

Este exemplar corresponde à redação final de  
tese defendida pelo Sr. Hernandês  
Faustino de Carvalho e aprovada  
pela Comissão julgadora.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Hernandês Faustino de Carvalho".

Hernandês Faustino de Carvalho

ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA QUITINOSO DAS CONCHAS RESQUICIAIS  
DE *Loligo brasiliensis*

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para a  
obtenção do título de Mestre  
em Ciências, área de concen-  
tração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas - 1989

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Dedico ao meu amigo*

*B.C.Vidal*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo entusiasmo vibrante na pesquisa e orientação e pelo apego a minha formação pessoal e profissional. Por sua amizade e ensinamentos,

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela participação no exame desta Tese, pelo muito que tem contribuído à minha formação, pela orientação em alguns trabalhos e pela amizade,

Aos Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias e Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis, pela prontidão no exame prévio do manuscrito e participação da Banca Examinadora, pelas críticas e sugestões e pela convivência,

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pelo auxílio com as técnicas de eletroforeses e à Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, pela discussão dos padrões eletroforéticos,

À Ana Gagliardi, à Deise Cristina Agostinho, à Regina Célia Solino Araujo e à Amália Pereira, à Zilda Bueno da Biblioteca do Instituto de Biologia, pelo auxílio e paciência durante o levantamento e obtenção do material bibliográfico. À primeira, bibliotecária-chefe, agradeço também pela correção cuidadosa das referências bibliográficas,

Aos Marcelo Chiarella, Gilson Paulo Manfio e Marco Antonio Ferreira Randi, pelo auxílio constante junto a programas e computadores,

Aos amigos Sílvia Regina Pérغامo de Miranda e Sebastião Roberto Taboga pela leitura e correções do manuscrito e aos demais colegas de Pós-Graduação pelo convívio,

Ao Departamento de Biologia Celular, aos seus professores e funcionários,

À Universidade Estadual de Campinas, pelo suporte financeiro, dado seu programa de Bolsas de Incêntivo Acadêmico e

Aos meus familiares, pela resistêcia,

Sinceramente agradeço.

*"Two prominent aspect of cell functioning which are specially interesting are the manner of fibre production and the control of fibre direction".*

*Millar & Rudall*

## CONTEÚDO

1 - INTRODUÇÃO.....	01
Composição química e características	
conformacionais da quitina.....	02
Níveis de organização das estruturas quitinosas.....	05
A quitina e suas associações.....	07
Sistemas quitinosos esclerosados.....	11
Sistemas quitinosos calcificados.....	15
Problemática do trabalho:	
O sistema quitinoso de penas de lulas.....	15
Metodologia proposta para resolução da	
problemática do trabalho.....	19
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Testes topoquímicos.....	21
Microscopia de fluorescência.....	22
Microscopia de polarização.....	23
Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo	
dodecilsulfato de sódio.....	25
3 - RESULTADOS.....	27
Testes topoquímicos.....	31
Microscopia de fluorescência.....	31

Microscopia de fluorescência.....	31
Microscopia de polarização.....	32
Birrefringência.....	32
Dicroísmo linear extrínseco.....	37
Curvas de birrefringência de forma.....	37
Relações entre as birrefringências intrínseca e de forma e a espessura do corte.....	39
SDS-PAGE.....	42
4 - DISCUSSÃO.....	46
Estrutura, composição e orientação macromolecular.....	46
Organização molecular e estado de agregação.....	53
Relações entre birrefringência e espessura do corte.....	58
Perspectivas de trabalho.....	60
5 - CONCLUSÕES.....	62
6 - RESUMO.....	65
7 - SUMMARY.....	66
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

# Introdução 1



## INTRODUÇÃO

### Composição química e características conformacionais da quitina

A quitina é um polissacarídeo linear composto por monômeros de n-acetil-D-glicosamina unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Cada resíduo sofre uma rotação de  $180^\circ$  em relação ao seguinte, sendo cada par então designado quitobiose (Fig. 1).

Diferentes cadeias são reunidas, pela formação de pontes de hidrogênio em pilhas ou "lâminas". Estas pilhas adotam diferentes disposições espaciais, o que caracteriza os três tipos cristalinos de quitina (RUDALL, 1963; 1969; RUDALL & KENCHINGTON, 1973).

No primeiro tipo existe uma disposição antiparalela das cadeias contidas em duas pilhas adjacentes (Fig. 2A). Tal organização foi primeiramente descrita na cutícula de uma espécie de inseto (FRAENKEL & RUDALL, 1947) e então determinada como característica destas estruturas nos insetos em geral (RUDALL,

