ou processos já existentes (LI; ADAMCIK; MEZZENGA, 2012).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é induzir os moluscos *A. fulica* à produção de enzimas específicas para posterior caracterização e purificação de seu suco digestivo, a fim de disponibilizar uma nova fonte de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, além de tirar proveito deste molusco, considerado praga urbana e agrícola.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, dentro do variado elenco bioquímico de hidrolases do suco digestivo do molusco *A. fulica*, aquelas que mais ativamente atuam sobre polissacarídeos da fitobiomassa e mais propriamente, as glicosidases que hidrolisam substratos cromogênicos representativos da especificidade para dissacarídeos e com maior ênfase para a atividade de fosfatase alcalina, de maior valor comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acrescentar na dieta alimentar basal do molusco terrestre *Achatina fulica* (verduras e legumes frescos), indutores simples (glicerol-P) ou mais complexos (pectina, inulina) para posterior avaliação do incremento do potencial hidrolítico do suco digestivo.
- Avaliar, por expedientes cromatográficos simples (CCD – Cromatografia em Camada Delgada) o desempenho das enzimas de interesse.
- Aplicar a técnica de separação adsortiva por bolhas (espumação; “foaming”) no enriquecimento das atividades enzimáticas e principalmente da fosfatase alcalina
- Comparar os resultados de enriquecimento enzimático / purificação com técnicas clássicas tais como a precipitação com sulfato de amônio e troca iônica em resinas dos tipos DEAE+ e CM-, preparadas a partir de fonte de baixo custo como o algodão da varredura têxtil.

- Comparar a economicidade de exploração do suco digestivo frente a outras fontes de fosfatase alcalina tais como intestinos de camarão e galinha ou leite bovino não pasteurizado.

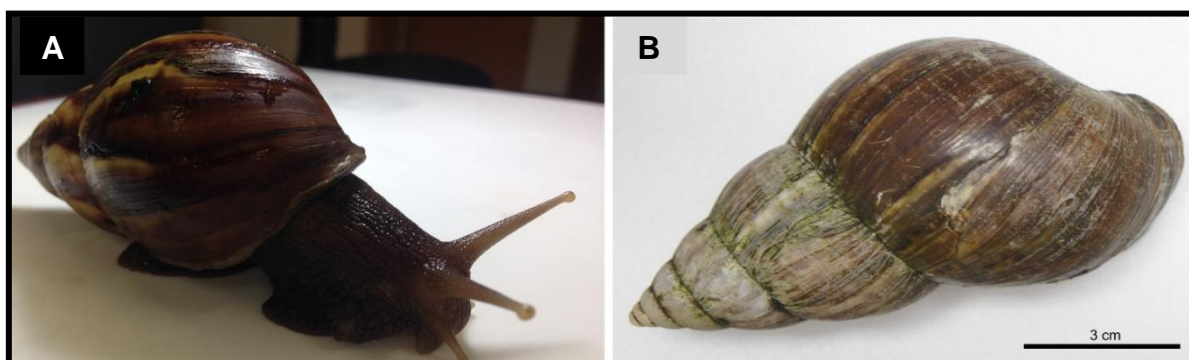
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Achatina fulica*

Achatina fulica Bowdich 1822 é um molusco terrestre pulmonado de grande porte conhecido erroneamente como caramujo gigante africano devido a sua característica terrestre, já que caramujos são moluscos aquáticos e respiram através das brânquias (MAEDA et al., 1996). Oriundo do leste da África, sua distribuição original tem limite ao sul da África do Sul até o norte da Somália, entretanto, atualmente, a espécie está amplamente distribuída por todos os continentes (África, Américas, Leste e Sul da Ásia e Oceania), inclusive regiões de clima temperado (RAUT; BARKER, 2002).

Os indivíduos adultos de *A. fulica* podem atingir mais de 200 g de peso, até 20 cm de concha, sendo esta caracterizada com tons de marrom haxurados que variam de acordo com sua dieta. Nota-se que suas conchas geralmente possuem enrolamento dextral (sentido horário). Estes caracóis alcançam maturidade sexual a partir dos quatro meses sendo hermafroditas com preferência a fecundação cruzada, podendo realizar até 5 posturas por ano e colocar uma média de 300 ovos por fecundação (ESTON et al., 2006; TELES; FONTES, 2002; TOMIYAMA; MIYASHITA, 1992).

Figura 1: a) *Achatina fulica* b) Concha de *A. fulica* Fonte: O autor



O gênero *Achatina* apresenta cerca de 75 espécies porém apenas a *A. fulica* foi introduzida em vários países do mundo pelo seu potencial de comercialização devido a seu tamanho avantajado, adaptabilidade, resistência a variáveis bióticas e abióticas e fácil reprodução, características que potencializaram seu perfil como espécie invasora (COLLEY, EDUARDO; FISCHER, 2011; OLIVEIRA, M. P. D., 1999). No Brasil o molusco, foi introduzido clandestinamente no final da década de 80 no estado do Paraná. Em Outubro de 1990 foram expostos em uma feira agropecuária na cidade de Curitiba, 100 lotes desta espécie, onde matrizes eram vendidas com objetivo de potencial comércio alimentício denominados na época de 'escargot chinês' (COLLEY, EDUARDO; FISCHER, 2011; REINERT, 1990). A partir desse evento começou a ser feita uma ampla divulgação por meio de veículos de comunicação onde surgiram até apostilas e fitas em VHS de cursos ensinando sua criação e comercialização. A rejeição do produto no mercado fez com que criadores abandonassem e soltassem suas criações no ambiente. Outra forma de dispersão da espécie foram os pesque-pagues, onde os moluscos eram utilizados como isca (JUNQUEIRA, 2001). A resistência a altas temperaturas da espécie, sua elevada taxa reprodutiva, crescimento e ganho de peso mais rápido que os escargots verdadeiros foram as características biológicas utilizadas para reforçar sua entrada no mercado nacional. O primeiro registro desses animais livres no Paraná foram nas cidades de Morretes e Antonina no ano de 1994, entretanto em 2002 já estavam disseminados em todo o litoral paranaense (KOSLOSKI; FISCHER, 2002). Nos últimos relatos sobre a disseminação da espécie no país, já haviam sido encontrados em todos estados brasileiros (MALDONADO JÚNIOR et al., 2010)

Além de invasora a espécie também é considerada um problema de saúde pública, pois é responsabilizada por ser hospedeira intermediária de parasitas nematóides pertencentes ao gênero *Angiostrongylus* (TELES; FONTES, 2002). Duas espécies desses vermes destacam-se do ponto de vista epidemiológico, *Angiostrongylus cantonensis*, helminto agente etiológico da zoonose meningite eosinofílica ou angiostrongilíase meningoencefálica e o *Angiostrongylus costaricensis* responsável pela angiostrongilíase abdominal, doença que provoca obstruções abdominais, inflamações do ceco e apêndice cecal (MORERA, 1988; TELES; FONTES, 2002). Essas infecções ocorrem através da ingestão da mucosa do hospedeiro intermediário depositada em folhas de vegetais ou frutas sem lavagem apropriada ou através do consumo direto do hospedeiro crus ou mal

cozidos (KIM, D. Y. et al., 2002; NEUHAUSS et al., 2007; TOMA et al., 2002). Há relatos de moluscos terrestres parasitados por *A. cantonensis* no Espírito Santo, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio Grande Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (CALDEIRA et al., 2007; LIMA, A. R. M. C. et al., 2009; MALDONADO JÚNIOR et al., 2010; MOREIRA et al., 2013; OLIVEIRA, A. P. et al., 2015; THIENGO, S. C. et al., 2010). CARVALHO et al. (2012) fez um amplo estudo em áreas portuárias brasileiras registrando a presença de caramujos africanos infectados com o larvas de *A. Cantonensis*. Dos 30 portos investigados, 11 deles (36,6%) apresentaram moluscos infectados, entre eles os portos de Paranaguá/PR, Navegantes/SC Angra dos Reis/RJ e Ilhéus/BA. Já a angiostrongilíase abdominal causada pelo *A. costaricensis* ocorre nas regiões Central, Sudeste e Sul do país, com dezenas de casos confirmados (ESTON et al., 2006). Entretanto, CARVALHO et al. (2003) afirmaram que embora o caramujo africano seja suscetível a infecção por larvas de *A. costaricensis*, requer um alto nível de exposição larval para a infecção o que demonstra que essa espécie de molusco apresenta até o momento um baixo risco para a transmissão desse nematóide.

Outro problema decorrente do molusco *Achatina* spp. é o fato que após a morte dos indivíduos, rapidamente seu corpo mole é decomposto por bactérias e outros decompositores, entretanto sua concha pode permanecer no ambiente por décadas. Como esta geralmente fica com a abertura voltada para cima, se torna um potencial criadouro para mosquitos do gênero *Aedes* spp., vetores de viroses como dengue, febre amarela, febre Chikungunya e o vírus Zika (ALMEIDA, MARCELO NOCELLE, 2016). No Brasil, no ano de 2001, em Campinas/SP, foram encontradas larvas de *Aedes* spp. em conchas de caramujos africanos (GOMES, M., 2016).

Em 2005 o IBAMA lançou a Instrução Normativa nº 73 proibindo a introdução, criação e comercialização do molusco terrestre, com intuito de controlar e erradicar esta espécie invasora, reforçando o parecer técnico 003/03 publicado em 2003 do Ministério da Agricultura e a Portaria 102/98 do IBAMA que regulamentam os criadouros de fauna exótica, considerando essas práticas ilegais (BARROS, 2005; IBAMA, 1998; NEVES, 2003). Dentre os métodos de controle e erradicação do *A. fulica* o de maior eficácia é o controle físico, o qual se refere a coleta manual dos indivíduos (COLLEY, E., 2012). A opção popular para eliminação dos moluscos após a coleta é a aplicação de sal, porém não é recomendado, pois seu uso em excesso pode prejudicar o solo. O IBAMA recomenda que os moluscos sejam esmagados,

cobertos com cal virgem e enterrados. Outras opções eficientes são água fervente ou incineração, no entanto estas medidas devem ser tomadas com cautela (THIENGO, SILVANA C. et al., 2007)

Os moluscos ocupam ambientes variados, possuem hábitos alimentares generalistas embora sejam herbívoros. Consomem alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, folhas, entre outros, porém na falta de alimentos naturais podem consumir papéis, plásticos e até mesmo isopor. (COLLEY, EDUARDO; FISCHER, 2011; FISCHER; COSTA; NERING, 2008; GARCIA; CHAVEIRO, 2011; TELES; FONTES, 2002). Sobrevivem em diferentes ecossistemas, tanto naturais quanto antrópicos. O conjunto dessas características demonstram o potencial invasor da espécie (THIENGO, SILVANA C. et al., 2007).

Embora toda a problemática envolvendo o *A. fulica*, estes moluscos terrestres possuem equipamento enzimático para uma versátil dieta e seu conteúdo gastrointestinal é de grande interesse biotecnológico e pode ser aproveitado. (EZERONYE; OKERENTUGBA, 2001; VAN WEEL, 1959). Estudos evidenciam a capacidade de produção de algumas enzimas de interesse com induções de dietas específicas listadas na tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Enzimas encontradas no suco gastrointestinal do *Achatina fulica*. (Continua)

Enzima	Substrato para Hidrólise	Produto de hidrólise
amilase	<u>Amilose</u> / amilopectina	glucose, maltossacarídeos
Catepsina, outras proteases	Soro Albumina Bovina	aas, peptídeos
Sacarase (invertase)	Sacarose	glucose, frutose
β – N- acetil- glucosaminidase	Quitina	N-acetil-D-Glucosamina
quitosanase	Quitosana	D-Glucosamina
β – glucuronidase	Conjugados diversos	Ácido Glucurônico
α – arabinofuranosidase	ArabinoXilana	L-Arabinose
endo – glucanase	Celulose	Celodextrinas
celobiohidrolase I e II	Celobiose	Glucose
β – frutosidase	Inulina, Sacarose	D-Frutose
β – fucosidase	Fucanas, Glicoproteínas	L-Fucose
α – galactosidase	Galactomananas	Galactose
β – galactosidase	Lactose	Galactose
β – glucanase	B-Glucanas de cereais	Glucose
α – glucosidase	Maltose	Glucose
β – glicosidase	Celobiose	Glucose

		(Conclusão)
α – manosidase	α –Manana de levedura	Manose
β – manosidase	β –Mananas de coníferas	Manose
α – ramnosidase	Ramnopectinas	L-rhamnose
β – xilanase	Hemicelulose de gramíneas	D- Xilose
β – xilosidase	Xilobiose	D-Xilose

Fonte:(CARDOSO, ALEXANDER M. et al., 2012; LEPAROUX; COLAS, 1994; MAEDA et al., 1996; SUN et al., 2012; VAN WEEL, 1959).

3.2 ENZIMAS

As enzimas são um subconjunto de proteínas que catalisam reações químicas, transformando substratos macromoleculares e pequenas moléculas. A arquitetura tridimensional precisa das enzimas permite seletividade em etapas físicas e químicas além de atuar em regiões de alta especificidade (WALSH, 2001) Os processos enzimáticos são conduzidos sob condições ótimas de temperatura, ambiente, pressão atmosférica e pH, variando de acordo com o perfil de cada enzima (SHELDON; VAN PELT, 2013).

As enzimas são utilizadas em diversos seguimentos da indústria, entre eles as áreas alimentícias, de cosméticos, medicamentos, nutrição animal e até mesmo para pesquisa e desenvolvimento de novos produtos ou aperfeiçoamento de processos já existentes. Existe uma infinidade de enzimas. São estimadas mais de 80 mil enzimas só no corpo humano. As enzimas utilizadas comercialmente, em geral são de origem microbiana, por serem mais estáveis que as enzimas derivadas de plantas e animais (ANBU et al., 2013; LI et al., 2012). Entre os produtores de enzimas de interesse industrial e bioecnológico destacam-se as leveduras, bactérias e fungos filamentosos, pela sua capacidade de secretar uma quantidade razoável de substâncias, grande variedade de enzimas em curto período de cultivo e facilidade de crescimento em uma variedade de substratos incluindo resíduos industriais (ANBU et al., 2013).

A eficiência na produção de enzimas de origem microbiana depende de uma série de fatores, entre eles, a quantidade adequada de substrato para manter a atividade enzimática, variáveis como pH, temperatura e tempo, ideais para manter

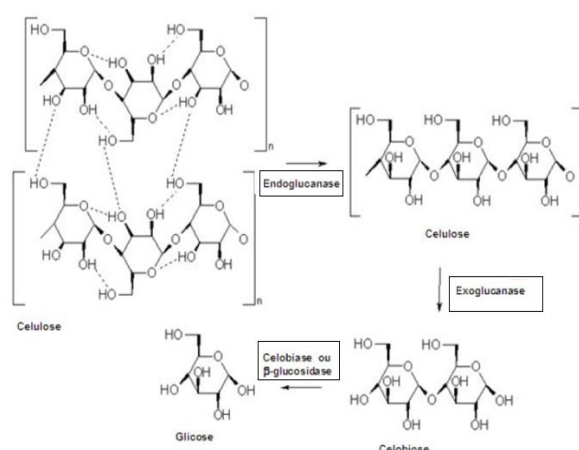
essa atividade (KRABBE, 2011). A utilização de enzimas em processos permitem uma série de vantagens, como redução do impacto adverso da manufatura em nosso ecossistema reduzindo o consumo de grandes quantidades de matérias-primas, energia e geração de resíduos, em comparação com o processo químico, sendo assim benéfico tanto para indústrias quanto para o meio ambiente (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Este trabalho teve como enfoque demonstrar as características do SDAf (suco digestivo do *Achatina fulica*) como fonte enzimática, evidenciando seu potencial a ser aplicado em diversas áreas como nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pois além de ser uma alternativa viável economicamente ainda contribui com a preservação do meio ambiente, devido à problemática que envolve o molusco *A. fulica* nos ecossistemas em que se encontram no Brasil. Para a execução de métodos de purificação enzimática através de processos biotecnológicos, é de suma importância a escolha de uma metodologia de baixo custo e com menor geração de resíduos possível, para ser considerada viável. Como exemplo, a vantagem da metodologia de espumação (“foaming”) reside no fato de ser uma tecnologia limpa, com baixa geração de resíduos e de execução simples e rápida.

3.2.1 Celulase

As celulasas são enzimas que atuam na reação de hidrólise de materiais celulósicos liberando glicose e outros açúcares. A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grupos: endoglucanases (EC-3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra, exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Esse complexo enzimático trabalha simultaneamente no qual a hidrólise primária ocorre na superfície dos substratos sólidos de celulose, liberando açúcares redutores, a hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobioses em glicose pela ação das β -glicosidases (figura 2) (BAGGA; SANDHU; SHARMA, 1990; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006)

Figura 2: Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011).



As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são enzimas do complexo celulósico responsável pela iniciação da hidrólise. Atua hidrolisando randomicamente as regiões internas das estruturas menos compactadas (amorfas) da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, diminuindo o comprimento da fibra, gerando novas extremidades livres, polissacarídeos menores e oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LYND et al., 2002). As exoglucanases (EC 3.2.1.74), também conhecidas como glucanohidrolase ou celobiohidrolases, atuam de maneira progressiva em extremidades reductoras e não reductoras da celulose, encurtando as cadeias de polissacarídeo. Possui maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produto final (BHAT, M.K.; BHAT, 1997; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LYND et al., 2002).

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) possuem importante papel na redução de materiais ligno(hemi)celulósicos. Essa enzima tem a propriedade de atuar na hidrólise de resíduos de celobiose e oligossacarídeos solúveis e reduzi-los a glicose (ALMEIDA, M. N., 2009; LYND et al., 2002) ou seja, a etapa mais importante do novo ciclo de produção de biocombustíveis – o bioetanol ou etanol de segunda geração – pois as leveduras mais hábeis na etanologênese (*Saccharomyces* spp.) fermentam bem a glicose mas não a celobiose.

Na natureza há uma série de microrganismos que produzem celulasas, entre eles estão os fungos, bactérias e até protozoários, entretanto apenas alguns são

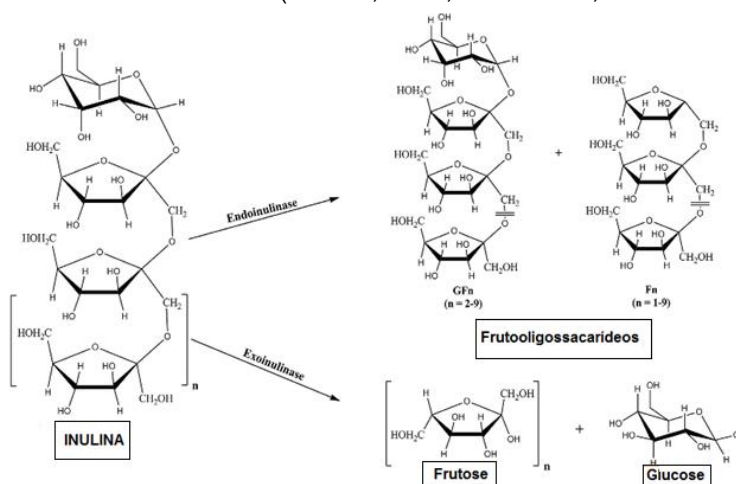
conhecidos como verdadeiros celulolíticos, ou seja, que são capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004). Actinomicetos Grampositivos são os principais produtores de compostos bioativos e enzimas, incluindo enzimas de grande importância industrial envolvidas na degradação de lignocelulose (GEORGE; AHMAD; RAO, 2001; JANG; CHEN, 2003). Há uma variedade de aplicações da celulase. Na década de 80 começou a ser usada na indústria de alimentação animal, na indústria de alimentos e posteriormente aplicadas na indústria têxtil e lavanderias (BHAT, M. K., 2000).

