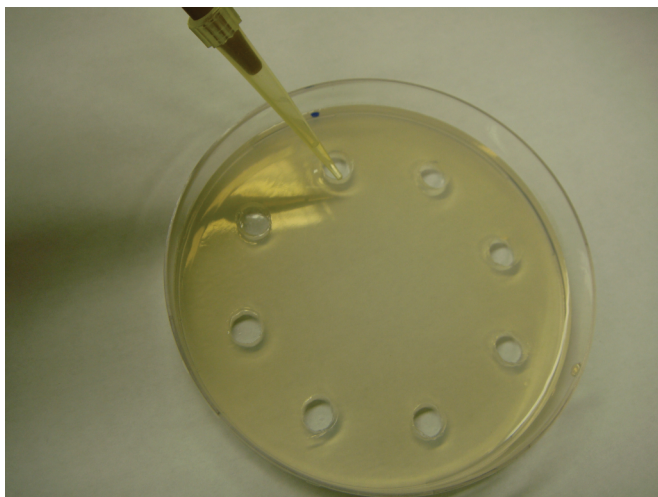


On line



Metodologia Científica: Ensaio Alternativo para Triagem de Extratos Proteicos com Atividade Celulolítica.

Hévila Oliveira Salles¹
Gil Mario Ferreira Gomes²
Lúcia Betânia da Silva Andrade³
Fernando Henrique Melo A. R. de Albuquerque⁴
Antonio Silvio do Egito⁵

Introdução

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. A indústria automobilística, por exemplo, se viu forçada a buscar novas fontes de combustível não fóssil. Alternativas como o motor elétrico, híbrido, com célula de combustível (hidrogênio), flex, movido a biodiesel ou ainda a etanol são os destaques nessa busca.

O etanol, além de substituir parte do petróleo, tem a seu favor o fato de que não contribui para agravar o efeito estufa. O dióxido de carbono, principal gás desse fenômeno, liberado pela combustão do álcool, em um ano, é reabsorvido pelas plantas na safra seguinte.

O Brasil domina a tecnologia da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar; porém, apenas um terço da

biomassa contida na planta cana é aproveitado para a produção de açúcar e de etanol. O grande desafio é transformar a celulose, que está no bagaço e na palha descartada na colheita, em álcool combustível, denominado de bioetanol.

A quebra das cadeias de celulose em açúcares se faz pelo processo chamado hidrólise. Uma das possibilidades na degradação desse material é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas, chamadas celulases, que hidrolisam a celulose. A descoberta de enzimas cada vez mais eficazes para processar o bagaço e a palha de cana é uma das vias para sair do atual patamar de produção sem precisar aumentar a área plantada.

Nessa linha de pesquisa, várias equipes vêm trabalhando na busca de novas fontes de enzimas e/ou de enzimas mais eficazes a partir de nossa biodiversidade. Para detectar atividade celulolítica nos mais diversos extratos proteicos produzidos por

¹ Méd. Veterinária, D. Sc. em Bioquímica, Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, hevila@cnpc.embrapa.br

² Zootecnista, Mestrando da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, gilmariofg@yahoo.com.br

³ Bióloga, D. Sc. em Bioquímica, Professora da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, lubetania@yahoo.com.br

⁴ Méd. Veterinário, M. Sc. em Zootecnia, Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, henrique@cnpc.embrapa.br

⁵ Méd. Veterinário, D. Sc. em Bioquímica, Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, egito@cnpc.embrapa.br

micro-organismos em cultivo, plantas, insetos, nematoides, ou outros organismos celulolíticos estudados, os laboratórios vêm utilizando a técnica de Miller et al. (1960). Essa metodologia requer equipamentos mais sofisticados para leitura e vários reagentes de alto custo. Dessa forma, metodologias mais simples e de baixo custo facilitariam a triagem de extratos proteicos dos organismos em

Nesse sentido, o presente comunicado apresenta uma metodologia de difusão radial em gel de agarose (DRGA) desenvolvida por Teather e Wood (1982), modificada por Rehman et al. (2009), e adaptada no Laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos para avaliar a atividade celulolítica em extratos proteicos de microrganismos ruminais. A técnica baseia-se na difusão radial, em gel de agarose, das proteínas da amostra analisada. O gel contém o substrato específico para celulase, a carboximetilcelulose, que pode ser corada com o corante vermelho congo.

Extratos que possuam atividade celulolítica formarão um halo de hidrólise da carboximetilcelulose, visualizado pela ausência de coloração nessa área de difusão da enzima no gel (Figura 1).