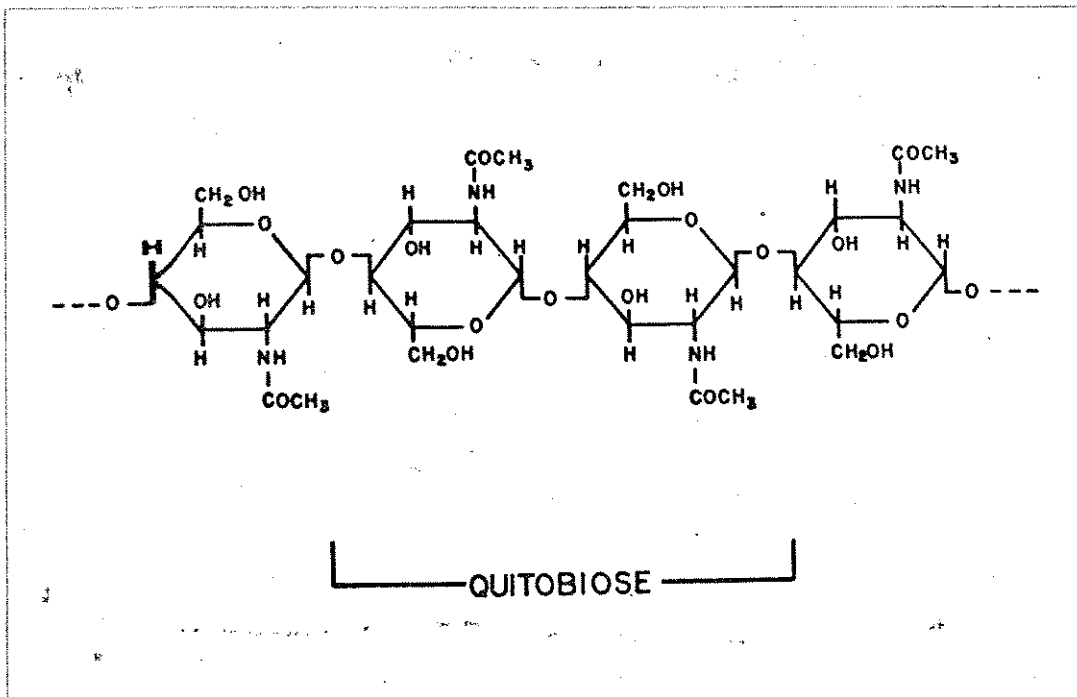


Fig. 1 - Segmento de uma cadeia polimérica de quitina, mostrando a estrutura química e um dímero quitobiose, formado por dois resíduos de N-acetil-D-glicosamina ligados por ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ , girados de  $180^\circ$ .

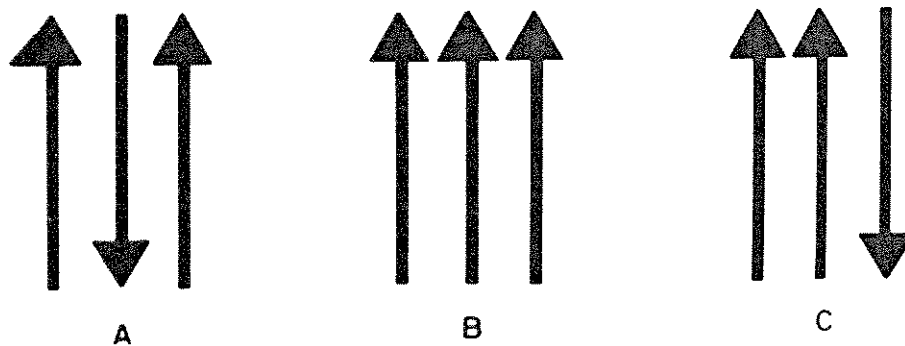


Fig. 2 - Esquema demonstrando os diferentes tipos cristalinos de quitina, baseados na disposição em que as cadeias poliméricas assumem em diferentes lâminas. Estas, em vista transversal, estariam dispostas perpendicularmente ao plano do papel.

- A. Tipo  $\alpha$  - Composto por lâminas paralelas que contêm cadeias antiparalelas.
- B. Tipo  $\beta$  - Composto por lâminas com cadeias sempre paralelas.
- C. Tipo  $\gamma$  - Composto por duas lâminas com cadeias paralelas acompanhadas por uma outra com cadeias no sentido inverso.

1963), tendo sido então designado por quitina do tipo  $\alpha$ . A quitina do tipo  $\alpha$  é também característica das paredes celulares dos fungos.

LOTMAR & PICKEN (1950) descreveram o sistema quitinoso das cerdas do poliqueto *Aphrodite*, tendo encontrado uma distribuição paralela das cadeias de quitina, a qual designaram como tipo  $\beta$  (Fig. 2B). Mais tarde este sistema foi descrito em outros organismos (RUDALL & KENCHINGTON, 1973) e caracterizado cristalograficamente (PERVAIZ & ABDUL-HALEEN, 1975).

A terceira forma cristalina, quitina do tipo  $\gamma$  (Fig. 2C), possui um arranjo de lâminas que conjuga os dois sistemas acima. Neste caso, duas pilhas com cadeias dispostas no mesmo sentido se justapõem à uma terceira, com cadeias em sentido contrário (RUDALL, 1963, 1969; RUDALL & KENCHINGTON, 1973).

A quitina do tipo  $\alpha$  apresenta características conformacionais e termodinâmicas mais estáveis, de forma que os tipos  $\beta$  e  $\gamma$  são facilmente convertidos, por hidrólise ácida a quente, no tipo  $\alpha$ . Tal conversão envolve a interpenetração de cadeias de diferentes pilhas, tendo RUDALL (1969) tentado explicar sua ocorrência segundo diversos mecanismos hipotéticos.

Finalmente, existe um tipo de quitina sem características cristalinas encontrado nas paredes dos esporos septados (artrósporos), de *Trycophyton mentagrophytes* (PALLACK *et alii*, 1983). Neste caso, as cadeias poliméricas estariam dispersas numa matriz, sem qualquer aspecto aparente de

ordenação. Neste sistema, a quitina apresenta-se altamente resistente à ação enzimática e ao ataque fúngico, o que sem dúvida reflete a importância da organização molecular e do tipo de componente associado na determinação das propriedades das estruturas quitinosas.