Na indústria alimentícia as celulases são aplicadas na extração, filtração, clarificação de sucos de frutas, na extração de componentes do chá verde, proteínas de soja, óleos essenciais, aromatizantes e amido de batata doce, nos processos de produção de vinagre de laranja e do ágar, entre outros. (BHAT, M.K.; BHAT, 1997; RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004). Nas indústrias de ração, as celulases são aplicadas na degradação das plantas forrageiras, aumentando a digestibilidade da ração e, na indústria têxtil, as celulases vêm sendo usadas para degradação das fibras superficiais, deixando os fios mais lisos e macios (RANGRAB; MÜHLBACH; BERTO, 2000; SANTANA, 2010). Outra aplicação da enzima celulase é na produção de bioetanol, promessa de combustível alternativo à gasolina (YAMADA et al., 2013). As biomassas lignocelulósicas, como o bagaço de cana-de-açúcar, milho, palha de arroz e trigo, são consideradas matérias-primas promissoras para a produção de bioetanol, por possuírem propriedades ambientais favoráveis, serem abundantes, baratas e renováveis (ADSUL et al., 2011). Apesar dessas vantagens o processamento da biomassa lignocelulósica é relativamente caro, pois há necessidade de realizar um pré-tratamento extensivo além de grandes quantidades de celulases para resultar em uma hidrólise eficiente, demandando da ação sinérgica das enzimas celulolíticas endoglucanases, celobiohidrolases e β -glucosidases (YAMADA et al., 2013). A máxima utilização do substrato é um dos pré-requisitos para tornar os processos de produção de etanol lignocelulósico economicamente viáveis. Isto significa que todos os tipos de açúcares em celulose e hemiceluloses devem ser convertidos em etanol (WYMAN, 2007; ZHAO et al., 2017). O maior obstáculo na utilização em escala industrial desta enzima é o alto custo de produção (DOMINGUES et al., 2001).

3.2.2 Inulinase

São conhecidas como inulinases um pool de enzimas com ação frutano furohidrolases que convertem inulina, um polímero de β -frutofuranosídeo 2-ligados, a moléculas de frutose livre, em uma única etapa (ETTALIBI; BARATTI, 1987; POORNA; KULKARNI, 1995). Estas enzimas são classificadas de acordo com seu modo de atuação sobre a hidrólise de inulina. As exoinulinases (2,1 β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.8) quebram ligações entre as unidades de frutose, localizadas longe das extremidades da rede de polímero e produzem oligossacarídeos. As endoinulinases (β -D-frutanofrutano-hidrolase; EC 3.2.1.7) agem de forma aleatória sobre o acoplamento interno da molécula de inulina liberando inulo-triose, inulo-tetraose e inulo-pentaose como produtos principais como mostra a figura 3. Suas propriedades são tão semelhantes que é difícil separar essas duas enzimas por métodos convencionais (JING et al., 2003; VANDAMME; DERYCKE, 1983).

Figura 3: Modo de ação da inulinase. Fonte: (SINGH, R. S.; CHAUHAN; KENNEDY, 2017)



As enzimas inulinases são utilizadas na produção de xaropes com alta concentração de frutose, utilizando inulina como matéria-prima na síntese de oligossacarídeos e são amplamente usados na indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica (DONG et al., 1997; ETTALIBI; BARATTI, 1987; POORNA;

KULKARNI, 1995; YUAN, W. J. et al., 2008). A produção de frutose por ação enzimática utilizando a inulinase é relativamente simples e resulta em produtos com até 95% de frutose, diferente da produção convencional, a qual depende da ação de três enzimas: α -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase. Além de mais complexa produz taxas mais baixas de frutose, alcançando 45% nos melhores casos (KIM, C. H.; RHEE, 1989).

As inulinases também são utilizadas na produção de frutooligossacarídeos (DONG et al., 1997). Os frutooligossacarídeos são denominados como ingredientes de alimentos saudáveis, pois sua ingestão estimula o crescimento das bifidobactérias, gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal (CHIEN; LEE; LIN, 2001). Outra aplicação das inulinases é na produção de inulooligossacarídeos, bem como na produção de ácido glicônico, pululana e acetona-butanol. Entretanto, a produção de xaropes de frutose através destas enzimas continua a ser a alternativa mais viável, comparada às outras formas de obtenção destes produtos (MUNARETTO, 2011).

Inulinases podem ser obtidas em raízes de plantas e tubérculos que contém inulina, um polissacarídeo de polifrutano que funciona como carboidrato de reserva nas plantas da família *Compositae* e *Gramineae* e é acumulada nas partes subterrâneas de plantas da família *Asteracea*, ou através da atividade microbiana, onde a inulina atua como fonte de carbono para microrganismos como fungos, bactérias e leveduras (JING et al., 2003; LACHMAN et al., 2004; YUAN, W. J. et al., 2008). Diferente das enzimas das plantas, inulinases de origem microbiana apresentam tanto atividade sobre a sacarose quanto sobre a inulina, pois a diferença da enzima invertase (β -fructofuranosidase, (E.C. 3.2.1.26) não é clara para atividade enzimática microbiana. As inulinases atuam sobre o substrato sacarose, porém a invertase apresenta pouca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose. Portanto considera-se que a taxa de atividade sobre a sacarose em relação a inulina (S/I) caracteriza a enzima: Para altos valores de S/I a enzima é caracterizada como invertase e para S/I menores que 50 é caracterizada como inulinase (ETTALIBI; BARATTI, 1987; VANDAMME; DERYCKE, 1983).

Vários microrganismos são descritos como produtores de inulinases. Bactérias como *Xanthomonas*, *Rhizoctoniae* *Streptomyces*; fungos filamentosos como exemplo algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*; e leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces* (DILIPKUMAR; RAJASIMMAN;

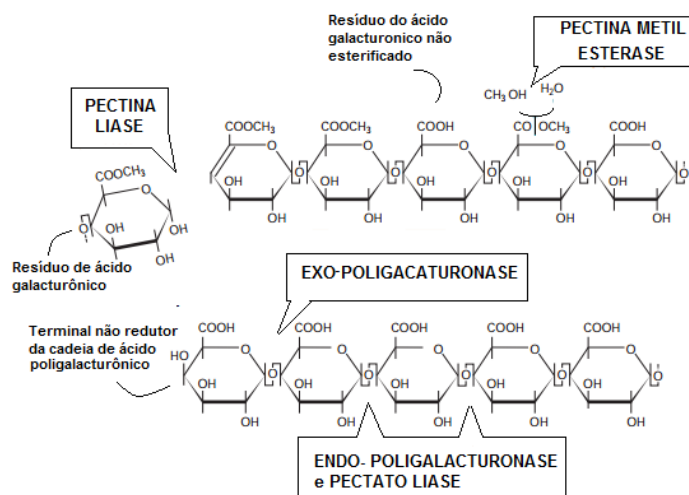
RAJAMOHAN, 2011; JAIN; JAIN; KANGO, 2012; NARAYANAN et al., 2013; YUAN, B. et al., 2012). As leveduras destacam-se como os principais microrganismos produtores de inulinase, pelo seu rápido crescimento e alta taxa de produção de biomassa e enzimas, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* (LANE; MORRISSEY, 2010).

3.2.3 Pectinase

As pectinases ou enzimas pectinolíticas correspondem a um grupo de enzimas que promovem a desconstrução de polissacarídeos componentes das substâncias pécticas, macromoléculas glicosídicas, ácidas, de alto peso molecular, componentes dos tecidos vegetais. Estas substâncias pécticas correspondem de 0,5 a 4% dos frutos frescos sendo os principais constituintes da lamela média celular, presente na estrutura das paredes vegetais (HENNIES, 1996; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). As pectinases possuem importância primordial para as plantas, além de fazerem parte da extensão da parede celular, ajudam no amaciamento de alguns tecidos durante sua maturação e armazenamento, ainda mantêm o equilíbrio ecológico promovendo a decomposição e reciclagem de resíduos de materiais vegetais (AGUILAR; HUITRÓN, 1990; JAYANI et al., 2005). A estrutura complexa e heterogênea da pectina exige das enzimas envolvidas na sua degradação, a presença de uma série de atividades enzimáticas distintas (MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2009). Em vista disso as pectinases são classificadas de acordo com a sua forma de ação sobre as macromoléculas pécticas, são denominadas de desmetoxilantes, as que agem promovendo a remoção dos resíduos metoxila, desesterificando a pectina e o ácido péctico, e em despolimerizantes, que atuam catalisando a quebra das ligações -1,4 da cadeia principal. As pectinases despolimerizantes podem ser caracterizadas como hidrolases e liases (KASHYAP et al., 2001). Dentre as hidrolases, destacam-se as poligalacturonases, principais enzimas que exercem a função de hidrólise atuando nas ligações glicosídicas α -1,4 de resíduos não metoxilados de ácido galacturônico, as endo-poligalacturonases, que hidrolisam randomicamente as ligações α -1,4 entre unidades de ácido

poligalacturônico e as exo-poligalacturonases, que exercem a função de hidrolisar as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir das extremidades não redutora (JAYANI et al., 2005). Fazem parte das enzimas classificadas como liases as endo-pectatolases, que rompem as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido péctico, as exo-pectatolases que atuam rompendo, a partir de terminais não redutores, as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido galacturônico e por fim as endo-pectinaliases, estas rompem as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico (JAYANI et al., 2005; KASHYAP et al., 2001). O modo de ação de algumas enzimas pectinolíticas está apresentado na figura 4.

Figura 4: Modo de ação de pectinases (NCBE, 2000).



As pectinases são de grande importância industrial, utilizadas largamente na produção de sucos e vinhos, atuando nas etapas tanto de maceração da fruta, durante a prensagem da polpa, da qual promove maior rendimento de extração do suco, como também na etapa de clarificação, onde atuam hidrolisando os resíduos de pectina provenientes da maceração da fruta, diminuindo a viscosidade e a turbidez do suco. As pectinases também são apresentadas diversas outras aplicações como extração de óleos, polpa de tomate e pigmentos de plantas, preparação de celulose para fabricação de tecidos e papel, fermentação de chás e cafés, entre

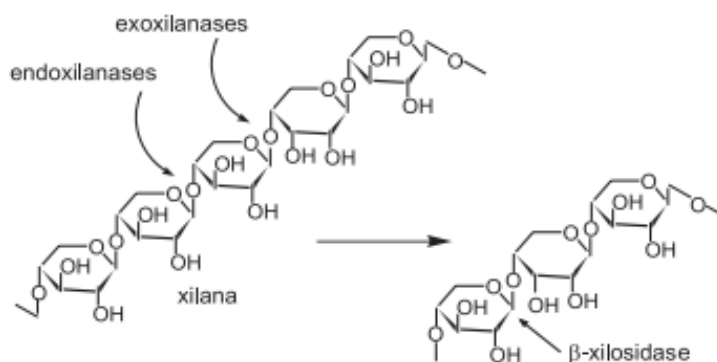
outros (CASTILHO; ALVES; MEDRONHO, 1999; TARAGANO; SANCHEZ; PILOSO, 1997; UENOJO; PASTORE, 2007).

A maioria das produções industriais de pectinase são provenientes de fungos filamentosos, com destaque ao gênero *Aspergillus*, o mais utilizado para a produção de enzimas pectinolíticas devido a alta taxa de secreção de enzimas no meio de cultivo, chegando a 90%, fator que a facilita a purificação e recuperação das enzimas. Outra característica atribuída ao gênero *Aspergillus* é a ampla faixa de pH em que atua, entre 3,0 e 6,0, compatíveis com os processos industriais nos quais são geralmente submetidas as enzimas (KOTZEKIDOU, 1991; SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA; APPU RAO, 1999; UENOJO; PASTORE, 2007).

3.2.4 Xilanases

As xilanases são as principais enzimas componentes dos sistemas de hidrólise das paredes celulares das plantas. Estas enzimas atuam em conjunto na conversão da xilana em unidades de xilose. Endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4, dentro da cadeia da xilana, liberando xilo-oligossacarídeos, das exo- β -xilanases que liberam xilose a partir das extremidades não redutoras as xilanas e das β -xilosidases convertem xilobiose ou xilooligossacarídeos curtos em xilose (GOMES, E. et al., 2007) Figura 5.

Figura 5: Mecanismo de ação das xilanases (GOMES, E. et al., 2007)



As xilanases têm recebido atenção por serem potencialmente viáveis em vários processos importantes à indústria. Na indústria alimentícia são utilizadas para

melhoramento na panificação, no aumento dos valores nutritivos e energéticos de alimentos, na produção de sucos e bebidas alcóolicas e na extração de óleos vegetais. São aplicadas na indústria animal para melhorar a digestibilidade das rações, e na indústria de papeis são usadas no branqueamento na polpa kraft diminuindo a quantidade de cloro necessária para o processo. (PRASAD UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016). Em destaque está o uso da xilanase na indústria de bioetanol na qual são utilizadas em sinergia com as celulasas para a hidrólise completa de biomassa lignocelulósica, geralmente alcalina, para liberação de glicose, xilose e outros açúcares de pentose para a fermentação do bioetanol (SAHA, BADAL C., 2003).

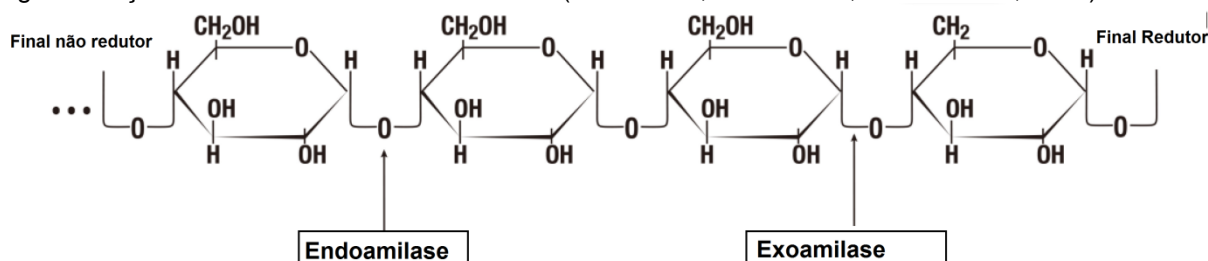
Um grande número de microorganismos, como bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir xilanase. Entretanto, a produção por fungos filamentosos é a mais significativa do ponto de vista industrial, por sua alta taxa de secreção comparada a outros microorganismos. As áreas avançadas de aplicações de xilanase requerem a procura de novos métodos de produção das enzimas com atividades específicas mais altas e maior produtividade, pois os procedimentos atuais requerem um longo trabalho e devido a falta de protocolos padrão para as atividades da xilanase é difícil explorar a sua utilização adequada (PRASAD UDAY et al., 2016).

3.2.5 Amilase

As amilases são enzimas que hidrolizam moléculas de amido para originar diversos produtos, incluindo dextrinas e polímeros menores compostos de unidades glicose (GUPTA et al., 2003; MACGREGOR; JANEČEK; SVENSSON, 2001). As amilases estão entre as enzimas de maior importância industrial dominando aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas. Possuem grande destaque em aplicações biotecnológicas e industriais desde a indústria de alimentos, fermentação, têxteis, papéis, até indústrias farmacêuticas. Elas podem ser obtidas de várias fontes, como plantas, animais e microorganismos, entretanto as de origem fúngica e bacteriana se destacam (RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008; REDDY; NIMMAGADDA; SAMBASIVA RAO, 2003).

As amilases podem ser divididas em duas categorias, endoamilases (α -amilasases) e exoamilases (β -amilasases). As endoamilases catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido produzindo oligossacarídeos ramificados com comprimentos de cadeia variados. Já as exoamilases possuem final não redutor, resultando assim em produtos finais e curtos (GUPTA et al., 2003). Há um grande número de enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos, dependendo de uma combinação de várias enzimas para hidrólise do amido completamente. As α -amilasases (E.C.3.2.1.1) são as mais populares na indústria, pois catalisam a hidrólise de ligações de glicose α -1,4 do amido em produtos de baixo peso molecular, tais como glicose, maltose e unidades de maltotriose (DE SOUZA; DE OLIVEIRA MAGALHÃES, 2010). O modo de ação das endo e exoamilases estão apresentados na figura 6 a seguir.

Figura 6: Ação das endo e exoamilases. Fonte: (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015)



Esta exposição do espectro das hidrolases de polissacarídeos de fitobiomasas é de pertinência quando se aborda o comportamento alimentar de moluscos terrestres, como é o caso presente de *Achatina fulica*, que são aptos à locomoção terrestre, capazes de escalar caules e ramos de vegetais e portanto ter pleno acesso à massa foliar mais facilmente digerível. Harmonicamente, o suco digestivo do molusco acumula um variado elenco de enzimas para a degradação hidrolítica dos principais componentes poliméricos que compõem a estruturação física e funcional dos vegetais: celulose, hemiceluloses, pectinas, amiláceos e outras glicanas variadas. É surpreendente a concentração que tais hidrolases alcançam no suco digestivo na ordem entre 100 a 200 mg proteínas totais / mL (comparativo obtidos em laboratório confrontando os sucos digestivos de *Achatina fulica* e seu vizinho taxonômico *Megalobulimus paranaguensis*). Provavelmente, um dos maiores

teores de proteínas – e com atividade enzimática – dentre todas ocorrências naturais. Visto de outro ângulo, a genômica tão eficiente de *Achatina* é uma fonte ímpar de DNA para fins de clonagem em outros sistemas de mais fácil manejo industrial (bactérias, leveduras e fungos não patogênicos).

3.2.6 Dissacaridasas

As dissacaridasas são enzimas (glicosil hidrolases) responsáveis pela quebra de dissacarídeos em monossacarídeos como parte do processo da digestão (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006). Os dissacarídeos são usados como substratos na maioria dos estudos sobre as glucosidasas intestinais, isto porque os dissacarídeos são os mais importantes dos glicosídeos do ponto de vista da fisiologia nutricional. (DAHLQVIST, 1974). Fazem parte deste grupo uma série de hidrolases entre elas α -glucosidase (EC 3.2.1.20), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), α e β - manosidase (EC 3.2.1.24 EC 3.2.1.25), α -fucosidase (3.2.1.51) entre outras. Estas enzimas são potencialmente interessantes na aplicação industrial farmacêutica e alimentar (SILVÉRIO et al., 2018). O suco digestivo do *Achatina fulica* possui diversas glicosil hidrolases, algumas já descritas na literatura e outras investigadas neste estudo.

3.2.7 Fosfatase alcalina

As fosfatases alcalinas (EC 3.1.3.1) são enzimas hidrofóbicas, responsáveis pela desfosforilação, no entanto também são capazes de hidrolisar uma série de monoésteresfosfóricos, juntamente com outros compostos contendo pirofosfato inorgânico, polifosfatos, fosfatos de glucose e fosfatidatos (COLEMAN, 1992; DUARTE; AMREIN; KAMERLIN, 2013). Também são conhecidos pela sua capacidade de catalisar reações de transfosforilação, apresentando função ótima em pH alcalino (SALAR et al., 2017).