Material e Métodos

REAGENTES

- Agarose
- Carboximetilcelulose (CMC)
- Vermelho Congo
- Cloreto de sódio
- Fosfato de sódio monobásico
- Fosfato de sódio dibásico

Observação: Os reagentes utilizados nas soluções deverão ter o padrão pró-análise (p.a.)

MATERIAIS

- Placa de Petri 15x90 mm
- Pipetas automáticas de 10 mL e de 50 μ L
- Ponteiras para as pipetas automáticas

EQUIPAMENTOS

- Estufa bacteriológica (10 a 65 °C);

MEIOS E SOLUÇÕES

Gel de agarose a 2% contendo 1% de CMC

- Agarose 2 g
- Carboximetilcelulose 1 g
- Tampão de extração q.s.p. 100 mL

Aquecer em banho-maria ou vapor fluente até a completa fusão da agarose. Caso queira prevenir contaminações indesejáveis, pode-se, após pesar as substâncias e diluí-las, levar o recipiente que as contém para autoclavar a 120 °C por 15 min. A fusão da agarose ocorrerá durante a autoclavação.

Tampão de extração:

Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,9

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,6 g
- Na_2HPO_4 2,33 g
- Água destilada q.s.p. 1000 mL

O tampão fosfato de sódio 50 mM deverá ter seu pH ajustado para 6,9, antes de completar seu volume para 1000 mL. Esse tampão foi o tampão selecionado para extração de celulases e para ensaios de atividade celulolítica de microrganismos ruminais de pequenos ruminantes. Outros tampões podem ser utilizados de acordo com a origem dos extratos, necessitando de testes para avaliar a atividade celulolítica na presença dos mesmos. O tampão selecionado deverá ser o que proporcionar maior halo de hidrólise para a mesma quantidade de extrato avaliada nos diferentes tampões.

Solução corante de Vermelho Congo a 0,1%

- Vermelho Congo 0,1 g
- Água destilada q.s.p. 100 mL

Solução descorante de NaCl 0,5 M

- NaCl 29,22 g
- Água destilada q.s.p. 1000 mL

Preparo das Placas

Logo após esfriar o frasco contendo o gel de agarose a 2 %, com 1 % de CMC, a uma temperatura passível de manuseio, distribuir 10 mL por placa de Petri, com o auxílio de uma pipeta automática de 10 mL.

Após solidificação, efetuar os furos com um cortador medindo 6,5 mm de diâmetro. Com esse diâmetro de furo, é possível se fazer até oito furos por placa, com 16 mm de distância entre eles. Cortadores com menor diâmetro podem ser utilizados, proporcionando o teste de um maior número de amostras por placa e um menor volume de extrato por ensaio. Porém, como menor quantidade de proteína, será utilizada por poço, pode não ser suficiente para hidrolisar a carboximetilcelulose de forma a proporcionar um halo visível.

Após o corte dos furos, retirar o gel interno dos poços com o auxílio de uma agulha. As placas estão

prontas para receber as amostras. Utilizando 10 mL de gel por placa de 15x90 mm e cortador com diâmetro de 6,5 mm, os poços suportam 50 μ L de amostra. Para cortadores com menor diâmetro, determinar previamente a capacidade do poço.

Realização do Ensaio

Com pipeta automática de 50 μ L, transferir os extratos proteicos para os respectivos poços. Identificar, na borda da placa, o poço número 1 (um) e padronizar a aplicação das amostras no sentido horário, evitando com isso troca de resultados (Figura 1).

É salutar utilizar um poço somente com tampão, servindo de controle negativo do ensaio (Figura 1, Poço 4), e caso seja possível, utilizar uma celulase comercial como controle positivo, com isso assegura-se da eficiência do método (Figura 1, Poço 1).

Após preenchido todos os poços, vedar as placas com parafilme e transferi-las para estufa a 38 °C, por 20 h. A temperatura e o tempo do ensaio podem ser alterados de acordo com a atividade do material analisado, o que pode ser testado para cada extrato e padronizado, caso haja interesse por esse material em especial.

Coloração e Descoloração

Terminado o tempo de incubação, preencher cada placa com 10 mL de solução corante e aguardar 30 min à temperatura ambiente. Ao final do tempo, descartar a solução corante e lavar o gel com solução descorante, até a completa visualização dos halos de hidrólise.

Leitura da Atividade

Identificar as amostras que apresentam halo de hidrólise como extratos com atividade celulolítica. Ver halos de hidrólise nos poços 1,2,3,5 e 6 da Figura 1.