Modificações químicas da quitina são raras. Ocorrem principalmente deacetilações, provavelmente em sítios de ligação com outros componentes (RUDALL, 1969; RUDALL & KENCHINGTON, 1973) ou pela ação de deacetilases acopladas ao sistema quitina-sintase, produzindo polímeros com alto índice de deacetilação (DAVIS & BARTINICKI-GARCIA, 1984).

Quitina sulfatada foi descrita em um sistema de células de insetos em cultura, com presença provável, *in vivo*, em discos imaginários (KRAMEROV *et alii*, 1986), enquanto um certo grau de carboxilação foi sugerido por RUDALL (1963), para explicar a presença de algumas bandas de absorção de infra-vermelho.

#### Níveis de organização das estruturas quitinosas

Após a biossíntese da quitina a nível de membrana plasmática (CABIB *et alii*, 1983), suas cadeias polissacarídicas passam por um processo de agregação lateral, dada a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, conforme o modelo proposto por HERTH (HERTH, 1980; HERTH & SCHNEPF, 1984). Este autor descreveu a existência de um intervalo entre a polimerização e a cristalização da quitina, processos que seriam

modulados pela associação com outros componentes.

Quando observadas ao microscópio eletrônico, as estruturas quitinosas apresentam quase sempre aspecto alveolar, com centros elétron-lúcidos e periferia elétron-densa (GIRAUD-GUILLE, 1984; HINES & HACKMAN, 1987). Os alvéolos estão embebidos numa matriz protéica e estão dispostos de forma hexagonal, quando presentes em alta densidade ou apresentam distâncias variáveis conforme a estrutura estudada. Isto refletiria o primeiro nível geral de organização, o nível molecular (GIRAUD-GUILLE, 1984). Explicações mais simplistas consideram o centro elétron-lúcido como sendo devido à presença das fibrilas quitinosas, rodeadas pelo material protéico, formando assim uma fibra. GIRAUD-GUILLE (1984) sugere que o material elétron-denso, contrastado pelas técnicas normais de coloração utilizadas em microscopia eletrônica, poderia constituir-se de frações polares de proteínas e a outra, elétron-lúcida, corresponderia à fração apolar. Ela mesma questiona, entretanto, onde estaria localizado o componente polissacarídico neste modelo.

A partir do conhecimento de que a quitina (TSEZOS & VOLESKY, 1982), bem como a sua derivada quitosana (OGAWA *et alii*, 1984) são capazes de adsorver metais, pode-se supor que cada alvéolo represente exclusivamente uma fibrila quitinosa que, devido à sua cristalinidade, ligaria metais somente na sua periferia. O centro da fibrila permaneceria não contrastado, devido à inacessibilidade ao metal pesado. As proteínas

apresentariam uma contrastação moderada, mantendo preenchidos os espaços entre as fibrilas de quitina.

No segundo nível, associadas de diferentes formas, as fibrilas, que em corte transversal corresponderiam a um alvéolo, formariam feixes que teriam algumas dezenas de nanômetros de diâmetro.

Feixes interligados formariam lâminas que constituir-se-iam no terceiro nível de organização. Estas lâminas podem atingir espessura de até alguns micrômetros. Algumas estruturas diferem no tipo de organização espacial assumida por estas lâminas, diferindo conseqüentemente nas suas propriedades mecânicas (NEVILLE, 1984). Uma disposição helicoidal estaria mais adaptada ou apresentaria maior resistência a torções, enquanto uma disposição paralela destas lâminas, no que concerne ao direcionamento de seus constituintes fibrilares, deveria ser mais resistente a deformações por dobramentos ou curvaturas (NEVILLE, 1984; BANERJEE, 1988).

#### A quitina e suas associações

Algumas diatomáceas, algas unicelulares, apresentam longos filamentos que possibilitam a estabilização de uma dada posição da célula no plâncton e diminuem a sua velocidade de afundamento. Estes filamentos constituem-se na única estrutura descrita onde a quitina encontra-se como único constituinte, sem qualquer tipo de associação (BLACKWELL *et alii*, 1967). A quitina

encontrada nestes filamentos é do tipo  $\beta$  e apresenta uma alta cristalinidade, derivada de uma grande proximidade das cadeias paralelas de *n*-acetil-D-glicosamina. Neste caso deve ser formado um grande número de pontes de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, resultando numa estrutura altamente compacta e cristalina.

Comumente, entretanto, a quitina encontra-se associada a proteínas e/ou outras macromoléculas, caracterizando biocomplexos. Dentre estas outras macromoléculas estão principalmente outros tipos de polissacarídeos estruturais, como acontece em paredes celulares de alguns fungos. Nestes organismos, a quitina pode ainda estar ausente, sendo então substituída por celulose ou, em outros casos, formar associações com ela (FURTADO, 1970). Desta forma, existem variações quase que específicas, permitindo que, além da estruturação e influência na permeabilidade celular, os componentes da parede tenham possível papel no reconhecimento celular.