Esta enzima está envolvida no transporte de grupos fosfato presentes nos compartimentos intracelulares para o espaço extracelular. É encontrada principalmente no fígado, ossos, intestino e placenta e possui papel fisiológico ainda não completamente conhecido (MOSS, D. W., 1997). Nos mamíferos, as fosfatases alcalinas se apresentam como enzimas envolvidas na absorção dos nutrientes através da membrana celular catalisando sua desfosforilação e servindo como fonte de fosfato inorgânico. As fosfatases alcalinas estão presentes em todos os tecidos e desempenham um papel de manutenção da homeostase do organismo (MORNET et al., 2001).

Níveis baixos dessa enzima provocam diferentes estados patológicos. Por exemplo; quando o nível de fosfatase alcalina intestinal está baixo, não é suficiente para desintoxicação da quantidade de bactérias comensais presentes, causando doenças. Em contrapartida, níveis elevados de fosfatases alcalinas podem levar a uma série de problemas como obesidade causada por depósitos de gordura intracelular desproporcionais, distúrbios de mineralização que ocasionam doenças músculo-esqueléticas e distúrbios metabólicos que prejudicam o fígado e o rim (HESSLE et al., 2002; LALLÈS, 2010).

Em todas as bactérias, esta enzima catalisa a hidrólise de uma variedade de fosfomonoésteres e catalisa uma transfosforilação, reação por transferência do grupo fosforilo em álcool na presença de certos aceptores de fosfato (COLEMAN, 1992).

Ela é usada em importantes aplicações como em imunoensaios enzimáticos, processamento de DNA/RNA, estratégias de conversão de pró-drogas, análises de taninos em uvas e vinhos tintos, monitoramento de sedimentos de água doce, entre outras (ADAMS; HARBERTSON, 1999; SAYLER; PUZISS; SILVER, 1979).

A fosfatase alcalina também é amplamente utilizada em estudos como bioindicadora de toxicidade aquática devido a sensibilidade a sais metálicos, considerando a atividade enzimática em animais expostos a contaminantes (ATLI; CANLI, 2007; MARTINS, 2009).

As três maiores fontes de fosfatases alcalinas comerciais são bacterianas (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*), intestino de bezerro e tecidos moles de camarão. Existe um trabalho histórico sobre fosfatase alcalina com o monitoramento de doenças de fígado e osso tais como cirrose e tumores (STOLBACH, 1969). O foco foi estendido

para doença hepatobiliar e aumento da atividade osteoblástica e para a diferenciação das formas enzimáticas do fígado e osso como consequência dos diferentes padrões de glicosilação (MOSS, D. W., 1987).

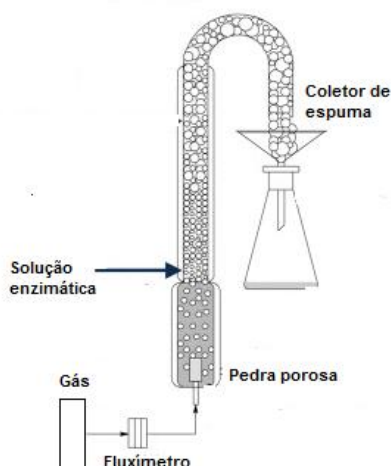
Estes contextos nos levaram a considerar o suco digestivo de *Achatina fulica* como uma fonte alternativa de fosfatase alcalina. A captura do animal é simples, a exposição das partes moles também a coleta envolve um mínimo de habilidade operacional – inserção de seringa com agulha de grosso calibre, pois o suco digestivo é assaz viscoso por conta do altíssimo teor protéico – e acondicionamento do suco nativo. Uma vez centrifugado a alta rotação (para eliminar microrganismo), é acondicionado mediante congelação, seguido ou não de liofilização.

3.3 PURIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE ESPUMAÇÃO (SEPARAÇÃO ADSORTIVA POR BOLHAS) OU “FOAMING”

Há uma infinidade de técnicas existentes para separação de enzimas e estas técnicas consideram, entre outras características protéicas o tamanho da molécula, sua carga, hidrofobicidade, solubilidade e sua atividade biológica.

O método de separação por espumação proposto por LINKE; BERGER (2011) é utilizado para separar compostos solúveis e de superfície-ativos de soluções aquosas diluídas. O gás borbulhante dentro de um líquido contendo a molécula alvo resulta na formação de uma interface de gás-líquido, no qual compostos bipolares se organizam em uma formação definida e são transportados para cima com a formação de espuma (KIRKLAND; TANNER, 2005; LAMBERT et al., 2003; LINKE; BERGER, 2011).

Figura 7: Esquema de purificação de proteínas pelo método de espumação. Fonte: (BURGHOFF, 2012)



O sistema de espumação (figura 7) é composto por uma alimentação de gás (preferencialmente nitrogênio), um fluxímetro (controle da vazão), uma pedra porosa conectada na parte interna e inferior da coluna de vidro que contém um recipiente coletor e direcionador da espuma, além de funil e proveta para a coleta da espuma

O gás nitrogênio deve ser inicialmente pré-estabilizado contendo apenas água na coluna. Após a estabilização, alíquotas do conteúdo enzimático em questão devem ser colocadas na coluna com o fluxo de gás. Os fluxos deverão variar até atingir o total colapsamento das bolhas e as frações obtidas nesse procedimento são mensuradas com a técnica compatível com a enzima de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA, TRANSPORTE E MANUTENÇÃO DO *Achatina fulica*

Foram realizadas coletas de moluscos *Achatina fulica* no município de Pontal do Paraná/PR com a devida autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, SISBIO, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ ICMBio nº 47576-2, o qual permite atividades com finalidade científica utilizando o molusco terrestre *Achatina fulica*. Por se tratar de um invertebrado, não foi necessária a aprovação da Comissão de Ética para uso de Animais.

Para a coleta dos animais considerados jovens (entre 3–6 cm) e adultos (>6 cm), foram utilizados os EPI adequados (luvas nitrílicas e jaleco). A coleta foi individual e manual e os animais foram transportados em caixas plásticas adaptadas, que permitem trocas gasosas, até o laboratório de Biotecnologia de Biomassas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Ecoville.

Ao chegarem no laboratório os moluscos foram pesados e separados em 3 grupos equivalentes e mantidos em incubadora de fotoperíodo tipo B.O.D por 10 dias a uma temperatura de 25°C. Cada grupo foi recebeu uma alimentação específica para a avaliação de indução de enzimas através da alimentação com substratos de interesse neste trabalho, como demonstra a tabela 2.

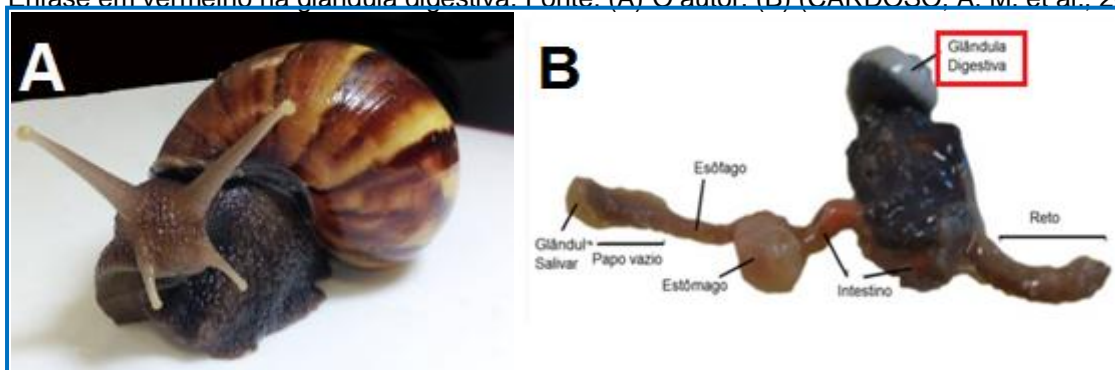
Tabela 2: Definição dos grupos, alimentos que foram utilizados e enzimas de interesse.

GRUPO	ALIMENTO	ENZIMA DE INTERESSE
1: Controle	Alface	Celulase
2: Gli- P	Alface + glicerofosfato de sódio	Fosfatase alcalina
3: Inu/Pect	Batata yacon(inulina) e Casca de Maça (pectina)	Inulinase/Pectinase

4.2 COLETA DAS ENZIMAS GÁSTRICAS

Após jejum de 12 h foi realizada primeiramente uma lavagem dos animais e logo após suas conchas foram quebradas, os moluscos foram sacrificados e suas glândulas digestivas localizadas (figura 8). Em cada indivíduo foi realizada uma punção gastro-estomacal com uma seringa hipodérmica de agulha fina. Após a sucção, todo conteúdo gástrico (enzimas) foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, o que permitiu a remoção de qualquer material particulado. Posteriormente o sobrenadante foi fracionado, do qual parte do material foi liofilizado e o restante mantido sob congelamento para experimentos posteriores.

Figura 8: (A) *Achatina fulica* (B) Sistema digestivo completo dissecado com partes identificadas. Ênfase em vermelho na glândula digestiva. Fonte: (A) O autor. (B) (CARDOSO, A. M. et al., 2012)



4.3 DESCARTE DO MATERIAL ORGÂNICO DO *A. FULICA*

Restos de conchas e resíduos orgânicos foram acomodados em caixas de papelão contendo cal virgem, mantidos por 24 horas e posteriormente foram enterrados conforme recomendado pela pesquisadora Silvana Thiengo do Instituto Oswaldo Cruz (THIENGO, SILVANA C. et al., 2007).

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO SUCO DIGESTIVO

4.4.1 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada por 4 métodos distintos para os resultados serem comparados de acordo com sua eficiência e custo-benefício, sendo o método Lowry o considerado como padrão.

4.4.1.1 BIURETO

A primeira determinação foi feita a partir do reativo de Biureto, o qual consiste na dissolução de 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 6g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) em 500 mL de água destilada. Sob agitação constante adicionou-se 300 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10 g% e 1 g de iodeto de potássio (KI). Completou-se o volume para 1L com água de destilada (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

Os ensaios foram realizados utilizando 500 μL de amostra do suco digestivo do *Achatina fulica* (SDAf) convenientemente diluídos, aos quais foram adicionados 1000 μL de reativo de Biureto. Após 2 minutos de repouso a absorbância das amostras foi verificada através de espectrofotometria a 540 nm. O cálculo da concentração de proteína em mg por mL de SDAf foi realizado através de curva analítica utilizando albumina bovina como padrão protéico. Os ensaios foram realizados em triplicata e com coeficiente de variação dos dados inferior a 5%.

4.4.1.2 LOWRY (FOLIN-CIOCALTEAU)

A determinação de proteínas totais pelo Método de Lowry (Folin-fenol Ciocalteau) (LOWRY et al., 1951) foi realizada utilizando 200 μL de amostra de SDAf convenientemente diluídos aos quais foi adicionado 1 mL do reativo de Lowry, que consiste na mistura recém-preparada 50:1 (v/v) de uma solução de carbonato de sódio 2% (m/v) em hidróxido de sódio 0,1 mol/L e a solução de sulfato de cobre pentahidratado 0,5% (m/v) com tartarato de sódio e potássio 1% (m/v) em água

destilada. As amostras foram agitadas vigorosamente em Vortex e deixados em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 100 µL de reativo de Folin-Ciocalteu recém-diluído com água destilada para 1 N/L em triplicata. As amostras foram novamente agitadas vigorosamente e deixadas em repouso durante 30 minutos. Em seguida foram monitoradas as absorvâncias em 750 nm em espectrofotômetro. As concentrações de proteína foram calculadas a partir da equação da reta de uma curva analítica de albumina bovina.

4.4.1.3 BRADFORD

O reativo de Bradford foi preparado com 50 mg de corante Cromassie Brilliant Blue dissolvido em 25 mL de etanol (etOH) 95%. Em banho de gelo adicionou-se lentamente 50 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e completou-se até 500 mL com água destilada (BRADFORD, 1976). Os ensaios com o SDAf foram realizados a partir da mistura de 100 µL de amostra convenientemente diluídos, com 1000 µL do reativo de Bradford, monitoradas as absorvâncias a 595 nm em espectrofotômetro. As determinações de proteína foram calculadas a partir de uma curva analítica de albumina bovina.

4.4.1.4 ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Para a determinação de proteínas pelo método de Ácido Bicinconínico descrito por SMITH et al. (1985) foram necessários a preparação de três reativos denominados A, B, C. O reativo A foi preparado com mistura de 8 g de Carbonato de Sódio, 1,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) e NaOH com pH de 11,25 em água destilada para completar 100 mL. O reativo B foi preparado com o reagente Ácido Bicinconínico (BCA) com NaOH pH próximo de 11 para completar um volume final de 100mL. O reativo C foi preparado com 4 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e NaOH $25mol \cdot L^{-1}$. em um volume final de 100 mL. Para a execução do método foi necessário combinar 25 mL de reativo A, 25 mL do reativo B e 1 mL do reativo C. O procedimento foi realizado com 500 µL das amostras de SDAf em 500 µL do reativo BCA colocados em placas multipoços que

foram vigorosamente agitadas. Em seguida as amostras foram incubadas por 15 minutos a 60°C e mais 30 minutos em temperatura ambiente (25°C) para resfriamento. A leitura da absorbância foi feita a 562 nm.

4.4.2 Determinação de açúcares

4.4.2.1 DNS - DINITROSALICILATO PARA AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do dinitrosalicilato alcalino. Este método tem como propósito a redução, pela ação dos açúcares, do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-avermelhado, que pode ser monitorado em 540 nm (figura 9) (MILLER, 1959). O grupo aldeído dos açúcares redutores como a glucose é oxidado para ácido carboxílico (NELSON; COX, 2006).

Figura 9: REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO

NOTA: (a) açúcar redutor (glucose), (b) ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela); (c) ácido carboxílico do açúcar e (d) 3-amino-5-nitrosalicílico (cor laranja-avermelhada).

FONTE: (TIBONI, 2015).

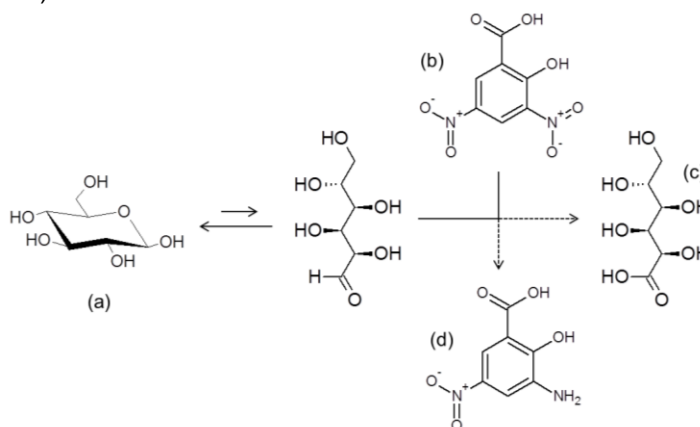


Tabela 3: COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS)

A	Ác. 3,5-Dinitrosalicílico	5 g
	Solução NaOH 2 mol/L	100 mL
B	Tartarato duplo de Sódio e Potássio	150 mL
	H ₂ O destilada	300 mL

NOTA: O volume final deve ser completado para 500 mL

O reagente DNS foi preparado para realização dos ensaios conforme a tabela 3. As frações A e B foram levadas ao aquecimento separadamente até solubilização completa dos sais. Em seguida, as duas frações foram homogeneizadas e foi adicionado água destilada até completar 500 mL de solução final.

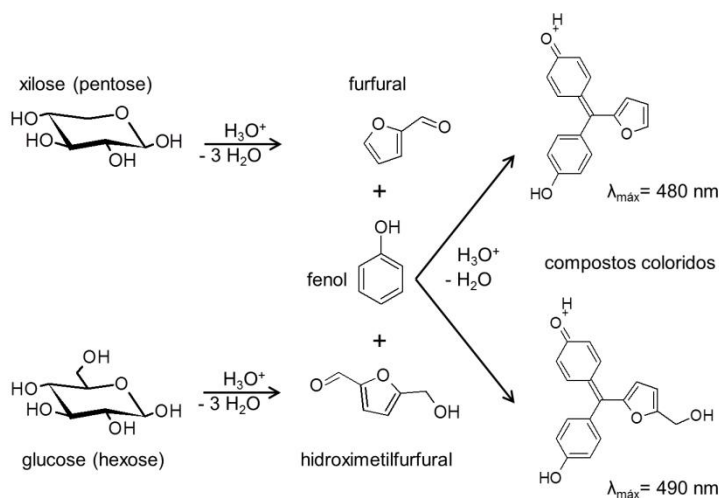
As amostras enzimáticas foram diluídas para conter de 25–350 µg de açúcares redutores em 150 µL e analisadas em triplicata. A seguir, foram adicionados 100 µL do reagente DNS e a mistura levada a fervura em banho-maria durante 2 minutos. Imediatamente após, adicionou-se 750 µL de água destilada e então foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2-BioTek) a 540 nm. O branco foi processado da mesma forma que foram feitas as amostras.

A quantidade de açúcar redutor (mg/amostra) foi calculada a partir da equação da reta gerada por curva analítica da correlação entre a absorbância e a concentração de açúcar (mg) ($R^2 > 0,99$), em triplicata, contendo cinco pontos, utilizando de maneira interpolada duas soluções padrão. Foram realizadas curvas para os açúcares: glucose, frutose, galactose, xilose, manose e arabinose, a partir de solução 100 mg% (p/v).

4.4.2.2 FENOL-SULFÚRICO PARA AÇÚCARES TOTAIS

A determinação de açúcares totais foi realizada de acordo a técnica de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Este método é colorimétrico quantitativo de micro determinação de açúcares e seus metil derivados, oligossacarídeos e polissacarídeos. A reação baseia-se na desidratação do carboidrato na presença do ácido sulfúrico (H_2SO_4), produzindo um aldeído (pentoses são desidratadas até furfural e hexoses até hidroximetilfurfural), que é capaz de se condensar com duas moléculas de fenol resultando na mudança de cor do composto para amarelo-alaranjado, conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10: Reação para determinação de açúcares totais pelo método fenol- sulfúrico. Fonte: (TIBONI, 2015)



Antes da realização dos ensaios foram removidos os resíduos nos tubos de vidro, lavando-os cuidadosamente com água e detergente, evitando qualquer intervenção nas respostas do teste. As amostras em triplicata, contendo 0,5-20 μg de açúcar foram adicionadas em água até completar 180 μL . Adicionou-se a mistura 120 μL de solução fenol 5% (p/v) ($0,53 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Em seguida, foi adicionado de forma rápida e direta, 700 μL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de homogeneização e repouso por 15 minutos. Após este procedimento foram realizadas as leituras em espectrofotômetro 490 nm para as hexoses (glucose, frutose, galactose, manose) e 480 nm para pentoses (xilose, arabinose). O controle contendo água e os demais reagentes foi processado da mesma maneira.

Os cálculos das quantidades de açúcar total ($\mu\text{g}/\text{ensaio}$) foram efetuados a partir da equação da reta gerada através de curva analítica da correlação entre a absorbância e a concentração de açúcar (μg) ($R^2 > 0,99$), em triplicata, contendo cinco pontos, no qual foi utilizada duas soluções padrão. Foram realizadas curvas para os açúcares: xilose, arabinose (pentose 480 nm), glucose, frutose, galactose e manose (hexoses 490 nm), a partir de solução 10 mg%. Para os cálculos de porcentagem em amostras de polissacarídeos, o valor da amostra total utilizado foi

multiplicado pelo fator 1,1, pois durante a quebra ocorre a inserção de uma molécula de água (18 g) em cada unidade de anidro açúcar (exemplo 162 g para hexose).