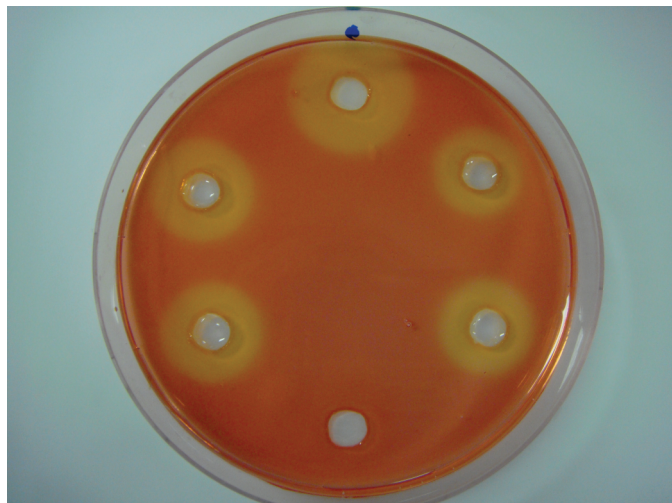


Fig. 1. Ensaio de difusão radial em gel de agarose (DRGA) com 1% de carboximetilcelulose; 1: 0,005 mg de celulase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich®- ref.22178, 1,24U/mg); 2: extrato enzimático do rúmen de ovinos em jejum; 3: extrato enzimático do rúmen de ovinos 4 horas após ser administrado bagaço de cana in natura; 4: Controle com tampão fosfato 50 mM, pH 6,9; 5: extrato enzimático do rúmen de caprinos 4 horas após ser administrado bagaço de cana in natura; 6: extrato enzimático do rúmen de caprinos em jejum. ● Ponto riscado na placa, indicando a localização do poço número 1.

Possibilidades da Técnica

Utilizando-se paquímetro digital, pode-se fazer comparações entre os diâmetros dos halos de hidrólise mensurados (Figura 2).



Fig. 2. Determinação com paquímetro do diâmetro de um halo de hidrólise em ensaio de difusão radial em gel de agarose (DRGA) com 1% de carboximetilcelulose e corado com vermelho congo 0,1%.

Caso seja utilizada uma celulase comercial como controle, pode-se inferir a porcentagem de atividade das amostras, calculando-se a concentração e a quantidade de unidades de atividade utilizadas, mensurando-se o diâmetro dos halos das amostras e comparando com o da celulase comercial.

Caso tenha sido determinada a quantidade de proteína nas amostras, pode-se ainda inferir a porcentagem de atividade específica dessas em relação à celulase comercial.

Fazendo-se uma curva de atividade com a celulase comercial e mensurando-se os halos formados de acordo com as concentrações testadas, observa-se uma relação linear entre a concentração da enzima e o halo de hidrólise, com alto grau de confiabilidade, equivalente a 99,49 % (Figura 3). Dessa forma, a partir do diâmetro do halo de hidrólise formado pelas amostras, é possível ainda aplicar esses valores na equação obtida e estimar a concentração ou a atividade específica das celulases presentes nas amostras analisadas.

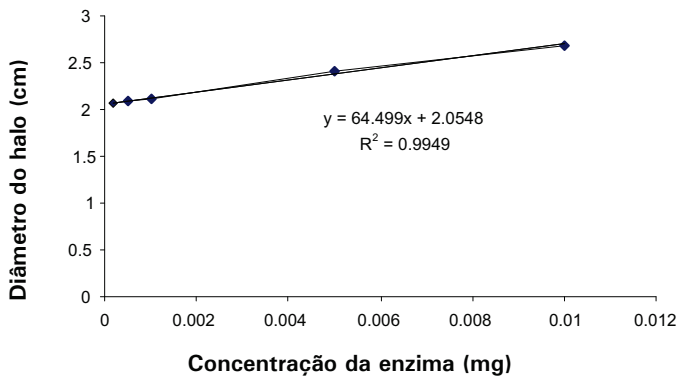


Fig. 3. Curva padrão de celulase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich®- ref.22178, 1,24U/mg)

Referências

MILLER, J. L.; BLUM, R.; GLENNON, W. E.; BURTON, A. L. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. **Analytical Biochemistry**, v.1, p.127-132, 1960.

REHMAN, F. U.; ASLAM, M.; TARIQ, M. I.; SHAHEEN, A.; SAMI, A. J.; NAVEED, N. H.; BATOOL, A. I. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 23, p. 6710-6715, 2009.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 777- 780, 1982.

Comunicado Técnico, 112 On line

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição
On line (Dezembro/2010)

Comitê de publicações

Presidente: Marco Aurélio Deolmondes Bomfim
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho.
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos.
Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo.
Editoração eletrônica: Fábio Fernandes