Quitina do tipo  $\alpha$  é o componente mais característico das paredes celulares dos fungos. O grau de deacetilação é variado nos diferentes grupos, sendo que em alguns fungos, assume-se mesmo a presença de quitosana substituindo a quitina (DAVIS & BARTINICKI-GARCIA, 1984; WESSELS, 1986). Dos componentes não protéicos associados, destacam-se os glicuranos e os  $\beta$ -glicanos, alguns dos quais formam complexos resistentes à hidrólise alcalina, ambos os tipos sendo reconhecidos como de importância em eventos morfogênicos (WESSELS, 1986).



As paredes celulares dos fungos apresentam estrutura complexa, geralmente constituída por diferentes camadas que diferem entre si principalmente quanto à disposição de seus componentes fibrilares (FURTADO, 1970). Alguns esporos apresentam mesmo organização helicoidal semelhante àquela das cutículas de artrópodos (BONFANTE-FASOLO *et alii*, 1986).

Além disto, existem modificações durante o crescimento das hifas que conduzem à transformação da parede apical visco-elástica na parede tubular altamente resistente (WESSELS, 1986), em parte devidas a transformações enzimáticas de  $\beta$ -glucanos, em parte devidas à cristalização da quitina (VERMEULEN & WESSELS, 1986).

A perfeita cristalização das fibrilas de quitina parece desempenhar importante papel no crescimento das hifas, sendo que o emprego de agentes que bloqueiam a formação dos cristalitos, conduz a falhas em vários processos do desenvolvimento dos fungos (RONCERO & DURÁN, 1985).

Já em 1947, FRAENKEL e RUDALL descreveram a existência de uma íntima associação de proteínas à quitina. A existência de resíduos de aminoácidos junto a remanescentes cuticulares submetidos a extensa hidrólise alcalina sugeriu a possível existência de ligações covalentes entre a quitina e proteínas, justificando assim a caracterização de sistemas quitinosos como glicoproteicos (RUDALL, 1963; LIPKE, 1971; HUNT & NIXON, 1981).

PICKEN & LOTMAR (1950), reportaram a existência de certa ordenação molecular do componente protéico associado à

quitina, quer seja detectada por difração de raios X, quer seja através de anisotropias ópticas.

Nos sistemas quitinosos existe uma profusão de tipos protéicos associados, com notável variabilidade na cutícula dos insetos. Estas estruturas apresentam diferenças quanto à região cuticular, quanto ao período do desenvolvimento (FRISTOM *et alii*, 1978; COX & WILLIS, 1987a; 1987b) e entre espécies relacionadas (ANDERSEN, 1988).

Estruturas cuticulares flexíveis podem ser formadas pela associação com resilina.. Tais complexos são encontrados em cutículas flexíveis e plásticas em uma camada particular conhecida por elastômero (THURM, 1964; McIVER & SIEMICK, 1985; HINES & HACKMAM, 1987) e devem suas propriedades principalmente ao carácter elástico quase perfeito dessa proteína (ANDERSEN & WEISS-FOGH, 1964).

Complexos quitinosos podem sofrer modificações adicionais que levam à formação de estruturas altamente especializadas, destacando-se as estruturas esclerosadas e as calcificadas.

## Sistemas quitinosos esclerosados

A cutícula da maioria dos insetos e de outros artrópodos, os casulos de alguns besouros (RUDALL & KENCHINGTON, 1973) e algumas estruturas dos moluscos, como as rádulas, (RUNHAM, 1961; RUDALL & KENCHINGTON, 1973; HUNT & NIXON, 1981) exemplificam sistemas quitinosos onde as proteínas associadas à quitina sofrem adições e modificações que conduzem à perda de água e ao enrijecimento, através de um complexo sistema de reações que consistem na esclerose.

Nestes sistemas atribui-se as funções de resistência mecânica e dureza à porção protéica, cabendo pouco à quitina (ANDERSEN, 1979) que, entretanto, poderia participar atribuindo certa plasticidade ao sistema (NEVILLE, 1984).

O processo de esclerose tem sido extensivamente estudado em dípteros (LIPKE *et alii*, 1983; SUGUMARAN & SEMENSI, 1987), sendo que vários passos do processo têm sido revelados. Por sua vez, estudos realizados em cutículas de gafanhotos têm conduzido principalmente ao conhecimento das enzimas cuticulares e suas funções específicas (ANDERSEN, 1989). Apesar disto, a sequência real das reações envolvidas permanece desconhecida.

Durante a esclerose, alguns compostos de baixo peso molecular atuam como "fixadores" das proteínas já exportadas, reduzindo a sua solubilidade e aumentando a sua dureza (ANDERSEN, 1979), o que parece ocorrer, ao menos em parte, por interações

hidrofóbicas (OH *et alii*, 1980).

A reação de polipeptídeos e proteínas com quinonas origina uma diversidade de grupos funcionais a partir das cadeias laterais dos aminoácidos, o que conduz a alterações das estruturas secundária e terciária das proteínas. Ácido aspártico amino terminal, o grupo  $\beta$ -amino de lisina, e resíduos de cisteína reagem facilmente com quinonas, resultando em ligações entre duas ou três proteínas. O envolvimento de aminoácidos contendo enxofre nos processos de endurecimento e pigmentação é desconhecido, sendo conhecidas, entretanto, suas reatividades com dopaquinonas e sua utilização na síntese de melaninas. Resíduos de tirosina também estão sujeitos à ação de polifenol-oxidases, sendo então convertidos a ortoquinonas (LIPKE *et alii*, 1983).