4.4.3 Análise UV-VIS

As amostras de suco digestivo foram também submetidas a espectrofotômetro entre 200 e 800 nm para avaliação da diferença de coloração.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1 Teste *P*-nitrofenil-glicosídeos para Glicosidases / Disacaridases

A atividade enzimática das amostras foi determinada utilizando soluções de *p*-nitrofenil-glicosídeo específico a 4 mmol.L⁻¹. Os ensaios foram realizados da seguinte forma: adicionou-se 200 µL de tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹, pH 4,5, 125 µL de *p*-nitrofenil-glicosídeos específicos, enzimas em quantidades distintas de acordo com os valores de proteínas já determinados e água destilada para completar 500 µL. Estas amostras foram mantidas em banho-maria a 50° C. A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de carbonato de sódio 100 mmol.L⁻¹ nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos.

A determinação da atividade enzimática foi feita mediante leitura em espectrofotômetro por *P*-nitrofenol (*PNF*) liberado, analisado em absorbância de 410 nm. Esses valores foram comparados com uma curva padrão de *PNF*, onde uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade da enzima necessária para liberar 1 µmol.L⁻¹ de *PNF* por minuto (COURA, 2012; GÜRKÖK et al., 2010). Já a atividade específica (U/mg) das enzimas é definida como a quantidade em µmol de *PNF* liberado por mg de proteína total.

Tabela 4: Substratos para determinação de enzimas alvo.

P-nitrofenil-glucosídeo	Enzima alvo
P-nitrofenil- α -L- arabinofuranosídeo	α - Arabinofuranosidase
P-nitrofenil- α -L- fucosídeo	α - Fucosidase
P-nitrofenil- α -D- galactopiranosídeo	α - Galactosidase
P-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo	β -Galactosidase
P-nitrofenil- α -D- glucopiranosídeo	α - Glucosidase
P-nitrofenil- β -D- glucopiranosídeo	β -Glucosidase
P-nitrofenil- β -D-glucoronídeo	β - Glucoronidase
P-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo	α - Manosidase
P-nitrofenil- β -D- manopiranosídeo	β - Manosidase
P-nitrofenil- α -D-xilopiranosídeo	α - Xilosidase

O valor de U (atividade enzimática) pode ser calculado pela lei de Lambert-Beer (equação 1), que considera o coeficiente de absorvidade molar da substância, o qual pode ser obtido pela leitura da absorbância de uma amostra com concentração conhecida (CUSTODIO; KUBOTA; ANDRADE, 2000).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

EQUAÇÃO 1- LEI DE LAMBERT- BEER

Nota: (A) é a absorbância, (ε) é o coeficiente de absorvidade molar ($\mu\text{mol}/\text{cm}$), (l) é a distância que a luz atravessa pela cubeta (cm), (c) é a concentração da substância absorvente no meio ($\mu\text{mol}/\text{L}$)

Adaptando a equação 1 para incluir a diluição da amostra original e o tempo de incubação e isolando a concentração, pode-se calcular o U das amostras pela seguinte equação 2.

$$U = \frac{A \cdot \frac{1}{v}}{\varepsilon \cdot l \cdot t}$$

EQUAÇÃO 2- EQUAÇÃO DE LAMBERT- BEER ADAPTADA PARA CÁLCULO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

NOTA: (v) é o volume da amostra (mL) e o (t) o tempo de incubação (min).

4.5.2 Ensaio com Substratos Polissacarídicos

As determinações da atividade enzimática frente a polissacarídeos das amostras de enzimas foram avaliadas de acordo com sua capacidade hidrolítica frente aos substratos presentes na tabela 5.

Tabela 5: Substratos utilizados nas com hidrólises com SDAf, suas respectivas enzimas alvo e curvas de calibração utilizadas nos cálculos.

Substrato	Enzimas alvo	Curva de calibração
Amilopectina de arroz	amilase	glucose
Arabino galactana	β - galactosidase	galactose
Arabana de maçã	L-arabinana	arabinose
Café cereja (Sementes)	galactomananase	manose
Celulose bacteriana	celulase	glucose
Celulose de <i>Pinus taeda</i>	celulase	glucose
Fitoglicogênio de milho	glucosidases	glucose
Goma guar	manosidase	manose
Hemicelulose de bagaço de cana	xilanase/mananase	xilose
Inulina	inulinase	frutose
<i>Neurospora crassa</i> (parede celular)	β -glucanases	glucose
Pectina cítrica	pectinase	galactose
Pululana	α - glucosidase	glucose
Xiloglucanase de tamarindo	α - glucosidase	glucose

A hidrólise ocorreu por 24 h (45 °C/ 140 rpm), contendo 500 μ L de substrato 10 mg/mL, 40 μ L de tampão acetato de sódio 1 mol.L⁻¹ pH 5,0, e quantidade de enzima equivalente a 1000 μ g de proteínas. Foi completado com água destilada para obter o volume final em 1 mL.

Posteriormente foram coletadas 100 μL de amostras, nas quais foi adicionado 400 μL de etanol absoluto. Foram agitadas vigorosamente e centrifugadas por 15 min a 13.000 rpm (14.360 g). Do sobrenadante, foi coletado 400 μL que foram secos em concentrador de amostras (Labconco Centri Vap Concentrator) a 40 °C sob vácuo por 2:30 h. As amostras foram re-suspendidas em 40 μL de solução etanol:água 1:1 (v/v), as quais foram utilizadas para realização da CCD utilizando volume conhecido de amostras. No que restou da hidrólise de 24h foi realizada a determinação dos açúcares redutores, segundo método do DNS descrito no item 4.4.2.1. e de açúcares totais pelo método Fenol Sulfúrico descrito no método 4.4.2.2.

4.5.3 Cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando cromatoplasas Merck de sílica-gel 60. Para os polissacarídeos foi utilizada como fase móvel uma mistura recém-preparada de isobutanol, ácido acético e água destilada na proporção 28:10:12 (v/v). Foi utilizado o revelador orcinol sulfúrico a quente (250 mg de orcinol/45 mL de metanol + 2,5 mL H_2SO_4), seletivo para carboidratos e seus produtos de degradação para as placas contendo os polissacarídeos. Foram utilizados como padrões soluções de: Oligossacarídeos de xilose (XOS), arabinose, glucose, frutose, manose, sacarose, ramnose, ácido galacturônico.

Para as análises de CCD da atividade da fosfatase alcalina foi utilizada como fase móvel uma mistura de isopropanol, ácido acético e água destilada na proporção 10 : 9 : 11. Nas placas foram adicionadas amostras de SDAf diluídos 1:10 após incubação 40°C por 5, 10 e 15 minutos. Essa incubação foi feita com 5 μL SDAf diluídos 1:10, tampão Tris-Glicina 50 mM pH 8.8 contendo ZnCl_2 1 mM e PNPP 50 mmol.L^{-1} . Como padrão foram utilizados p-nitrofenil fosfato, p-nitrofenil livre, pirofosfato e glicerofostato de sódio. Foi utilizado o reagente Vaughn como revelador.

4.5.4 Determinação de fosfatases alcalinas

Com o objetivo de comparar o SDAf como potencial fonte de fosfatase alcalina, foram realizados experimentos com outras principais fontes descritas na literatura, são estas: intestino de galinha, moela de galinha, leite de vaca e hepatopâncreas de camarão (CHUANG; SHIH, 1990; ROY; GUPTA, 2000; UPADHYAY; VERMA, 2015)

4.5.4.1 PREPARAÇÃO DO INTESTINO E MOELA DE GALINHA

Foram utilizadas partes do sistema digestório de galinha, como o intestino (43,92 g no total) e moela (50,89 g no total), as quais estão indicadas pelas setas na figura 11. A preparação foi baseada na metodologia de CHANG; MOOG (1972).

Figura 11: Parte do sistema digestório de uma galinha. As partes utilizadas estão indicadas pelas setas.



Primeiramente foram retiradas todas as partes gordurosas e o intestino e moela foram limpos com água destilada e homogeneizados com a utilização de um ultra turrax (Omni 125 Tissue Master). A amostra de intestino foi dividida em duas

partes iguais, nas quais foram adicionados 5 mL de tampão Tris-glicina 90 mmol.L⁻¹ pH 8 contendo Zn e Mg e 20 mL de água destilada. Em uma das partes foi também adicionado 0,5 mL de PMSF (fenil metil sulfonil fluoreto) 1 mmol.L⁻¹ como inibidor de protease. Foi utilizado 2,5 g de moela na qual foi adicionado 2 mL de tampão Tris-glicina 90 mmol.L⁻¹ pH 8 contendo cloreto de Zn e Mg. Posteriormente, em todas as amostras foram adicionados 165 mL de n-butanol e estas foram centrifugadas a 40 °C durante 10 min a 5000 rpm. Os sobrenadantes foram utilizados nas análises posteriores: determinações protéicas e da enzima fosfatase alcalina frente ao substrato pNFF.

4.5.4.2 PREPARAÇÃO DO LEITE DE VACA

Neste procedimento foi utilizado leite de vaca fresco não pasteurizado. Após chegada do leite ao laboratório a amostra foi dividida em duas partes, na primeira foi imediatamente reduzido seu pH nativo (6,75) para 4,7 com a utilização do tampão de ácido clorídrico para precipitação da caseína. Esta foi centrifugada e separado seu sobrenadante (soro) do precipitado. Após a realização deste processo, seu pH foi novamente normalizado para 6,75. Na segunda amostra não foi realizado nenhum procedimento, as duas amostras foram guardadas em refrigeração até posterior uso.

4.5.4.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÃO

Neste ensaio com o auxílio de um bisturi, foram retirados os exoesqueletos dos camarões da espécie *Litopenaeus vanammei* e localizados suas glândulas digestivas (hepatopâncreas) para serem utilizadas no experimento (figura 12).

Figura 12: *Litopenaeus vanammei* utilizado no experimento. Seta indicando a região onde está localizado o hepatopâncreas (glândula digestiva).



Após retiradas foram então adicionadas nessas glândulas digestivas tampão HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 7,8 em glicerol 50% contendo 1 mmol.L⁻¹ de cloreto de magnésio e 1 mmol.L⁻¹ de cloreto de zinco, mantidas em congelamento até posterior uso.

4.5.4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SDAF

As amostras de SDAf foram apenas normalizadas para a menor quantidade protéica dos ensaios (camarão, leite e galinha), neste caso 6,5 mg/mL⁻¹, e incubadas com o substrato pNFF.

4.5.4.5 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO POR PNFF

A determinação de atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi realizada utilizando o substrato *p*-nitrofenilfosfato (pNFF). Após a determinação de proteína de todas as amostras pelo método de Lowry, foram então normalizadas para a quantidade equivalente ao menor resultado em mg/mL (neste caso a 6,5 mg/mL). Em tubos de vidro foram adicionados 10 µL das amostras equivalente a 62 µg de proteína, 50 µL de tampão glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e 400 µL de substrato pNFF preparado em tampão glicina-NaOH 0,2 mol.L⁻¹ e pH 10,1, contendo 1 mmol.L⁻¹ de cloreto de zinco e 1 mmol.L⁻¹ de cloreto de magnésio, e H₂O q.s.p 500 µL. As

amostras foram incubadas a 40 °C em banho-maria, durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de NaOH 3 mol.L⁻¹ para cessar a reação e intensificar a coloração amarela, sendo monitoradas na sequência, as absorvâncias a 420 nm em espectrofotômetro. O branco da reação foi obtido da mesma forma, apenas adicionando água destilada no lugar da amostra. Como controle positivo da reação, foi utilizado 50 µL de uma solução de enzima fosfatase alcalina de intestino bovino comercial diluída em tampão glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹. A atividade da enzima foi monitorada de acordo com a curva de *pNP*.

4.6 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Foram realizadas cromatografias de troca iônica utilizando polímeros aniônicos e catiônicos de carboximetilcelulose, diaminoetilcelulose, aminoetilcelulose e celulose (controle), preparados a partir de PAVT – Pó de Algodão de Varredura Têxtil (técnica desenvolvida e patenteada pelo orientador no LQBB-UTFPR-Ecoville). Esses polímeros permitem a separação de proteínas por afinidade de carga. Foram adicionadas nas colunas contendo 50 mg das matrizes, alíquotas de 100 µL de suco digestivo diluídas 1:10 (v/v) as quais foram eluídas com tampão tris-HCl 90 mmol.L⁻¹ pH 8 contendo cloreto de zinco 1 mmol.L⁻¹ e cloreto de magnésio 1 mmol.L⁻¹. Após recolhimento das frações da total eluição da coluna com tampão (frações v0), foram adicionados 1 mL de acetato de amônio para segunda eluição (v1), com objetivo de recuperar o conteúdo enzimático das colunas. As frações foram analisadas de acordo com a determinação protéica e hidrólise frente a substratos *pNFF*.

4.7 FRACIONAMENTO POR FORÇA IÔNICA DE SULFATO DE AMÔNIO

Para realização do método foi necessária a preparação de uma solução saturada de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ adicionando 70,7g de sulfato de amônio anidro e água destilada q.s.p. 100 mL com pH ajustado para 5 com H₂SO₄ diluído. Foi selecionada a enzima controle sem diluição no qual foi colocada com as

seguintes quantidades da solução de sulfato de amônio e água demonstradas na tabela 6 a seguir.

Tabela 6: Quantidades em μL colocadas nas amostras.

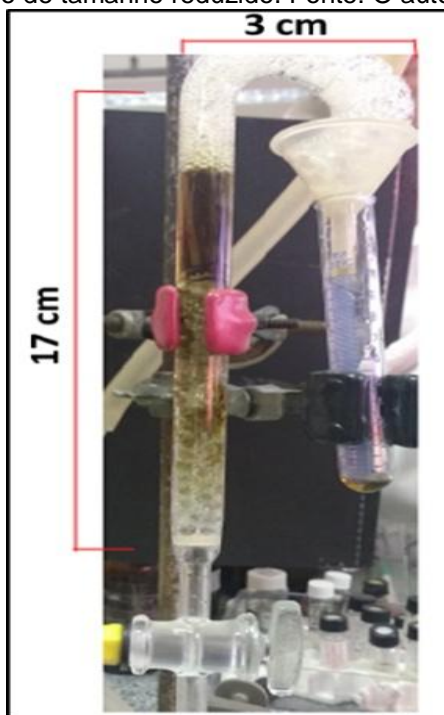
	SDAf	Solução de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Água destilada
a)	25	-	975
b)	25	100	875
c)	25	200	775
d)	25	300	675
e)	25	400	575
f)	25	500	475
g)	25	600	375
h)	25	700	275
i)	25	800	175
j)	25	900	75
k)	25	975	-

As amostras foram centrifugadas (Minispin Plus® Eppendorf) por 10 minutos, seus sobrenadantes drenados cuidadosamente e os precipitados normalizados para 1 mL com solução saturada de sulfato de amônio pH 5. Foi então medida a quantidade de proteínas e checados a sua atividade frente ao substrato pNFF para testar se houve enriquecimento das enzimas fosfatases alcalinas diante desta técnica.

4.8 SISTEMA DE PURIFICAÇÃO POR ESPUMAÇÃO (FOAMING)

Os ensaios com os sucos digestivos do *A. fulica*, foram realizados em uma coluna de espumação adaptada em tamanho reduzido (figura 13) para melhor desempenho do colapsamento das bolhas, permitindo o uso de menor quantidade de enzimas.

Figura 13: Coluna de espumação de tamanho reduzido. Fonte: O autor



Inicialmente foram realizadas diluições 1:50 (v/v) com água, e com soluções de saponina (0,12 e 0,25 mg/mL) do SDAf controle com intuito de testar o melhor desempenho frente ao colapsamento das bolhas. Na coluna foram adicionados 8mL do SDAf separadamente, então o gás nitrogênio foi liberado em fluxos variando de 5 a 20 mL.min⁻¹ controlados por um fluxímetro. O tempo de experimento foi contabilizado a partir da colocação integral do volume de amostra até o final da capacidade de espumação pela coluna. As frações de 1 mL “espuma” e “retida” na coluna foram recolhidas em provetas com graduação de 10 mL. Para a mensuração do volume da fração “espuma”, foi necessário aguardar o completo colapsamento das bolhas formadas durante o processo. A funcionalidade do sistema de purificação por espumação foi monitorada através de determinação proteica e por atividade enzimática.

4.9 ELETROFORESE

Foi realizada a técnica de eletroforese em Cellogel, fitas em acetato de celulose, para separação e identificação do perfil protéico do SDAf. Nas fitas foram adicionados os sucos enzimáticos, o padrão de ALP e albumina bovina (BSA). Na cuba eletroforética horizontal de construção caseira foi adicionado tampão Tris-Glicina $0,1 \text{ m.mol.L}^{-1}$ pH 9 para a corrida que durou cerca de 2 horas e meia a 80 v/0,8 mA. Foram utilizados os corantes ABF (azul de bromofenol) e XC (xilenocianol) como marcadores para monitorar o progresso da eletroforese.

Para o revelado do zimograma da fosfatase alcalina, o gel de acetato de celulose (Cellogel) foi distendido sobre uma placa de vidro depositada na bandeja do Lumatron (negatosacópio), no qual foi justaposta uma tira de papel de filtro pré-umedecida com uma solução do substrato (pNFF a 2 mM) contendo MgCl_2 e ZnCl_2 , cofatores essenciais para atividade da fosfatase alcalina. Para o revelado final a fita de Cellogel foi submersa em solução fixadora de proteínas com TCA 10% (Ácido Tricloroacético a 10 g%) por 5 minutos em agitação, lavada 2 vezes com água destilada e em seguida foi tingida com o corante Coomassie Brilliant Blue (mix 1:1 "G" + "R") em metanol e água (60:40 v/v). Após corada foram realizadas duas lavagens por 30 minutos deste mesmo solvente como solução de descoloração de fundo.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão das replicatas avaliadas para coeficiente de variação menor que 5%. As diferenças foram analisadas por teste t de Student, por ANOVA e teste de Tukey e as curvas analíticas calculadas por teste de correlação de Pearson, considerando valores de $P < 0,05$. As análises foram efetuadas com os softwares Microsoft Office Excel 2010 e GraphPad Prisma 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Logo após à chegada dos exemplares de *Achatina fulica* ao LQBB, os moluscos coletados foram pesados, separados em três grupos e acondicionados em caixas plásticas adaptadas. Em cada caixa foi adicionada uma placa contendo água com o objetivo de manter a hidratação dos animais (figura 14) e assim foram mantidas a 25°C na incubadora tipo B.O.D. A alimentação foi administrada 1 vez ao dia com os alimentos específicos (celulose; celulose + glicerofosfato; ou inulina + pectina), durante 10 dias. A higienização das caixas e conchas dos moluscos foi realizada a cada 3 dias.

Figura 14: Grupo de *A. fulica* mantido em caixa plástica adaptada. Fonte: O autor.



Os três grupos de *A. fulica* foram pesados logo após a chegada ao laboratório, 6 dias depois e antes da coleta de suas enzimas gástricas para avaliar se houve ganho de massa corporal conforme a tabela 7.

Tabela 7: Peso em gramas dos 3 grupos ao longo do experimento.