Ainda, foi comprovada a existência de ligações covalentes formadas entre os carbonos do anel aromático de catecóis e nitrogênios do anel imidazol de resíduos de histidina das proteínas cuticulares (SCHAEFER *et alii*, 1987), sendo que a grande proximidade destas ligações à quitina sugere, mas não comprova, o possível envolvimento desta na formação de ligações cruzadas.

Existem grandes variações quanto às propriedades biomecânicas das cutículas em geral, variações estas também encontradas dentro das cutículas esclerosadas. Concorrem para estas variações a densidade e a dureza destes materiais que, segundo LIPKE e colaboradores (1983), seriam ditadas por alterações em vários níveis envolvendo:

- 1 - Decréscimo na solubilidade de proteínas e lipídios,
- 2 - Adição de ligações entre proteínas e entre proteínas e quitina,
- 3 - Aumento do peso molecular dos componentes polipeptídicos,
- 4 - Alterações no estado de empacotamento das proteínas e do polissacarídeo,
- 5 - Eliminação de grupos funcionais,
- 6 - Declínio na resposta a agentes de degradação química ou enzimática,
- 7 - Eliminação de água,
- 8 - Reorientação das fibrilas de quitina,
- 9 - Pigmentação (excluindo colorações defensivas) e
- 10 - Modificações pós-translacionais de estruturas primárias.

Fica claro a partir destes itens que um decréscimo em reatividade e uma organização precisa dos componentes cuticulares, ao lado da eliminação de água, são os principais eventos relacionados à esclerose.

Outro fator que parece ter importância na determinação da rigidez de uma estrutura esclerosada tem sido relacionado à espessura das fibras de quitina, aquelas com maiores diâmetros contribuindo para a formação de cutículas com maiores dureza e resistência. Estudos específicos e abrangentes relacionando estes dois fatores, rigidez e espessura, não têm sido desenvolvidos. Alguns autores, entretanto, baseados em dados experimentais, têm

procurado estabelecer esta correlação. Assim, foi demonstrado que a mandíbula de gafanhotos, uma das estruturas esclerosadas mais rígidas até agora conhecida (HILLERTON *et alii*, 1982) possui também as fibras de quitina mais espessas, com diâmetros entre 160 e 300 nm (GARDINER & KHAN, 1979).

A mesma correlação foi recentemente assumida para as cutículas das asas, também de gafanhotos, sendo que a região alar sujeita à maior desgaste e às forças de movimentação durante o voo (região da ranhura clavicular basal) apresenta fibras de 25 nanômetros de diâmetro (BANERJEE, 1988), cerca ainda de 10 vezes a espessura das fibras das cutículas em geral (NEVILLE *et alii*, 1976).

A organização destas fibras dentro da matriz protéica teria tanta influência na dureza e na resistência das cutículas quanto os seus diâmetros (HILLERTON *et alii*, 1982), haja visto a existência de um "índice de reforço", que depende das direções adotadas pelas fibras dentro da estrutura (PARRY, 1988).

Adicionalmente, deve-se salientar que estruturas de insetos envolvidas em suporte e proteção, como ootecas e alguns tipos de sedas (KRAMER *et alii*, 1989) também estão sujeitas a processos de esclerose, mesmo embora, na maioria dos casos, sejam completamente livres de quitina ou de qualquer outro polissacarídeo estrutural. Isto faz crer que a quitina não tenha papel direto neste processo, o que já havia sido assumido por BRUNET (1967). Por outro lado, se a síntese de quitina é inibida, existem reduções nas propriedades das estruturas esclerosadas,

como elevações na solubilidade das proteínas, embora o grau de esclerose não se apresente diminuído (CLARKE *et alii*, 1977). Por sua vez, isto deixa claro a participação da quitina na estabilização primária das proteínas.

#### Sistemas quitinosos calcificados

Nestes casos, à matriz orgânica, quitino-protéica, associa-se uma matriz inorgânica, principalmente de natureza calcárea, como acontece em alguns artrópodos (carangueijos e lagostas, por exemplo) e moluscos, em suas carapaças e conchas, respectivamente.

A matriz orgânica pré-formada, ou pelo menos alguns de seus componentes, parece desempenhar importante função na regulação do crescimento e do tipo cristalino do componente inorgânico (SIKES & WHEELER, 1986)

É bem conhecido que na formação dos ossos, onde a matriz orgânica é colagênica, a mineralização inicia-se em espaços ou buracos de 35 angstrons da fibrila, formados nas regiões de alinhamento das moléculas de tropocolágeno, e só então se estendendo às regiões interfibrilares (BERTHET-COLIMINAS *et alii*, 1979; LEES, 1987). Atualmente sabe-se que o processo de calcificação depende também da presença de outros componentes, principalmente de natureza ácida da matriz orgânica óssea (MARKS & POPOFF, 1988), o que justifica o fato de que tendões e outras estruturas ricas em colágeno I, não se calcifiquem como os ossos

fazem normalmente.

Por outro lado, o processo de calcificação em sistemas quitinosos é pouco conhecido.

Giraud-Guille (1984) realizou um estudo ultraestrutural pormenorizado da matriz orgânica das carapaças de carangueijos, tendo descrito aspectos organizacionais em vários níveis, sem no entanto mencionar qualquer relação desta matriz com processos de calcificação.

Argumenta-se, entretanto, que a matriz orgânica, embora com importante papel nas propriedades biomecânicas destes sistemas, atuaria simplesmente como "suporte" para componentes ácidos solúveis superficiais, estes sim, envolvidos na cristalização (WEINER, 1984).