Grupo	Alimento	1º dia	6º dia	10º dia
1	Alface	386,23	368,85	361,48
2	Alface + glicerofosfato de sódio	395,19	411,95	410,98
3	Batata yacon e Casca de Maça	382,08	391,41	378,69

Nota-se a diminuição da massa corporal em 2 grupos. Alguns fatores podem ter influenciado neste resultado, um deles a desidratação, visto que os *A. fulica* habitam locais extremamente úmidos na natureza, condição difícil de reproduzir em cativeiro. Outro fator a ser considerado é o estresse dos indivíduos devido à manipulação exigida e característica do local onde foram mantidos. Entretanto houve maior perda de peso em gramas no grupo 1 com o total de 24,82 g ($p=0,02$), comparado ao grupo 3 o qual obteve perda de 3,39 g ($p=0,002$). devido a postura de aproximadamente 130 ovos de um dos moluscos deste grupo.

Após o abatimento dos animais ocorreu a coleta de suas enzimas que foram mantidas imediatamente em banho de gelo. Foram obtidos aproximadamente 8 mL de suco digestivo de cada grupo, que foram centrifugados e divididos em 4 frascos dos quais 1 foi liofilizado e os outros foram congelados. O material retirado dos *A. fulica* de cada grupo apresentou coloração distintos claramente visíveis a olho nu como na figura 15 a seguir.

Figura 15: Amostras dos sucos gastrointestinais dos *A. fulica* dos três grupos alimentados com diferentes indutores : Glicerofosfato, Inulina+pectina e controle, respectivamente. Fonte: O autor



Acredita-se que os diferentes alimentos interferem na coloração do suco digestivo. Em razão disso foi efetuada a análise por UV- VIS em região espectral de 200 a 800 nm demonstradas nas figuras 16,17,18 a seguir.

Figura 16: Espectro UV-VIS do SDAf controle.

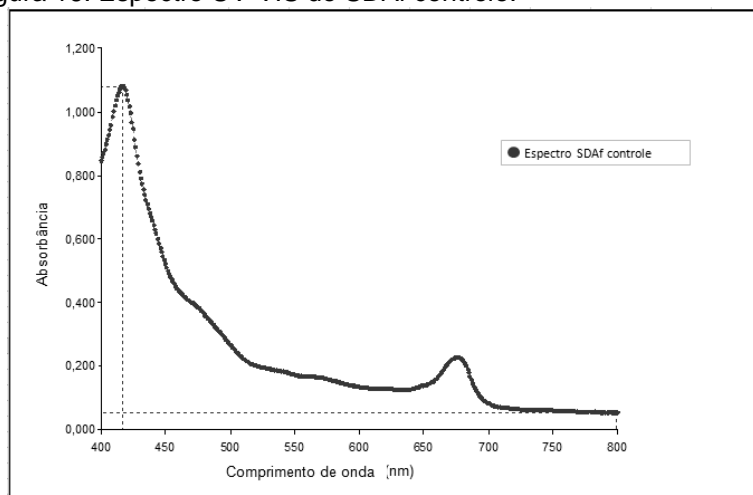


Figura 17: Espectro UV-VIS do SDAf Gli-P

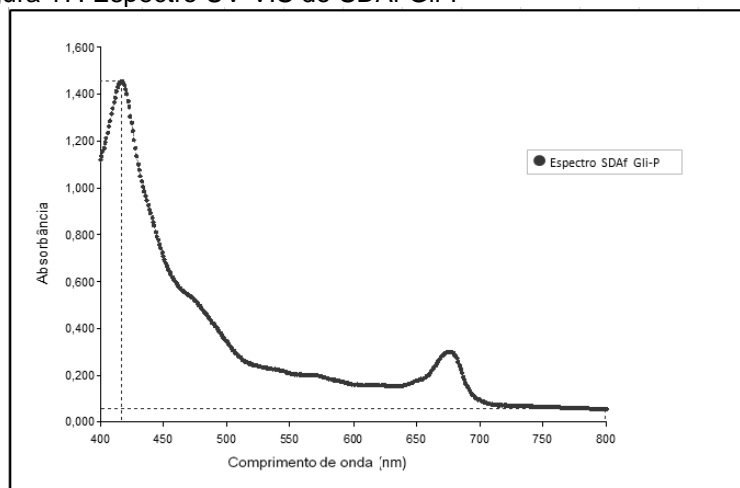
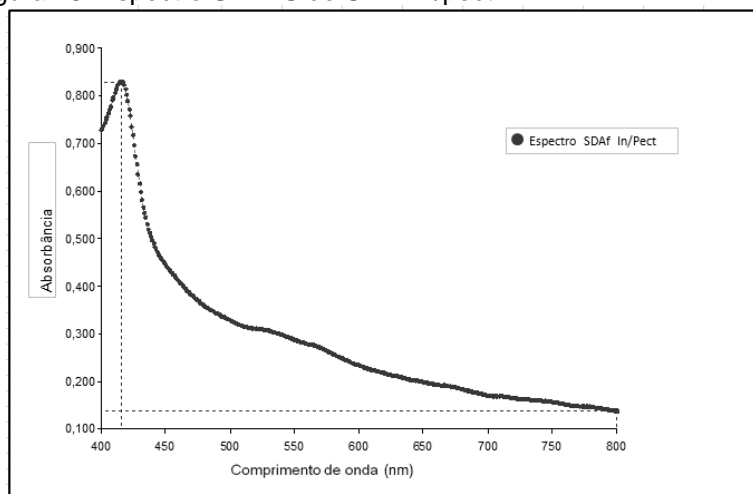


Figura 18: Espectro UV-VIS do SDAf in/pect.



De acordo com a análise do SDAf em UV-Vis (400 a 800 nm) nota-se que houve influência na pigmentação das amostras devido à clorofila, identificada por dois parâmetros importantes. O primeiro é a banda de absorção no comprimento de onda de 400 a 420 nm geralmente encontrado nos derivados do tipo porfirina/clorina, seguido da segunda maior banda de absorção entre 650 a 700 nm, encontrado em derivados de clorofila a, presente apenas nas amostras de SDAf controle e Gli-P, os quais foram alimentados com folhas de alface (MAESTRIN et al., 2009). Outros pigmentos presente nas amostras de SDAf são provavelmente carotenoides os quais são encontrados tanto nas folhas de alface quanto nas cascas de maçã e batata yacon, identificados em comprimentos de onda de 400 a 500 nm, explicação plausível para a presença da primeira maior banda no espectro também na amostra inu/pect, havendo necessidade de uma caracterização mais aprofundada para analisar quais substâncias compõe o SDAf de cada grupo (MERCADANTE; RODRIGUES- AMAYA, 2001; SILVA, M. L. C. et al., 2010).

5.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas totais foi realizada pelos quatro métodos distintos anteriormente citados, os resultados estão na tabela 8 a seguir.

Tabela 8: Determinação de proteínas por diferentes métodos colorimétricos

	Biureto (mg/mL)	Bradford (mg/mL)	Lowry (mg/mL)	BCA (mg/mL)
Controle	229,67 ±4,52	138,7 ±2,98	195,79 ±2,22	204,16 ±2,10
Gli-P	246,93 ±1,81	131,28 ±3,82	179,13 ±6,22	202,92 ±1,75
In/Pect	183,84 ±3,91	85,68 ±3,34	114,12 ±2,53	138,25 ±1,17

O resultado utilizado como padrão para seguir na determinação de enzimas foi o obtido pelo método de Lowry (Folin-fenol-Ciocalteau) (LOWRY et al., 1951) por algumas vantagens que esta técnica apresenta, entre elas sua alta sensibilidade, detectando proteínas que contenham a partir de três ligações peptídicas, menor quantidade de amostra utilizada no método e menor custo (MIWA,

2003). O método de Bradford (BRADFORD, 1976), consiste em um método prático que exige poucas etapas de mistura e possui grande estabilidade calorimétrica. Apesar da sua alta sensibilidade e rapidez comparado técnica de Lowry, apresenta algumas desvantagens, como variação de absorvidade específica para diversas proteínas devido à baixa solubilidade, ou baixo peso molecular das mesmas, além da dificuldade de reprodução de resultados devido ao grau de pureza do corante utilizado (Cromassie Brilliant Blue), o que prejudica a padronização dos resultados (DUHAMEL; MEEZAN; BRENDEL, 1981; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). O método do Biureto (GORNALL et al., 1949), apesar de rápido, de utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, não possui alta sensibilidade como os outros métodos testados (JENZANO et al., 1986). O método do Ácido Bicinconínico (BCA) obteve resultados semelhantes ao método de Lowry, porém devido à necessidade de incubação das amostras e maior custo do método, foi optado pela técnica do Lowry.

5.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

Os cálculos das quantidades de açúcares redutores e totais liberados nos ensaios polissacarídeos ($\mu\text{g}/\text{ensaio}$) foram realizados a partir da equação das retas geradas através das curvas analíticas de determinados açúcares. Os ensaios com hemicelulose foram analisados a partir da curva de xilose, por possuir em sua estrutura principalmente polímeros de pentoses (como xilose e arabinose). (BRIENZO, 2010). As hidrólises da celulose bacteriana e de *Pinus taeda* foram calculadas a partir da curva de glucose, por ser um homopolissacarídeo composto por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (ARANTES; SADDLER, 2010). Os ensaios com pectina foram calculados a partir da curva de galactose, já que é constituída por uma cadeia principal de ácidos D-galacturônicos, ligados a α -1,4 a qual possui regiões ramificadas onde há presença de açúcares neutros como a galactose (BOBBIO; BOBBIO, 2003; WANG; CHEN; LÜ, 2014) e os ensaios com o substrato inulina foram calculados a partir da curva de frutose, por apresentar em sua estrutura química uma mistura heterogênea de polímeros de frutose (MANSO et al., 2008). Para determinar os açúcares do substrato

amilopectina de arroz e fitoglicogênio de milho, foram utilizadas curvas de glucose, pois carboidratos de armazenamento de cereais possuem monômeros de glucose, com ligações α -1,6 de cadeia ramificada (CURÁ; JANSSON; KRISMAN, 1995). O polissacarídeo arabino galactana foi calculado a partir da curva de galactose por ser constituído por unidades de D-galactose interligadas β - 1, 4 e arabana de maçã, a partir da curva de arabinose pois é composta por uma cadeia ramificada por unidades de L-arabinose ligadas α - 1,5 e α - 1, 3 (CORREA; FONTANA, 1971). O polissacarídeo pululana, produzido a partir do fungo *Aureobasidium pullulans* e a parede celular do fungo *Neurospora crassa* também tiveram seus resultados determinados a partir da curva de glucose pois possuir unidades de glucose ligadas α - 1, 4 e β -1,4 respectivamente, em sua composição (MAGNANI; CASTRO-GOMÉZ, 2008; RHIM, 2003). Para as xiloglucanas de tamarindo foi usada curva de glucose pois estruturalmente, as xiloglucanas tem uma cadeia principal de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1, 4 (CARPITA; MCCANN, 2000) e na goma guar os valores de açúcares foram obtidos a partir da curva de manose, pois são formados de cadeias lineares de manose β -1,4 (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014).

5.2.1 Quantificação de açúcares redutores

Açúcares redutores são carboidratos que possuem seu grupo carbonílico livre, capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em solução alcalina ocorrendo apenas com monossacarídeos em sua forma linear. Destes açúcares na indústria os que possuem grandes destaques são a glicose e frutose (NELSON; COX, 2006; SILVA, R. N. et al., 2003). A resposta frente à liberação de açúcares redutores pelo método DNS nos ensaios contendo os diferentes substratos e os três *pool* enzimáticos distintos, incubados por 24h, calculados à partir das curvas de calibração dos açúcares equivalentes ao substratos testados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Concentração valores de açúcares redutores ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) liberados nos substratos em 24h. Expressos como média (\pm desvio padrão). Tukey/anova comparadas ao controle * $P<0,05$ ** $P<0,01$ *** $P<0,001$ **** $P<0,0001$ (continua)

Substratos	Controle	Gli-P	In/Pect
Amilopectina de arroz	292,3 ($\pm 0,001$)	240,51 ($\pm 0,0$)****	305,89 ($\pm 0,004$)****
Arabana maçã	1,73 ($\pm 0,004$)	2,13 ($\pm 0,003$)	2 ($\pm 0,004$)
Arabinogalactana	1,010 ($\pm 0,0$)	1,067 ($\pm 0,0$)	0,897 ($\pm 0,0$)
Café cereja	2,0 ($\pm 0,001$)	3,55 ($\pm 0,0$)	5,89 ($\pm 0,004$)
Celulose bacteriana	126,5 ($\pm 0,001$)	101,4 ($\pm 0,004$)**	167,3 ($\pm 0,005$)***
Celulose P. taeda	11,02 ($\pm 0,002$)	4,74 ($\pm 0,01$)**	6,53 ($\pm 0,005$)*
Goma guar	2,41($\pm 0,0$)	4,78 ($\pm 0,0$)**	4,02 ($\pm 0,0$)**
Fitoglicogênio de milho	364,3 ($\pm 0,004$)	352,17 ($\pm 0,002$)**	342,56 ($\pm 0,003$)**
Hemicelulose	163,48 ($\pm 0,005$)	176,08 ($\pm 0,001$)	166,180 ($\pm 0,01$)
Inulina	9,5 ($\pm 0,0$)	9,15 ($\pm 0,0$)	10,46 ($\pm 0,0$)
Neurospora crassa (parede celular)	165,25 ($\pm 0,002$)	154,6 ($\pm 0,01$)	69,23 ($\pm 0,005$)****
Pectina	277,3 ($\pm 0,001$)	242,7 ($\pm 0,0$)*	334,6 ($\pm 0,0$)
Pululana	148,64 ($\pm 0,0$)	183,128 ($\pm 0,001$)**	197,48 ($\pm 0,003$)***
Xiloglucana de tamarindo	228,97 ($\pm 0,002$)	264,23 ($\pm 0,001$)***	237,82 ($\pm 0,001$)**

A melhor resposta pode ser observada frente ao polissacarídeo fitoglicogênio de milho, calculado a partir de uma curva de glucose. Geralmente este polissacarídeo é hidrolisado pelas enzimas glucosidases, das quais tiveram presença confirmada nas hidrólises altamente significativas dos substratos pululana e xiloglucana de tamarindo. A discrepância entre os resultados com o substrato celulose de *Pinus taeda* e celulose bacteriana ocorre devido as diferenças estruturais das fibras, havendo uma hidrólise facilitada no substrato de origem bacteriana (SILVA, M. D. P. M. D.; TEREZI, 1993). Assim como a celulose, o substrato hemicelulose teve hidrólise significativa com os três SDAf, não sendo observadas diferenças relevantes entre eles, bons resultados frente a esses substratos já eram previsíveis pela alimentação natural desses organismos (predominantemente herbívora) o que supõe a presença de mecanismo enzimático preparado para digerir esse tipo de substrato (FISCHER; COLLEY, 2005).

Ocorreu uma alta taxa de hidrólise do substrato pectina cítrica, certificando a presença da enzima pectinase nos *pool* enzimáticos, com destaque ao SDAf Inu/Pect, com diferenças significativas de acordo com o teste Tukey entre os três SDAf distintos, o que demonstra eficiência, neste caso, da indução alimentar nos moluscos. Outro resultado relevante foi a hidrólise com o polissacarídeo inulina, apesar de valores baixos de açúcares liberados houve um resultado ligeiramente superior no SDAf que obteve inulina como alimento, entretanto não houve diferença estatística entre os resultados.

Foram verificados valores expressivos de açúcares liberados na hidrólise com o substrato *Neurospora crassa* (parede celular). As paredes celulares dos fungos Ascomycetos, basicamente compostas de β - glucanos e quitina (MANOCHA; COLVIN, 1967), indicam a presença de enzimas β - glucanases. Hidrólise intensa no substrato amilopectina de arroz, indicando a presença de amilase, já confirmada há algumas décadas em experimentos anteriores (PROSSER; VAN WEEL, 1958). Essas hidrólises podem ser observadas na cromatografia em camada delgada (CCD 5.3.1) .

5.2.2 Quantificação de açúcares totais

Os valores de concentração de açúcares totais por ensaio encontrados pelo método fenol-sulfúrico, calculados a partir das curvas de açúcares equivalentes estão apresentados na tabela 10 (valores da hidrólise do substrato sem a enzima já descontados da média final).

Tabela 10: Concentração valores de açúcares redutores ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) liberados nos substratos em 24h. Expressos como média (\pm desvio padrão). Tukey/anova comparadas ao controle * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ **** $P < 0,000$ (Continua)

Substratos	Controle	Gli-P	In/Pect
Amilopectina de arroz	-103,90(\pm 0,05)	31,11 (\pm 0,008)*	52,94 (\pm 0,03)***
Arabana maçã	40,95 (\pm 0,01)	97,26 (\pm 0,02)*	40,42 (\pm 0,009)
Arabinogalactana	-16,87 (\pm 0,01)	75,47 (\pm 0,03)*	39,76 (\pm 0,04)

(conclusão)

Café cereja	-1,07 ($\pm 0,02$)	5,78 ($\pm 0,01$)	16,07 ($\pm 0,01$)
Celulose bacteriana	111,44 ($\pm 0,01$)	68,28 ($\pm 0,02$)*	149,46 ($\pm 0,001$)
Celulose <i>P. taeda</i>	102,16 ($\pm 0,03$)	111,60 ($\pm 0,04$)	27,80 ($\pm 0,06$)
Goma guar	110,85($\pm 0,01$)	320,46 ($\pm 0,04$)***	180,46 ($\pm 0,002$)
Fitoglicogênio de milho	87,34 ($\pm 0,02$)	81,83 ($\pm 0,02$)	126,39 ($\pm 0,01$)
Hemicelulose	87,34($\pm 0,01$)	81,03 ($\pm 0,02$)	126,39($\pm 0,06$)
Inulina	108,41 ($\pm 0,01$)	108,78 ($\pm 0,03$)	91,27 ($\pm 0,01$)
Neurospora crassa (parede celular)	20,94 ($\pm 0,02$)	76,40 ($\pm 0,01$)****	40,43 ($\pm 0,03$)****
Pectina	59,54 ($\pm 0,01$)	36,62 ($\pm 0,01$)	99,99 ($\pm 0,02$)
Pululana	250,91 ($\pm 0,01$)	241,48($\pm 0,01$)	324,11 ($\pm 0,01$)
Xiloglucana de tamarindo	-35,98 ($\pm 0,01$)	16,63 ($\pm 0,008$)*	-60,78 ($\pm 0,001$)**

Com a maior liberação de açúcares totais no polissacarídeo pectina pelo SDAf inu/pect verifica-se novamente associação da indução alimentar dos moluscos com a efetividade de hidrólise do substrato alvo. Entretanto foram encontrados valores menores na hidrólise com o SDAf inu/pect no substrato inulina, provavelmente por ter sido administrado os dois alimentos (batata yacon e casca de maçã) simultaneamente, ocorrendo a preferência do alimento indutor da pectinase pelos indivíduos.

Foram encontrados valores significativos na hidrólise frente ao polissacarídeo pululana, com diferença significativa entre os três SDAf.

Diferentemente do resultado encontrado na liberação de açúcares redutores dos substratos celulose bacteriana e celulose de *Pinus taeda*, não houve grande discrepância entre os dois substratos quanto a liberação de açúcares totais.

Os valores negativos frente a liberação de açúcares em alguns polissacarídeos, indicam que a hidrólise do substrato sem a presença enzimática (branco) foram maiores que os hidrolisados, como no caso do “controle” do amilopectina de arroz, café cereja e arabino galactana e no “controle” e “inu/pect”, da xiloglucana de tamarindo.