Esta estrutura de suporte teria quitina do tipo  $\beta$  e proteínas em conformação  $\beta$  antiparalela como os principais constituintes, a quitina dispendo-se quase que perpendicularmente às cadeias polipeptídicas (WEINER & TRAUB, 1980, 1984).

De qualquer forma é de consenso que a organização dos componentes da matriz orgânica têm relação com o crescimento e tipo dos cristais de cálcio, ambos contribuindo para a formação de complexos moleculares com ordem e propriedades superiores.



## Problemática do trabalho: O sistema quitinoso de penas de lulas

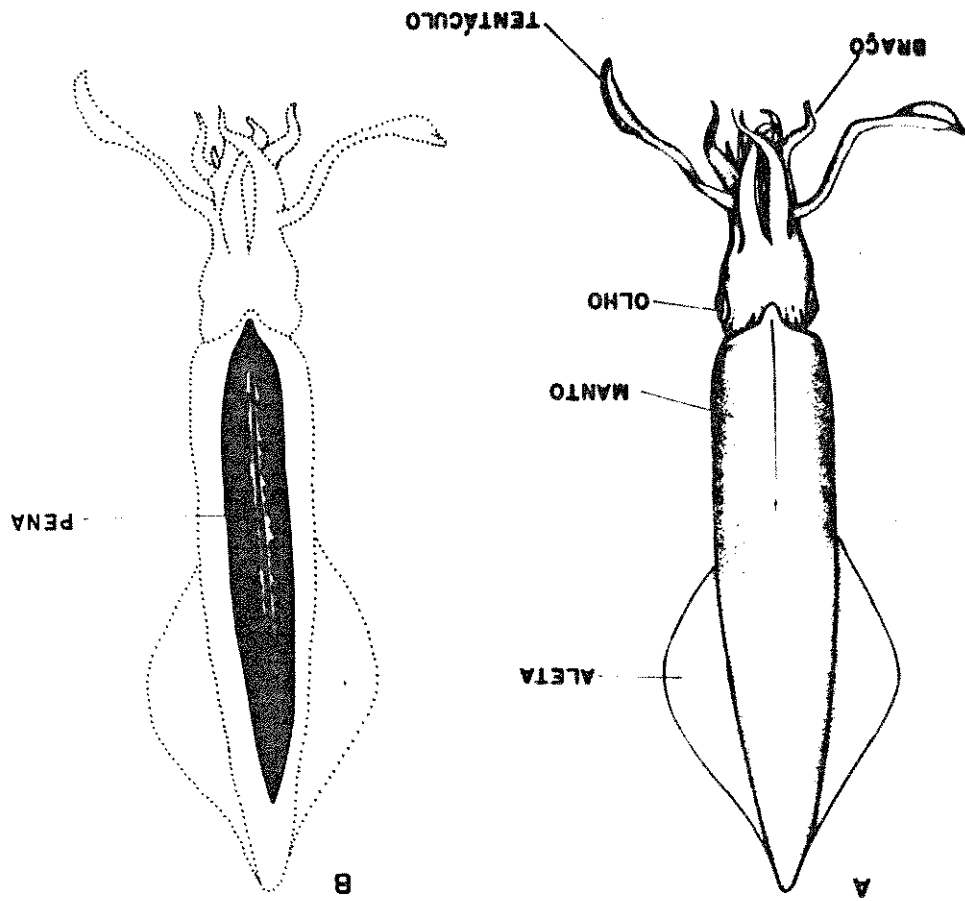
Geralmente, as conchas dos moluscos possuem natureza quitino-protéica calcificada, sendo que a variedade de padrões estruturais e de simetria destas conchas reflete um complicado esquema evolutivo.

Segundo DONOVAN (1964), as alterações finais nesta evolução teriam conduzido à redução das conchas a estruturas não calcificadas.

No grupo das lulas especificamente, a concha tornou-se resquicial e foi internalizada pelo manto. Graças ao seu formato, este resquício de concha é conhecido por "pena", cuja posição e tamanho em relação ao corpo do animal são mostrados na Fig. 3.

Nas lulas, a pena tem pouca participação na estruturação, bem como na resitência da maior parte do corpo, funções estas agora desempenhadas por um epitélio espesso, assentado sobre uma base cartilaginosa (HUNT & NIXON, 1981). É provável, entretanto, que a pena apresente papel estrutural importante durante as fases jovens do desenvolvimento destes animais. Além disto em alguns representantes dos cefalópodos, as conchas verdadeiras são utilizadas como uma câmara de gás que presta-se a facilitar deslocamentos verticais dos animais na água. Nas lulas, este tipo de movimentação dá-se por ação dinâmica da forte musculatura então desenvolvida (PACKARD, 1972).

Fig. 3 - Desenhos esquemáticos de lulas com suas estruturas externas principais denotadas (A) e mostrando a posição do e dimensões aproximadas da pena em relação ao corpo do



Embora alguns aspectos bioquímicos das proteínas totais e da fração covalentemente associada tenham sido publicados (HUNT & NIXON, 1981; HUNT & HUCKERBY, 1987) e o tipo cristalino de quitina bem caracterizado (PICKEN & LOTMAR, 1950; HUNT & NIXON, 1981), detalhes da composição química e características organizacionais do sistema quitinoso encontrado nas penas de lulas são desconhecidos.