5.2.3 Análise por cromatografia em camada delgada

Foram realizadas CCD's para determinar as ações enzimáticas do SDAf nos substratos polissacarídicos. Este procedimento possibilita a visualização de modo qualitativo das hidrólises. A figura 19 está numerada e descrita na tabela 11.

Figura 19: CCD's ilustrando a ação enzimática do SDAf nos substratos polissacarídicos.

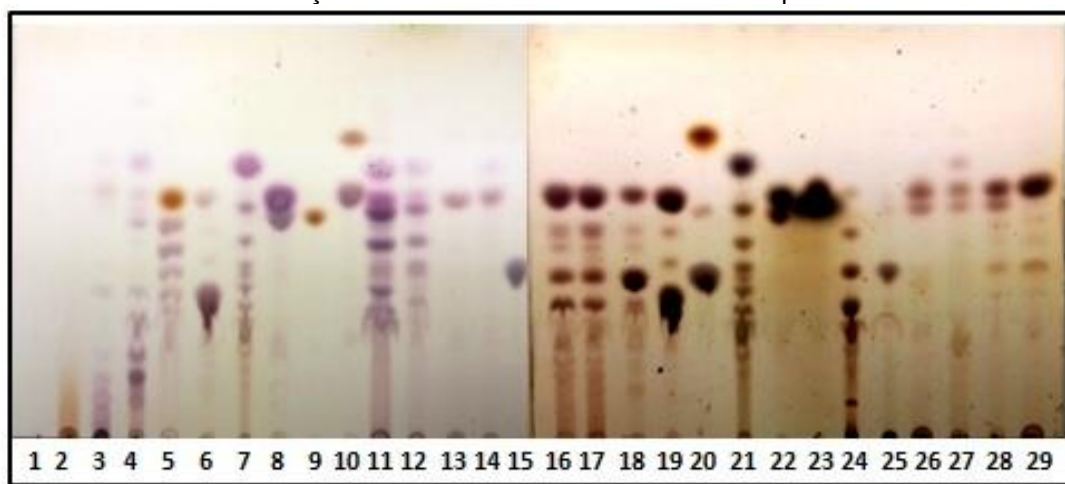


Tabela 11: Substratos e padrões numerados nas CCD's para determinação de atividade enzimática.

1-SDAf Controle	16- Fitoglicogênio de milho
2- Inulina	17- Amilopectina de arroz
3- Goma guar	18- Pululana
4- xiloglucana de tamarindo	19- Glucose+ Maltose
5- frutose LOS	20- Ramnose+ ácido galacturônico
6- Glucose+maltose	21- Xilose + XOS
7- Xilose + XOS	22- Arabinose galactose
8- Galactose+ arabinose	23- Manose
9- Sacarose	24-Celooligossacarideos
10- Manose + ramnose	25- Pectina cítrica
11- Hemicelulose de bagaço de cana	26- Café cereja (sementes)
12- Hemicelulose de sabugo de milho	27- Arabana de maçã
13- Celulose bacteriana	28- <i>Agaricus</i> SP.
14- Celulose de <i>Pinus taeda</i>	29- <i>Neurospora crassa</i>
15- Ácido galacturônico	-

Na hidrólise dos substratos celulose de *Pinus taeda* e celulose bacteriana é possível verificar a liberação de glucose livre e traços de um provável octamaltossacarídeo celulase. Nos substratos fitoglicogênio de milho, amilopectina de arroz, houve uma hidrólise intensa gerando glucose livre e outros malto sacarídeos. Nos fungos *Agaricus* sp. (basidiocarpo inteiro) e *Neurospora crassa* (paredes celulares), embora sejam fungos distintos, foi possível perceber hidrólises semelhantes, com liberação glucose livre com traços de outros oligossacarídeos. Nas Hemicelulose de sabugo de milho e de bagaço de cana, ocorreu a liberação de xilose livre, arabinose, de uma larga série de xilooligossacarídeos até xilohexaose. A hidrólise da pectina cítrica demonstra o ácido galacturônico livre, mais traços de oligopectossacarídeos. Na Arabana de maçã e arabinogalactana nota-se a presença de arabinose e galactose livres. Houve uma notável hidrólise no substrato pululana liberando glucose e ácido galacturônico. No substrato inulina de tubérculos de dália, aparecem apenas fracos traços de frutose livre e frutooligossacarídeos de alto grau de polimerização.

5.3 TESTE P-NITROFENIL-GLICOSÍDEOS

A temperatura e tempo de incubação das amostras foram definidas com base na literatura (GÜRKÖK et al., 2010; TIBONI, 2015) para assegurar que as respostas obtidas não estivessem na região de platô, onde há o esgotamento do substrato limitando a reação. Foram realizados ensaios com intervalos de tempo, 5, 10, 20 e 30 minutos a 50°C, entretanto seguindo o que sugere a literatura o tempo 10 minutos foi aceito como o de escolha padrão. A quantidade de enzimas (μg) de SDAf utilizada foi determinada de acordo com o potencial hidrolítico dos substratos frente as enzimas, sendo determinados 250 μg de proteína para β -galactosidase, α -galactosidase, α -fucosidase, α -glucosidase, α -xilosidase, α -manosidase, α -arabinofuranosidase, 50 μg para α -glucosidase e 25 μg para β -glucosidase e β -manosidase. Na tabela 12 estão apresentadas as respostas de atividade enzimática em U/mL do meio para comparar os resultados entre os três *pool* de enzimas, diante da ação dos PNF-glicosídeos. Já na tabela 13 estão apresentados as atividades específicas em U/mg de proteína. Embora haja atividade enzimática em todos os

substratos PNF, comparando os resultados em U/ mL notamos atividades superiores da β – manosidase e β – glucosidase indicando possuir potencial hidrolítico para cadeias de manose e glucose, compatíveis com testes enzimáticos utilizando SDAf encontrados na literatura frente a substratos P-nitrofenil- glucosídeos (CARDOSO, ALEXANDER M. et al., 2012; TIBONI, 2015), interessante para substratos polissacarídicos como as hemiceluloses ricas em galactomananas e xiloglucanas. Se comparados os valores de U/mL dessas enzimas frente a hidrólise com os três SDAf distintos Controle, Gli-P, Inu/Pect houve maior atividade no SDAf Controle com diferença significativa tanto nas β – manosidases enquanto nas β – glucosidases. Com exceção da β – manosidase, em todos os ensaios houve menor U/mL do substrato com o SDAf Inu/Pect, devido a composição química dos alimentos a qual o grupo foi induzido, pois o *A. fulica* possui ampla variedade de enzimas celulolíticas tanto na sua microbiota natural quanto residente, o qual utiliza-as para processar matéria orgânica vegetal, principal fonte de alimento do molusco na natureza, degradando mais facilmente alimentos como a alface (PINHEIRO et al., 2015). Entretanto TIBONI (2015) encontrou valores superiores de atividade específica nas enzimas nas β – manosidases (561,99), β – glucosidases (327,08) e β – Galactosidades (16,29).

As enzimas β - glucosidades geralmente são obtidas por microrganismos como fungos e leveduras. SAHA, B. C.; BOTHAST (1996) induziram a atividade de β - glucosidades a partir do fungo *Candida peltata* (Y-6888) em diversos substratos, o melhor resultado obtido foi de 117 U/mL em caldo de cultura de xilose. Cerca de mil vezes menor que os valores obtidos encontrados no suco digestivo do molusco *A. fulica*. SAHA, BADAL C.; FREER; BOTHAST (1994) também testaram a eficiência da produção de β - glucosidades pelo fungo *Aureobasidium pullulans* (NRRL Y-12974) o qual o maior valor encontrado foi de 210 mU/mL no caldo de cultura de lactose.

Neste estudo também se destacou a alta produção da enzima β -galactosidade no suco digestivo do molusco, pois esta é uma enzima largamente utilizada na indústria de laticínios para a hidrólise de lactose em glicose. Um organismo muito utilizado para produção desta enzima é a levedura *Kluyveromyces marxianus*. BANSAL et al. (2008) utilizou diversos métodos de extração da β -galactosidade desta levedura (SDS-clorofórmio, sonicação, tolueno- acetona + albumina e homogeneização utilizando contas de vidro) e as atividades específicas

encontradas foram de 21 a 59 U/mL em 30 horas de incubação. BRAGA; GOMES; KALIL (2012) realizaram um estudo para otimização do meio de cultura da levedura *Kluyveromyces marxianus* para produção de β -galactosidase, e o maior resultado encontrado de atividade enzimática foi de 10,4 U/mL.

Tabela 12: Atividade enzimática pelo teste *P*-nitrofenil- glucosídeo. Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001

Enzimas	ATIVIDADE ENZIMÁTICA U/mL		
	Controle	Gli-P	Inu/Pect
α - Arabinofuranosidase	3.430,42 (±463,67)	4.044,16 (±474,38)	2.524,84 (±65,45)
α - Fucosidase	5.630,64 (±356,79)	4.935,30 (±131,20)*	3.409,08 (±117,99)****
α -Galactosidase	9.774,64 (±143,37)	7.387,65 (±328,43)***	7.121,58 (±383,62)****
β - Galactosidase	25.681,66 (±1.215,75)	24.135,70 (±2.060,12)	16.705,15 (±945,72)***
α - Glucosidase	3.906,14 (±360,49)	3.574,78 (±62,35)	2.455,49 (±64,14)***
β – Glucosidase	145.653,31 (±2.288,65)	114.454,08 (±9.081,69)**	112.371,86 (±2.522,59)***
β - Glucuronidase	67.939,34 (±4.395,81)	60.305,23 (±4.167,40)	50.041,78 (±3.284,72)**
α - Manosidase	1.222,76 (±84,42)	928,56 (±73,58)*	680,52 (±108,28)***
β - Manosidase	224.853,93 (±13.586,88)	163.671,04 (±146.005,51)*	185.516,51 (±7.471,45)*
α - Xilosidase	6.422,27 (±558,83)	5.557,74 (±288,85)	4.052,76 (±180,34)*

Tabela 13: Atividade específica pelo teste do *P*-nitrofenil- glucosídeo Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001.

Enzimas	ATIVIDADE ESPECÍFICA U/mg de proteína		
	Controle	Gli-P	Inu/Pect
α - Arabinofuranosidase	13,44 (±1,82)	17,31 (±2,03)	16,96 (±0,44)
α - Fucosidase	22,05 (±1,40)	21,12 (±0,56)	22,90 (±0,79)****
α -Galactosidase	38,28 (±0,56)	31,62 (±1,41)**	47,83 (±2,58)**
β - Galactosidase	100,58 (±4,76)	103,29 (±8,82)	112,20 (±6,35)
α - Glucosidase	15,30 (±1,41)	15,30 (±0,27)	16,49 (±16,94)
β – Glucosidase	570,45 (±8,96)	489,81 (±38,87)*	754,73 (±1,69)***
β - Glucuronidase	266,08 (±17,22)	258,08 (±17,83)	336,10 (±22,06)*
α - Manosidase	4,79 (±0,26)	3,97 (±0,46)	3,97 (±0,44)
β - Manosidase	38,28 (±53,21)	31,62 (±624,84)	47,83 (±50,18)
α - Xilosidase	25,15 (±2,19)	23,78 (±1,24)	27,22 (±1,21)

5.4 DETERMINAÇÃO DE FOSFATASES ALCALINA

5.4.1 Atividade da fosfatase alcalina entre as amostras

Foram determinadas as quantidades proteicas das amostras de SDAf, intestino de galinha, intestino de galinha com PMSF (fenil metil sulfonil fluoride), hepatopâncreas de camarão *Litopenaeus vannameii* e de leite de vaca não processado total e da amostra sem caseína pelo método de LOWRY et al. (1951). Após determinadas todas as amostras foram normalizadas para a menor quantidade protéica encontrada (6,5 mg/mL) para posterior incubação de 10 minutos com o substrato pNFF. Uma unidade da atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ Mol de produto por minuto na tabela 14 abaixo os resultados estão fixados em 10 minutos de incubação calculados a partir da curva de calibração de pNF.

Tabela 14: Concentração de proteínas e atividade das amostras por mg de proteínas a partir do substrato PNFF. Entre parênteses desvio padrão. Tukey/anova comparadas ao SDAf controle * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001 .

Amostra	mg/ mL de proteína	U/mL	U/ mg de proteína
SDAf Controle	191,00	80.4856,7	4213,91 (\pm 368,1)
SDAf GliP	155,30	83.5125,7	5387,91 (\pm 270,7)**
SDAf Inu/pect	120,5	81.3831,5	6781,93 (\pm 218,5) ****
Intestino de galinha	14,86	53.693,82	4049,31(\pm 315,9)
Intestino de galinha (PMSF)	13,26	73.400,52	4939,47 (\pm 282,6)
Moela de galinha	16,2	2.769,72	170,31(\pm 6,1)****
Hepatopâncreas de camarão	13,84	2.907,84	210,10 (\pm 3,56) ****
Leite de vaca (total)	29,8	1.596,81	54,91 (\pm 2,14) ****
Leite de vaca (sem caseína)	6,52	94,31	14,44 (\pm 0,95) ****

Embora a atividade enzimática (U/mL) do SDAf Gli-P tenha sido maior que os dois outros grupos, a atividade específica foi menor que o SDAf inu/pect, indicando que o indutor glicerofosfato de sódio borrifado no alimento deste grupo não foi

suficiente para o enriquecimento necessário do suco digestivo. Seguidamente aos valores dos SDAf's, as maiores atividades foram do intestino de galinha, no qual o PMSF, inibidor de protease, intensificou a atividade enzimática da fosfatase alcalina em 22%. Embora altos SHARMA; SHARMA; GUPTA (2000) encontraram valores maiores ao determinar a fosfatase alcalina de intestino de galinha. Apesar da menor quantidade de proteína (2,4 mg/mL), a atividade da fosfatase alcalina na amostra bruta foi de 834 U/mg de proteína por minuto. Já ROY; GUPTA (2000) determinaram a atividade específica no intestino de galinha encontrando valores protéicos maiores (50,4 mg/mL), atividade enzimática de 3230,88 U/mL e específica de 64,1 U/mg de proteína.

Aproximadamente 30% a 40% de fosfatase alcalina no leite está associada às membranas de glóbulos gordurosos, o restante da enzima está ligada às lipoproteínas em frações de leite desnatado. Neste estudo o leite de vaca não pasteurizado sem tratamento obteve melhor resultado que a amostra acidificada para precipitação da caseína. BILEN; GENÇER; ARSLAN (2015) encontrou valores maiores de atividade específica do leite de vaca (270 U/mg) após precipitação com n-butanol.

A atividade enzimática da fosfatase alcalina no hepatopâncreas do *Litopenaeus vannameii* foi alta embora sua atividade específica tenha sido mais baixa que a média encontrada na literatura (762-869 U/mg) (MOSS, S. M.; DIVAKARAN; KIM, 2001) mas deve ser considerada as diferentes condições de preparação da amostra.

Há uma diversidade de organismos procariontes e eucariontes produtores de fosfatase alcalina descritos na literatura. ÁSGEIRSSON; HARTEMINK; CHLEBOWSKI (1995) estudaram a ação enzimática da fosfatase alcalina do ceco pilórico do bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*), onde a maior atividade encontrada foi de 2777 mM/mg de proteína por minuto resultantes da purificação com resina Sephacryl S-300. Embora alguns organismos produzam em larga escala a fosfatase alcalina, difícil superar a quantidade obtida no suco digestivo do *Achatina fulica*.

Como outra estratégia de visualização da atividade da fosfatase alcalina foi realizada uma cromatografia em camada delgada, a qual foi vista em UV a 254 nm e posteriormente revelada com o reagente Vaughn (figura 20).

Figura 20: CCD ilustrando a atividade enzimática do SDAf com o substrato PNFF.

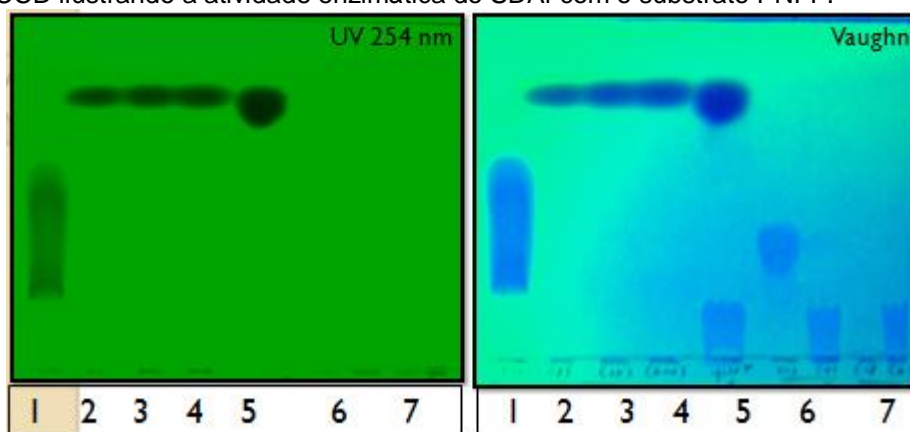


Tabela 15: Substratos e padrões numerados nas CCD's para determinação de atividade enzimática.

1- pNPP	5- P-nitrofenil + Pirofosfato
2- pNPP+ + incubação 5µL SDAf 5'	6- Glicerofosfato de sódio
3- pNPP+ + incubação 5µL SDAf 10'	7- Pirofosfato
4- pNPP+ + incubação 5µL SDAf 15'	-

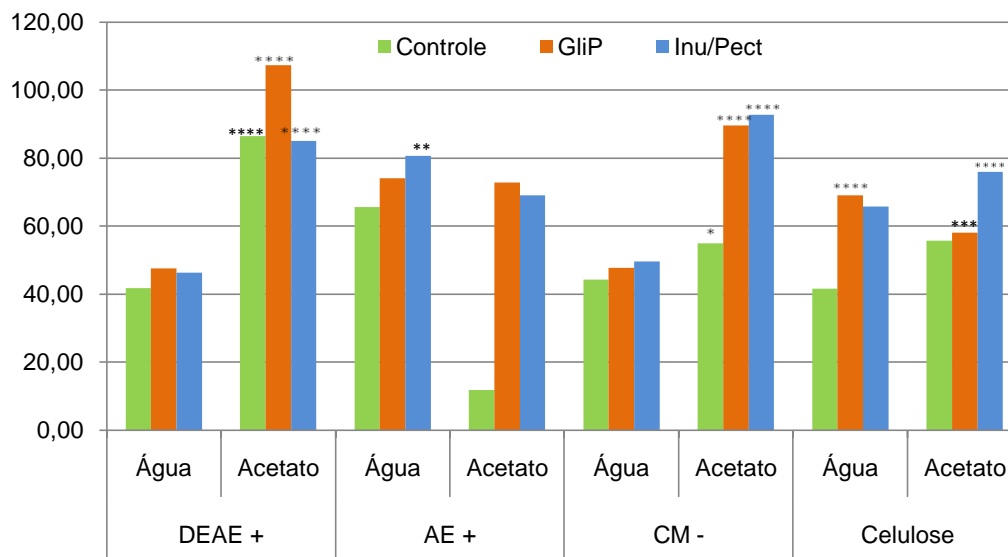
A cromatografia em camada delgada indica claramente hidrólise do substrato PNFF nos 3 incubados com os sucos enzimáticos, liberando o p-nitrofenil livre demonstrado no padrão número 5.