A metodologia proposta para resolução da problemática do trabalho

Estudos de difração de raios X demonstraram que as penas de lulas apresentam certa cristalinidade após hidrólise alcalina (HUNT & NIXON, 1981). Esta cristalinidade é atribuída à organização molecular da quitina e pode ser também detectada ao microscópio de polarização, dada a sua birrefringência.

A detecção e quantificação de fenômenos anisotrópicos ópticos, dentre eles a birrefringência, têm possibilitado a determinação da arquitetura macromolecular e de alterações nestes arranjos por ação de diversos fatores naturais ou experimentais em vários complexos biológicos.

Uma das formas de estudo de um material anisotrópico consiste na construção de curvas de birrefringência de forma. Tais curvas são construídas tomando-se medidas de retardo ópticos

após embebição do material em diferentes fluidos com índices de refração conhecidos. Curvas de birrefringência de forma têm sido aplicadas com sucesso no estudo de ordem molecular de estruturas colagênicas (VIDAL, 1980b; MELLO *et alii*, 1979; VIDAL & CARVALHO, 1989b), da quitina (CASTLE, 1936; FREY-WISSLING, 1948; PICKEN & LOTMAR, 1950; VIDAL & CARVALHO, 1986); de sedas (~~MELLO & VIDAL, 1979; MELLO & GARÓFALO, 1976~~; MELLO *et alii*, 1987) e de estruturas celulósicas (FREY-WISSLING, 1948).

Além de curvas de birrefringência de forma, a birrefringência e o dicroísmo linear extrínseco apresentados por materiais submetidos a tratamentos por corantes específicos, são outros fenômenos que prestam-se enormemente à obtenção de informações sobre a organização de complexos moleculares (VIDAL, 1963; 1964; 1972; MELLO & VIDAL, 1973; 1977; 1979; VIDAL & MELLO, 1984; VIDAL & CARVALHO, 1986).

Desta forma, visando a determinação de algumas das características macromoleculares do sistema quitinoso encontrado nas penas, foram empregados testes topoquímicos e eletroforeses para determinação da sua composição química e, principalmente, realizou-se estudos das anisotropias ópticas deste material, inclusive após deproteinização, construindo-se curvas de birrefringência de forma e analisando-se a birrefringência e o dicroísmo linear apresentado após o emprego de alguns dos testes topoquímicos.

**Material e**

**Métodos 2**

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas conchas resquiciais internalizadas (penas) de lulas da espécie *Loligo brasiliensis*, provenientes do litoral paulista e adquiridas em frigorífico local. Os animais utilizados possuíam comprimento do corpo entre 15 e 20 cm. Após dissecação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, incluído em parafina e seccionado em 10  $\mu$ m. Os cortes foram então desparafinizados e submetidos a testes topoquímicos ou examinados sem coloração.

**Remoção de proteínas:** Penas inteiras foram submetidas à hidrólise em NaOH 10% a 4<sup>o</sup>C por 72 horas (RUDALL, 1969) e processadas como descrito acima.

### Testes topoquímicos

#### Proteínas:

Radicais eletropositivos totais foram investigados pelo

uso dos corantes xylydine ponceau 3RS (BHD) a pH 1,7 (VIDAL, 1970), sirius red F3B (GT Gurr) a 0,1% a pH 2,7 VIDAL et alii, 1982) e pelo picrosírius. Como controle foi utilizada a reação de bloqueio de grupos amino por acetilação (LILLIE, 1958), seguida das colorações acima.

Regiões hidrofóbicas foram investigadas pelo uso do 8-anilino-naftaleno-sulfato de sódio (ANS; Kodak - T484) a 0,1% em butanol (VIDAL, 1978; 1980b).

#### Polissacarídeos neutros e glicoproteínas:

Foi utilizado o teste do PAS. Também empregou-se o Congo red (Riedel) a 1% em etanol a 50% em água (VIDAL & CARVALHO, 1986).

#### Glicosaminoglicanos ácidos:

Foram empregados o azul de toluidina (Merck AG) aos pH 4,0 e 2,5 e o azul de alcian 8GX (GT Gurr) aos pH 2,5 e 1,0 (LISON, 1960; LEV & SPICER, 1964).

#### Microscopia de fluorescência

Cortes não corados bem como aqueles tratados pelo ANS-butanol foram examinados em microscopia de fluorescência, utilizando-se equipamento Zeiss com filtro de excitação IIII em combinação com vários filtros de barragem.

## Microscopia de polarização

Os cortes histológicos não corados bem como aqueles submetidos aos testes topoquímicos foram examinados em microscópio de polarização Zeiss. O sinal da birrefringência detectada foi verificado através do uso do compensador de mica, vermelho de primeira ordem, bem como através da compensação da birrefringência do material pelo método de Sénarmont.

### 1 - Curvas de birrefringência de forma:

Foram construídas curvas de birrefringência de forma a partir de medidas de retardos ópticos apresentados por cortes histológicos não corados do material controle e daquele hidrolisado pelos métodos de Sénarmont e de Braece-Koehler (Compensador  $\lambda/10$ ). As medidas foram realizadas após embebição dos cortes em água, misturas de água e glicerol, glicerol puro, óleo mineral neutro (nujol) e óleo Cargill ( $n = 1,53$ ) por cerca de 30 minutos. O comprimento de onda utilizado para as medidas foi de 546 nm, obtido com o uso de filtro Schott.