5.4.2 Separação por Cromatografia de troca iônica

Para a separação de proteínas de acordo com a carga elétrica foram utilizados polímeros aniônicos e catiônicos CM⁻ celulose, DEAE⁺ celulose e AE⁺ celulose. Este método serve como alternativa de purificação das enzimas de interesse neste trabalho. As frações eluídas foram avaliadas quanto a sua quantidade protéica tanto na fração com água quanto na recuperada com acetato de amônio para testar sua eficiência quanto à capacidade de purificação da fosfatase alcalina. Por conta disso foi utilizado o tampão Glicina – NaOH com pH alcalino objetivando a purificação dessas enzimas, por serem biomoléculas de carga negativa deveriam se prender nas matrizes catiônicas. Para confirmação da

eficiência deste método foram determinadas as atividades enzimáticas e específicas destas frações frente ao substrato pNFF demonstrada no gráfico 1 a seguir.

Gráfico 1: Atividade por mg de proteína do substrato pNFF nas frações eluídas com água e acetato de amônio nas colunas de troca iônica. Tukey/anova comparadas ao controle com água * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001.



As atividades específicas dos eluatos frente ao substrato pNFF não obtiveram melhoras na purificação da enzima fosfatase alcalina. Entretanto o resultado não foi satisfatório com nenhum polímero, pois as atividades específicas foram de em média 1% das atividades obtidas nos SDAf's brutos.

5.4.3 Fracionamento por força iônica de sulfato de amônio

Foi realizado o método de fracionamento por força iônica de uma solução de sulfato de amônio concentrado (100 a 900 μ L) nos ensaios com objetivo de enriquecer suco enzimático do *Achatina fulica*, foram então determinadas as quantidades protéicas e a atividade pelo substrato pNFF calculada a partir da curva de PNF.

Tabela 16: Resultados do fracionamento por sulfato de amônio do SDAf, quantidade de mg/ mL de proteína, atividade enzimática e específica. Entre parênteses desvio padrão das replicatas.

Amostra	mg/mL de proteína	Atividade enzimática U/mL	Atividade específica U/mg de proteína
a)	1,64	-0,1 ($\pm 34,78$)	-0,08 ($\pm 22,1$)
b)	2	17,29 ($\pm 42,42$)	8,64 ($\pm 20,21$)
c)	1,6	-16,29 ($\pm 22,48$)	-15,37 ($\pm 21,21$)
d)	1,62	-21,36 ($\pm 34,36$)	-13,18 ($\pm 21,11$)
e)	2,02	-26,24 ($\pm 42,85$)	-13,18 ($\pm 21,32$)
f)	7,8	-17,71 ($\pm 165,46$)	-2,27 ($\pm 21,22$)
g)	9,6	2220,98 ($\pm 203,64$)	231,35 ($\pm 21,2$)
h)	18,72	3768,24 ($\pm 397,11$)	146,2 ($\pm 21,28$)
i)	17,44	3768,24 ($\pm 369,95$)	216,06 ($\pm 20,23$)
j)	17,04	2714,47 ($\pm 361,47$)	159,3 ($\pm 21,21$)
k)	21,36	1257,33 ($\pm 453,11$)	58,86 ($\pm 21,21$)

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando são adicionadas grandes quantidades de sal, ou seja, em condições de elevada força iônica, as moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo a desidratação das proteínas. Em decorrência disso, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorre precipitação das proteínas. Esse processo também é conhecido por "salting-out" (LIMA, M. R. et al., 2008). A melhor purificação com sulfato de amônio foi na fração, no qual foi colocado no ensaio 600 μ L da solução tampão, 375 μ L de água e 25 μ L do suco digestivo do *Achatina fulica* "controle". Embora os resultados tenham sido notoriamente distintos, a purificação não foi tão eficiente para a enzima fosfatase alcalina, alvo deste experimento, comparada a outras técnicas como a de espumação.

5.4.4 Purificação pela metodologia de espumação

Para avaliar o desempenho do método, primeiramente utilizamos o SDAf controle.

Foram aplicados 8mL de SDAf diluídos 1:50 com água, com solução de 1,25 mg/mL de saponina e em solução de 2,5 mg/mL de saponina. Foram retiradas 3 a 5 frações dos espumados, mais a fração retida (final da coluna).

O tempo de colapsamento total das bolhas do SDAf foi em média de 30 minutos, per ensaio e o fluxo teve que ser acelerado conforme as retiradas das frações devido o decréscimo da quantidade de bolhas e maior lentidão na saída das frações, relacionada com a diminuição de liquido interno da coluna o qual dependeu de maior força de vazão para atingir a saída do direcionador de espuma. As frações foram mantidas em banho de gelo para realização da determinação do conteúdo total de proteínas e mensuração de atividades enzimáticas (β -glucosidase e fosfatase alcalina).

Tabela 17: Atividades específicas para as enzimas β -glucosidase e fosfatase alcalina. Tukey/anova comparadas aos SDAf controles * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001. (continua)

Fração	Concentração de proteína	Atividade específica U/mg de proteína	
	mg/mL	β - glucosidase	Fosfatase alcalina
Controle SDAf água	135,75	181,66 (\pm5,63)	3.076,77 (\pm37,56)
1	153,5	161,7 (\pm 20,76)	2.401,22 (\pm 226,12)*
2	150	188,21 (\pm 0,07)	3.096,77 (\pm 9,59)
3	147	156,99 (\pm 1,00)	2.347,88 (\pm 6,44) *
Retida	138,25	222,93 (\pm 2,23) *	2.970,11 (\pm 232,72)
Controle SDAf Saponina 0,12 mg/mL	136	213,54 (\pm9,80)	3.419,00 (\pm50,13)
1	153,25	192,36 (\pm 5,78)	3.006,88 (\pm 66,15)*
2	162,75	149,13 (\pm 10,11)**	3.774,55 (\pm 31,27)
3	161,75	172,93 (\pm 1,93)	2.630,44 (\pm 173,01)**
Retida	138	185,37(\pm 18,29)	3.521,22 (\pm 50,13)
Controle SDAf Saponina 0,25 mg/mL	145,5	194,32 (\pm23,38)	2.903,44 (\pm24,98)
1	152,75	222,93 (\pm 0,8)	2.845,66 (\pm 50,44)
2	159,5	179,70 (\pm 0,38)	2.394,55 (\pm 34,41)*
3	135	212,23 (\pm 0,07)	2.765,66 (\pm 31,58)
4	137,25	210,48 (\pm 18,60)	2.541,22 (\pm 310,97)

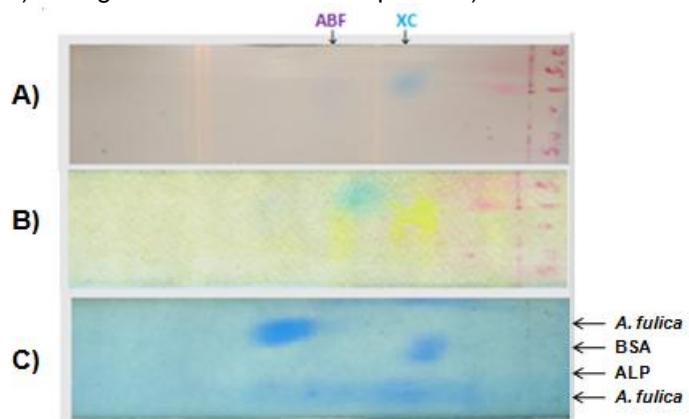
			(Conclusão)
5	109,25	186,73 ($\pm 1,62$)	2.947,88 ($\pm 37,87$)
Retida	109,5	195,39 ($\pm 63,25$)	3.443,44 ($\pm 65,84$)*

Das frações diluídas 1:50 com água a fração espumada que obteve um aumento da atividade da fosfatase alcalina, foi a fração 2, em um acréscimo de 0,5% da atividade específica entretanto não foi uma diferença significativa estatisticamente. Já comparada a atividade com o substrato PNF-glucosídeo, a fração que atingiu melhor atividade específica foi a fração retida da coluna, com aumento de 22% de atividade. Nas colunas espumadas com saponina 0,12 mg/mL para ALP o melhor resultado foi também da fração 2 com um aumento de atividade específica em 10,39%, porém este resultado não foi estatisticamente diferente. Para o substrato PNF- glucosídeo, não houve melhora na atividade. Já as frações espumadas com 0,25 mg/mL de saponina, a fração retida, obteve atividade 18,6% superior a fração controle, estatisticamente maior segundo o teste de Tukey, sendo eficiente para purificação da enzima fosfatase alcalina por este método.

5.5 CARACTERIZAÇÃO POR ELETROFORESE

A eletroforese com Cellogel foi realizada a 80 v e 0,8 mA e a corrida durou cerca de 2 horas e meia para ser finalizada. A figura 20 (A) exhibe os corantes indicadores quando chegam a parte central da fita, o que sugere a finalização da corrida eletroforética. O zimograma (B) com o substrato pNNF evidência a presença da enzima fosfatase alcalina em altas proporções no suco digestivo *Achatina fulica*, confirmando os resultados já obtidos nos cálculos de atividade enzimática e específica realizados anteriormente. A imagem C) refere-se ao revelado da fita com o corante Cromassie Brilliant Blue evidenciando a albumina bovina (BSA) e o SDAf.

Figura 21: Eletroforese e zimograma em Cellogel. A) -> B) -> C) em ordem operacional. A) Fita de Cellogel sem corante. B) Zimograma com o substrato pNFF C) Revelado com o CBB.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Este trabalho é de importância ambiental, pois evidencia a diversidade enzimática encontrada no suco digestivo do molusco do *Achatina fulica*, um indivíduo encontrado abundantemente na natureza por suas características invasoras, proporcionando a ele uma função como fonte de bens biotecnológicos.
- ✓ No suco digestivo encontrou-se uma gama variada de enzimas hidrolíticas de relevância industrial com vantagens, pois ocorrem em elevada concentração protéica, além de possuírem atividades superiores às enzimas produzidas por diversos microrganismos como fungos, leveduras e bactérias.
- ✓ A indução alimentar dos moluscos com glicerofosfato de sódio e alimentos ricos em inulina e pectina não tiveram efeitos significativos quanto à liberação de açúcares redutores e totais nos re-ensaios com os respectivos substratos, embora alguma atividades enzimática, caso da fosfatase alcalina, tenha apresentado melhor nível quando a dieta recebeu inulina.
- ✓ A cromatografia em camada delgada (CCD) mostrou-se como uma técnica muito eficiente para demonstrar com clareza de forma qualitativa as hidrólises dos substratos polissacarídicos, permitindo, em ensaios ágeis, analisar uma dezena de amostras por vez.
- ✓ O suco digestivo do molusco exibe uma atividade muito alta da enzima fosfatase alcalina. Incubações “in vitro” com um substrato clássico, o pNFF – para-Nitro Fenil Fosfato seguido de eletroforese e zimograma com o mesmo substrato sintético, permitiu evidenciar com clareza esta atividade hidrolítica de alto valor comercial.
- ✓ Percebeu-se dificuldade experimental em quaisquer dos esquemas de enriquecimento e purificação das enzimas, certamente por conta da

pluralidade de entidades moleculares cujas estruturas protéicas devem ser assemelhados em termos de dimensão molecular e carga.

- ✓ A purificação por espumação ou separação adsortiva por bolhas (“foaming”) foi eficiente quando combinada a uma ação de detergência através de uma solução de saponina 0,25mg/mL, favorecendo melhor formação de bolhas e propiciando um enriquecimento da atividade de fosfatase alcalina na ordem de 19%.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O.; HARBERTSON, J. F. Use of Alkaline Phosphatase for the Analysis of Tannins in Grapes and Red Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 3, p. 247-252, 1999.

ADSUL, M. G. et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4304-4312, 2011.

AGUILAR, G.; HUITRÓN, C. Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CHY1043 on different carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 9, p. 655-660, 1990.

ALMEIDA, M. N. **Celulases e hemicelulases de espécies de Acremonium Endofíticos**. 2009. 70 (Dissertação). Mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALMEIDA, M. N. Caramujo africano: Apenas uma espécie introduzida ou um problema de saúde pública? . **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 7, n. 2, p. 76-86, 2016.

ANBU, P. et al. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 204014, 2013.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 4-4, 2010.

ÁSGEIRSSON, B.; HARTEMINK, R.; CHLEBOWSKI, J. F. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 2, p. 315-329, 1995/02/01/1995.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 282-287, 2007.

BAGGA, P. S.; SANDHU, D. K.; SHARMA, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 1, p. 61-68, 1990.

BANSAL, S. et al. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 337-341, September 01 2008.

BARROS, M. L. B. Instrução Normativa Nº 73, DE 18 DE AGOSTO DE 2005. 2005. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/IBAMA/IN0073-180805.PDF> >. Acesso em: 02 março

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.

BILEN, Ç.; GENÇER, N.; ARSLAN, O. Purification of Alkaline Phosphatase from Bovine Milk and Investigation of Inhibitory Effects Of Some Veterinary Drugs on Enzyme Activity. **Hacettepe J. Biol. and Chem**, v. 43, n. 3, p. 195-203, 2015.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química dos alimentos**. São Paulo: Varela: 238 p. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07 1976.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for β -Galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1653-1663, July 01 2012.

BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de- açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 137 (Tese). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**, v. 161, n. 2, p. 126-137, 2012/10/15/ 2012.

BYERS, J. E. et al. Directing Research to Reduce the Impacts of Nonindigenous Species
Dirección de la Investigación para Reducir los Efectos de Especies Exóticas. **Conservation Biology**, v. 16, n. 3, p. 630-640, 2002.

CALDEIRA, R. L. et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 887-889, 2007.

CARDOSO, A. M. et al. Metagenomic Analysis of the Microbiota from the Crop of an Invasive Snail Reveals a Rich Reservoir of Novel Genes. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48505, 2012.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. **American Society of Plant Physiologists**, p. 52-108, 2000.

CARVALHO, O. D. S. et al. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 740-746, 2012.

CARVALHO, O. D. S. et al. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 743-745, 2003.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANG, C.-H.; MOOG, F. Alkaline phosphatases of the chicken duodenum: I. Isolation and partial characterization of the multiple forms of duodenal phosphatase in pre- and post-hatching stages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 258, n. 1, p. 154-165, 1972/01/20/ 1972.

CHIEN, C.-S.; LEE, W.-C.; LIN, T.-J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4-5, p. 252-257, 2001.

CHUANG, N.-N.; SHIH, S.-L. Purification and some properties of alkaline phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). **Journal of Experimental Zoology**, v. 256, n. 1, p. 1-7, 1990.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Epub, 2008.

COLEMAN, J. E. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 21, n. 1, p. 441-483, 1992/06/01 1992.

COLLEY, E. O manejo e controle do caramujo gigante africano: qual o melhor método? , 2012. Disponível em: < <http://www.conexaocaramujo.com.br/2012/05/o-manejo-e-controle-do-caramujo-gigante.html> >. Acesso em: 29 de junho

COLLEY, E.; FISCHER, M. L. O caramujo gigante africano *Achatina fulica* no Brasil. . v. 32/33, n. 76/81, p. 123-26, 2011.

CORREA, J. B. C.; FONTANA, J. D. Polysaccharide from the Epicarp and Mesocarp of Coffee Cherries. Part I. Some Structural Studies of Neutral Galactoaraban. . **An. Acad. Brasil. Ciénc.** , v. 43, p. 803-812, 1971.

COURA, R. R. **Purificação e caracterização de uma beta-xilosidase do fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35**. 2012. (Mestre). Pós graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

CURÁ, J. A.; JANSSON, P.-E.; KRISMAN, C. R. Amylose is not Strictly Linear. **Starch - Stärke**, v. 47, n. 6, p. 207-209, 1995.

CUSTODIO, R.; KUBOTA, L. T.; ANDRADE, J. C. D. Lei dos processos de absorção da radiação., 2000. Disponível em: < <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=bGVpLWRvcy1wcm9jZXNzb3MtZGUtYWJzb3JjYW8tZGEtcmFkaWFjYW8=> >. Acesso em: 26 de Junho

DAHLQVIST, A. Disaccharidases A2 - Bergmeyer, Hans Ulrich. In: (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)**: Academic Press, 1974. p.916-922. ISBN 978-0-12-091302-2.

DALMASO, G.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1925, 2015.

DE SOUZA, P. M.; DE OLIVEIRA MAGALHÃES, P. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, Oct-Dec 2010.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. Optimization of Inulinase Production from Garlic by *Streptomyces* sp. in Solid State Fermentation Using Statistical Designs. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 7, 2011.

DOMINGUES, F. C. et al. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 10, p. 771-775, 2001.

DONG, H. K. et al. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 369-372, 1997.

DROZDOWSKI, L. A.; THOMSON, A. B. R. Intestinal sugar transport. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 11, p. 1657-1670, 2006.

DUARTE, F.; AMREIN, B. A.; KAMERLIN, S. C. L. Modeling catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 27, p. 11160-11177, 2013.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUHAMEL, R. C.; MEEZAN, E.; BRENDEL, K. The addition of SDS to the Bradford dye-binding protein assay, a modification with increased sensitivity to collagen. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 5, n. 2, p. 67-74, 1981/08/01 1981.

ESTON, M. R. D. et al. Espécie invasora em unidade de conservação: *Achatina fulica* (BOWDICH, 1822) no parque estadual Carlos Botelho, Sete barras, SP, Brasil. . **Rev. Inst. Flor**, v. 18, p. 173-179, 2006.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 13-20, 1987.

EZERONYE, O. U.; OKERENTUGBA, P. O. Optimum conditions for yeast protoplast release and regeneration in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* using gut enzymes of the giant African snail *Achatina achatina*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 190-193, 2001.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. . São Carlos-SP, p.13. 2011

FISCHER, M. L.; COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca - Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 127-144, 2005.

FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M.; NERING, I. S. Use of alimentary resources present in the anthropic environment by the giant African snail *Achatina fulica* Bowdich, 1822: background information for management. **Bioikos**, v. 22, n. 2, p. 91-100, 2008.

FONTANA, J. D. et al. α -4-O-methyl-d-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560-571, 1988/01/01 1988.

GARCIA, A. N.; CHAVEIRO, E. F. A invasão perigosa do caramujo africano: Desafios na educação ambiental diante do desequilíbrio ambiental. 2011. Disponível em: < https://nupeat.iesa.ufg.br/up/52/o/1_CARAMUJO_AFRICANO.pdf >.

GEBARA, M. **Potencial hidrolásico do suco gástrico do molusco terrestre *Megalobulimus paranaguensis***. 1989. 68 (Tese). Doutorado em ciências, Universidade federal do Paraná, Curitiba-PR.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 171-175, 2001.

GISD. Global Invasive Species Database. 02 de março de 2017 2015. Disponível em: < <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=64&fr=1&sts=&lang=EN> >.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOMES, M. *Biologia Virtual*. 2016. Disponível em: < <http://sitebiologico.blogspot.com.br/search/label/Zoologia> >. Acesso em: 28 de março.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. DETERMINATION OF SERUM PROTEINS BY MEANS OF THE BIURET REACTION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751-766, February 1, 1949 1949.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003/06/30/ 2003.

GÜRKÖK, S. et al. Cloning and heterologous expression of the extracellular alpha-galactosidase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* under the control of *gpdA* promoter. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 146-149, 2010.

HENNIES, P. D. T. **Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio sólido**. 1996. 68 (Dissertação). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas-SP.

HESSLE, L. et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 14, p. 9445-9449, July 9, 2002 2002.

IBAMA. Portaria nº 102/98 de 15 de julho de 1998., 1998. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/phocadownload/fauna/faunasilvestre/1998_portaria_102-98-criador-comercial-fauna-exotica.pdf >. Acesso em: 29 de junho.

JAIN, S. C.; JAIN, P. C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using *Dahlia* tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 62-69, 2012.

JANG, H.-D.; CHEN, K.-S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JENZANO, J. W. et al. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 370-376, 1986/12/01/ 1986.

JING, W. et al. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 5-11, 2003.

JUNQUEIRA, A. C. **Em busca da legalidade. O Estado de S. Paulo.** São Paulo 2001.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KIM, C. H.; RHEE, S. K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 3, p. 201-206, 1989// 1989.

KIM, D. Y. et al. Parastrongylus (=Angiostrongylus) cantonensis Now Endemic in Louisiana Wildlife. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 1024-1026, 2002/10/01 2002.

KIRKLAND, R. A.; TANNER, R. D. Removing proteins from an aerated yeast fermentation by pulsing carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 122, n. 1, p. 685-693, 2005.

KOSLOSKI, M. A.; FISCHER, M. L. Primeira ocorrência de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) no litoral do estado do Paraná (Mollusca; Stylommatophora; Achatinidae). **Estudos de Biologia**, v. 24, n. 49, p. 65-69, 2002.

KOTZEKIDOU, P. Production of polygalacturonase by *Byssoschlamys fulva*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 53-56, 1991.

KRABBE, E. L. Perspectivas quanto ao desenvolvimento de enzimas para uso na nutrição de aves. . Concórdia- SC, 2011. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67974/1/Avesui-Everton-Krabbe-Perspectivas-quanto-ao-desenvolvimento-de-enzima.pdf> >. Acesso em: 20 de maio.

LACHMAN, J. et al. Saccharides of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson) tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant Soil and Environment**, v. 50, n. 9, p. 383-390, 2004.

LALLÈS, J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 6, p. 323-332, 2010.

LAMBERT, W. D. et al. The effect of pH on the foam fractionation of β -glucosidase and cellulase. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 3, p. 247-253, 2003.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, 2010.

LEPAROUX, S.; COLAS, B. Digestive juice of *Achatina fulica* as a potential source of transglycosylation enzymes. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 247-254, 1994.

LI, C.; ADAMCIK, J.; MEZZENGA, R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. **Nat Nano**, v. 7, n. 7, p. 421-427, 2012.

LIMA, A. R. M. C. et al. Alicate disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, p. 1093-1096, 2009.

LIMA, M. R. et al. Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio **3º Congresso Brasileiro de Mamona**, 2008.

LINKE, D.; BERGER, R. G. Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 4, p. 125-131, 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACGREGOR, E. A.; JANEČEK, Š.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1546, n. 1, p. 1-20, 2001/03/09/ 2001.

MAEDA, I. et al. Purification and Characterization of a Cellulase from the Giant Snail *Achatina fulica*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 122-124, 1996/01/01 1996.

MAESTRIN, A. P. J. et al. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, v. 32, p. 1670-1672, 2009.

MAGNANI, M.; CASTRO-GOMÉZ, R. **Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção**. 2008.

MALDONADO JÚNIOR, A. et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 938-941, 2010.

MANOCHA, M. S.; COLVIN, J. R. Structure and Composition of the Cell Wall of *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 202-212, 1967.

MANSO, J. et al. Bienzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 2, p. 345-353, 2008/04/15/ 2008.

MARTÍNEZ-TRUJILLO, A. et al. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 40-47, 2009.

MARTINS, L. Variações bioquímicas em *Oreochromis niloticus* (tilápia), in situ, em região com despejo de efluente da indústria de polpa de celulose tipo Kraft. **Revista Saúde e Ambiente.**, v. 10, n. 1, p. 29-37, 2009.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUES- AMAYA, D. Confirmação da identidade da a-criptoxantina e incidência de carotenóides minoritários provitamínicos A em verduras folhosas verdes. . **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 21, p. 216-222, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização.** 2003. 133 (Dissertação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOREIRA, V. L. C. et al. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 90-97, 2013.

MORERA, P. Angiostrongilíase abdominal. Um problema de saúde pública? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 2, p. 81-83, 1988.

MORNET, E. et al. Structural Evidence for a Functional Role of Human Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase in Bone Mineralization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31171-31178, August 17, 2001 2001.

MOSS, D. W. Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. **Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 225-230, 1987/08/01 1987.

_____. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. **Clinica Chimica Acta**, v. 257, n. 1, p. 133-140, 1997/01/03 1997.

MOSS, S. M.; DIVAKARAN, S.; KIM, B. G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2001.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications—A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 409-418, March 01 2014.

MUNARETTO, C. B. **Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio**

2011. 69 (Dissertação). Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim- RS.

NARAYANAN, M. et al. Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of inulinase under solid state fermentation. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 1, p. 376-384, 2013.

NCBE, N. C. O. B. E. Enzymes in fruit juice production. . 2000. Disponível em: < <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/PDF/JAM01.pdf> >. Acesso em: 21 de maio

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1009

NEUBERGER, A.; RIVERS, R. V. P. The hydrolysis of glucosaminides by an enzyme in *Helix pomatia*. **Biochemical Journal**, v. 33, n. 10, p. 1580-1590, 1939.

NEUHAUSS, E. et al. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 49-52, 2007.

NEVES, L. O. D. Q. Parecer Técnico DPC/PPP/ DDIV – nº: 003/03: Controle e erradicação do molusco exótico *Achatina fulica*. 2003. Disponível em: < http://www.institutohorus.org.br/download/marcos_legais/Parecer_0032003_DPC.pdf >. Acesso em: 10 de março.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Angiostrongylus cantonensis* infection in molluscs in the municipality of São Gonçalo, a metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil: role of the invasive species *Achatina fulica* in parasite transmission dynamics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 739-744, 2015.

OLIVEIRA, M. P. D. **Conchas dos caramujos terrestres do Brasil/ Land shells from Brazil**. Juiz de Fora: Editar Editora Associada, 1999. 61

PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

PERKIN, E. C. Enzyme Glusulase®. Disponível em: < <http://www.perkinelmer.com/catalog/product/id/nee154001ea> >. Acesso em: 01 de Março.

PINHEIRO, G. L. et al. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 860, 2015.

POORNA, V.; KULKARNI, P. R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 3, p. 315-320, 1995.

PRASAD UDAY, U. S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Rapid development of xylanase assay conditions using Taguchi methodology. **Bioengineered**, v. 7, n. 6, p. 424-431, 2016/11/01 2016.

PROSSER, C. L.; VAN WEEL, P. B. Effect of Diet on Digestive Enzymes in Midgut Gland of African Giant Snail, *Achatina fulica* Fér. **Physiological Zoology**, v. 31, n. 3, p. 171-178, 1958/07/01 1958.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008/05/01/ 2008.

RANGRAB, L. H.; MÜHLBACH, P. R. F.; BERTO, J. L. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 349-356, 2000.

RAUT, S. K.; BARKER, G. M. *Achatina fulica* Bowdich and Other Achatinidae as Pests in Tropical Agriculture. In: BARKER, G. M. (Ed.). **Molluscs as crop pests**. Calcutta, India: CABI publishing, 2002. cap. 3, ISBN 0851993206.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12 p. 645-648, 2003.

REINERT, H. **Escargot chinês está chegando ao mercado**. O Estado de S. Paulo. São Paulo 1990.

RHIM, J.-W. **Characteristics of pullulan-based edible films**. 2003. 161-165

ROY, I.; GUPTA, M. N. Purification of alkaline phosphatase from chicken intestine by expanded-bed affinity chromatography on dye-linked cellulose. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 81-87, 2000.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, p. 205-211, 2004.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 01 2003.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3165-3170, 1996.

SAHA, B. C.; FREER, S. N.; BOTHAST, R. J. Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium*

pullulans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3774-3780, 1994.

SALAR, U. et al. Coumarin sulfonates: New alkaline phosphatase inhibitors; in vitro and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 29-47, 2017.

SANTANA, M. L. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural da celulase de *Moniliophthora perniciosa***. 2010. 64 (Dissertação). Mestrado em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SAYLER, G. S.; PUZISS, M.; SILVER, M. Alkaline Phosphatase Assay for Freshwater Sediments: Application to Perturbed Sediment Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 922-927, 1979.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; GUPTA, M. **Purification of alkaline phosphatase from chicken intestine by three-phase partitioning and use of phenyl-Sepharose 6B in the batch mode**. 2000. 155-61

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SILVA, M. D. P. M. D.; TEREZI, H. F. - Análise bioquímica e enzimológica das alterações da parede celular do mutante slime de neurospora crassa. 1993.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, R. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SILVÉRIO, S. C. et al. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 131-139, 2018/02/01/ 2018.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 312-322, 2017/03/01/ 2017.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO, A. G. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3-4, p. 411-417, 1999.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985/10/01 1985.

STOLBACH, L. L. CLINICAL APPLICATION OF ALKALINE PHOSPHATASE ISOENZYME ANALYSIS*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 166, n. 2, p. 760-774, 1969.

SUN, M.-Z. et al. A chitosanase purified from the snail of *Achatina fulica*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 44, p. 10242-10247, 2012.

TARAGANO, V.; SANCHEZ, V. E.; PILOSOFF, A. M. R. Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 233-236, 1997.

TELES, H. M. S.; FONTES, L. R. Implicações da introdução do *Achatina fulica*, Bowdich 1922, no Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12, n. 1, p. 3-5, 2002.

THIENGO, S. C. et al. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.

THIENGO, S. C. et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 194-199, 2010.

TIBONI, M. **Produção de oligossacarídeos prebióticos a partir de diferentes pré-tratamentos de fitobiomassas** 2015. 175 (Tese). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

TOMA, H. et al. Ocular Angiostrongyliasis Without Meningitis Symptoms in Okinawa, Japan. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 211-213, 2002/02/01 2002.

TOMIYAMA, K.; MIYASHITA, K. Variation of egg clutches in the giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae) in Ogasawara Islands. **Venus the Japanese Journal of Malacology**, v. 51, n. 4, p. 293-301, 1992.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

UPADHYAY, L. S. B.; VERMA, N. A three step approach for the purification of alkaline phosphatase from non-pasteurized milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 3140-3146, 2015.

VAN WEEL, P. B. The effect of special diets on the digestion processes (enzyme production and resorption) in the african giant snail, *Achatina fulica* Bowdich. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**, v. 42, p. 433-448, 1959.

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G. Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties, and Applications. In: ALLEN, I. L. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v. Volume 29, 1983. p.139-176. ISBN 0065-2164.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 226-231, 2001.

WANG, X.; CHEN, Q.; LÜ, X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 129-137, 2014/07/01/ 2014.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

YAMADA, R. et al. Efficient direct ethanol production from cellulose by cellulase- and cellodextrin transporter-co-expressing *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 3, p. 34-34, 2013.

YUAN, B. et al. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1517-1526, 2012.

YUAN, W. J. et al. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 2076-2083, 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZHAO, C. et al. A novel and efficient bioprocess from steam exploded corn stover to ethanol in the context of on-site cellulase production. **Energy**, v. 123, p. 499-510, 2017.

APÊNDICES

Gráfico 2: Curva Analítica do método de Biureto

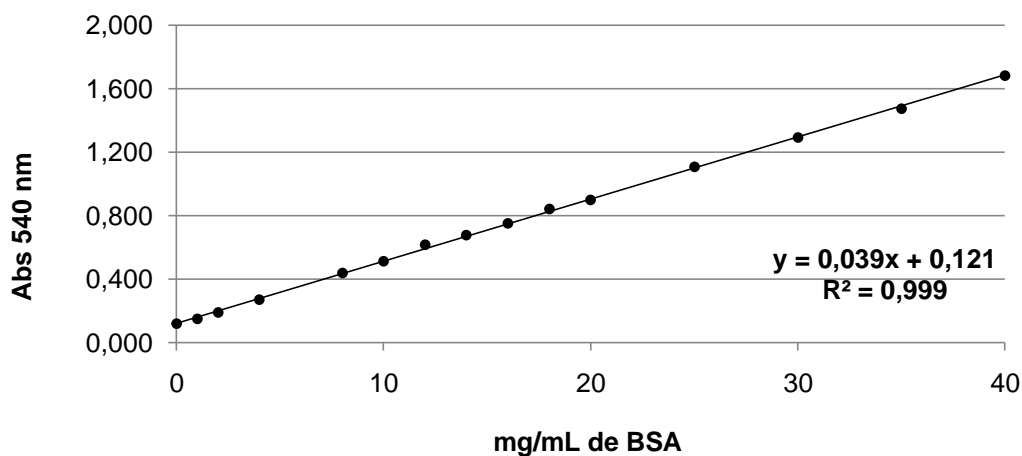


Gráfico 3: Curva Analítica do método de Bradford

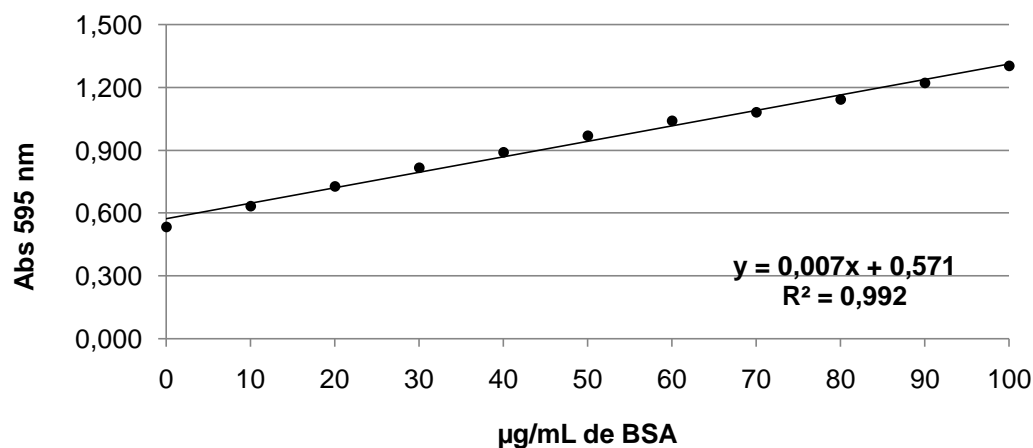


Gráfico 4: Curva Analítica do método de Lowry

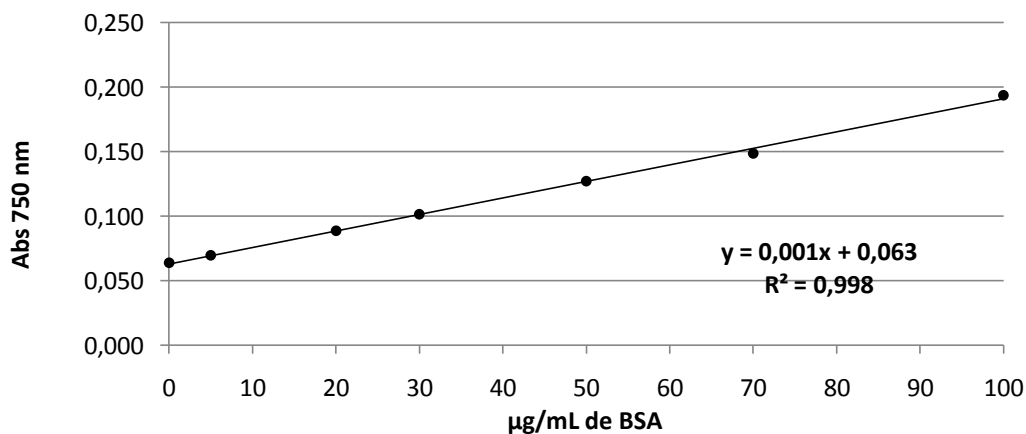
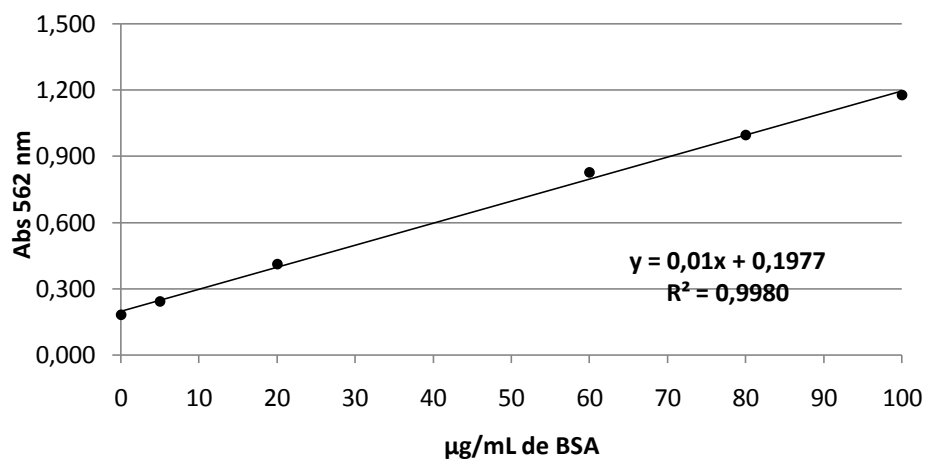


Gráfico 5: Curva Analítica do método de BCA





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47576-2	Data da Emissão: 22/02/2016 13:47	Data para Revalidação*: 23/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Domingos Fontana	CPF: 027.761.039-72
Título do Projeto: Caracterização de enzimas do suco digestivo do molusco <i>Achatina fulica</i>	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE TECNO FEDERAL DO PARANA	CNPJ: 75.101.873/0008-66

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta dos moluscos <i>Achatina fulica</i>	02/2015	04/2015
2	Coleta das enzimas gástricas	04/2015	05/2015
3	Caracterização bioquímicas das enzimas coletadas	05/2015	12/2015
4	Análise dos resultados	06/2015	02/2016
5	Coleta dos moluscos <i>Achatina fulica</i>	12/2015	04/2016
6	Coleta das enzimas gástricas	04/2016	05/2016
7	Caracterização bioquímicas das enzimas coletadas	05/2016	12/2016
8	Análise dos resultados	06/2016	02/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Lucas Blitzkow Scremin	Colaborador	075.396.889-47	67498976 SSP-PR	Brasileira
2	Heidegrind Siebert Koop	Pesquisadora	650.211.699-04	23450385 SSP-PR	Brasileira
3	Bárbara Maria Santano Chalcoski	Colaboradora	061.927.119-17	89795427 ipr-PR	Brasileira
4	Adelia Grzybowski	Pesquisadora	033.343.079-48	7836560-9 SSP-PR	Brasileira
5	Marcela Tiboni	Pesquisadora	049.760.209-16	67845366 ssp-PR	Brasileira
6	Cassandra Dreveniak Kruger	Colaboradora	048.021.929-08	85907514 sesp-PR	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56164675





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47576-2	Data da Emissão: 22/02/2016 13:47	Data para Revalidação*: 23/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Domingos Fontana	CPF: 027.761.039-72
Título do Projeto: Caracterização de enzimas do suco digestivo do molusco <i>Achatina fulica</i>	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE TECNO FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.101.873/0008-66

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MATINHOS	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
2	ANTONINA	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
3	GUARATUBA	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
4	GUARACUPECABA	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
5	MORRETES	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
6	PARANAGUA	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal
7	PONTAL DO PARANÁ	PR	Litoral do Paraná	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Achatina fulica</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Achatina fulica</i> (*Qtde: 150)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	<i>Achatina fulica</i>

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados)	Captura manual
---	--	----------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE TECNO FEDERAL DO PARANÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56164675



Página 2/3