### 2 - Dicroísmo linear:

Cortes corados pelos xylidine ponceau, sirius red, picrosírius e Congo red foram examinados à microscopia de



polarização a fim de se determinar a existência de dicroísmo linear, i.e. absorção preferencial segundo o posicionamento paralelo ou perpendicular do longo eixo do material em relação ao azimute do vetor elétrico da luz.

### 3 - Relações entre birrefringências e a espessura dos cortes:

As birrefringências intrínseca e de forma de penas de lulas hidrolisadas foram medidas em cortes histológicos com diferentes espessuras. As medidas foram efetuadas com o uso dos compensadores de Sénarmont ( $\lambda/4$ ) e de Braece-Koehler ( $\lambda/10$  e  $\lambda/20$ ). Os incrementos das birrefringências total e intrínseca em função da espessura dos cortes foram examinados após embebição em água e em glicerina a 80%, respectivamente. Os resultados foram submetidos à regressão linear e ao teste de correlação de Pearson, para os quais foi utilizado o programa "Statgraphics - Statistical Graphics System". Os valores de retardo óptico foram tomados como variáveis dependentes da espessura do corte.

## Eletofórese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes das penas de lulas extraíveis por uréia 8M em tampão Tris-HCl 0,2M a pH 6,6 e por cloreto de guanidina (GnCl) 4M em tampão acetato 0,2M a pH 5,8 foram submetidos à SDS-PAGE, segundo ZINGALES (1984). Inicialmente empregou-se a eletrofórese em disco com 6%, 10%, 11% e 12,5% de concentração final de acrilamida, utilizando sempre gel espaçador a 4,8% contendo uréia. As dimensões dos géis foram de 0,5 cm de diâmetro por 6,0 cm de comprimento. A corrida foi realizada com 4,5 mA/tubo (Fonte: Auje, Japão).

Tendo o gel a 11% na eletrofórese em disco apresentado a melhor resolução de bandas, foram realizadas então eletrofóreses em placa vertical com géis contendo essa concentração de acrilamida e com dimensões de 12 cm X 15 cm. A corrida foi realizada com 25 mA de intensidade de corrente e 60V de diferença de potencial inicial.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,05M a pH 6,8 contendo SDS a 2%, em presença ou não de 2-mercaptoetanol a 1% como agente redutor. O tampão de corrida nos dois casos foi Tris-glicina 0,5M a pH 8,8.

Os géis foram corados pelo coomassie brilliant blue R250 (Bio-rad) a 0,25% em solução de metanol: ácido acético: água (4:1:5); pelo fast green FCF a 0,5% em ácido acético a 2,5% ou submetidos à impregnação pela prata (NIELSEN, 1984). A presença

de glicoproteínas foi determinada aplicando-se o teste do PAS ao gel após a corrida.

Os pesos moleculares aparentes das diferentes bandas foram estimados a partir da migração de padrões de peso molecular (Sigma), tendo sido utilizados a anidrase carbônica (PM = 29.000 Da), a albumina de ovo (PM = 45.000 Da) e a albumina de soro bovino (BSA; PM = 66.000 Da).

**Resultados 3**

## RESULTADOS

Os cortes histológicos de penas de lulas exibem uma formação compacta (Figs. 4 e 5), diferindo do material submetido à hidrólise alcalina que apresenta-se formado por feixes que, embora com locais de contato, são relativamente livres (Figs. 6-8).

Os feixes observados nos cortes do material hidrolisado parecem representar cortes transversais de lamelas (Figs. 6-8). Esta formação lamelar é especialmente observada quando algumas delas se destacam ou quando o material parece ter sofrido uma fratura, o que torna evidente o empilhamento destas lamelas.

### Testes topoquímicos

As respostas aos testes topoquímicos estão resumidas na Tabela I.

Destaca-se a colorabilidade ao xyloidine ponceau, sirius red e picrosírius no material hidrolisado, embora em menor intensidade que aquela apresentada pelo material não tratado.

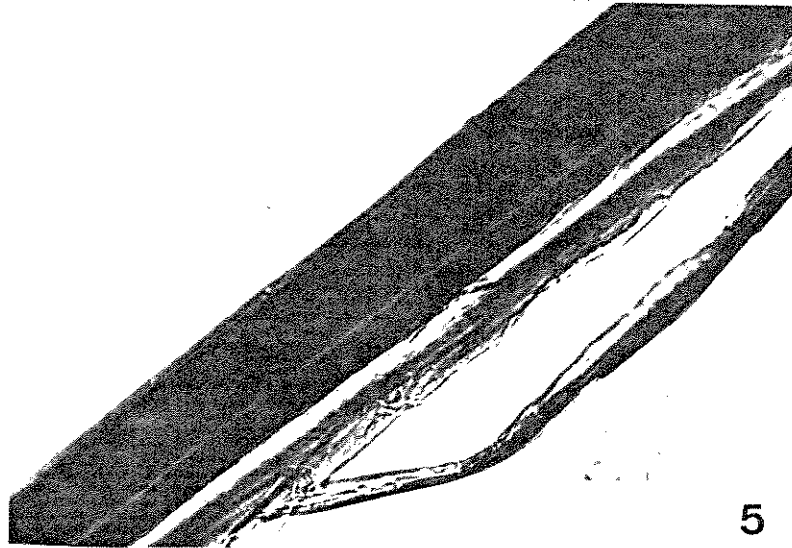
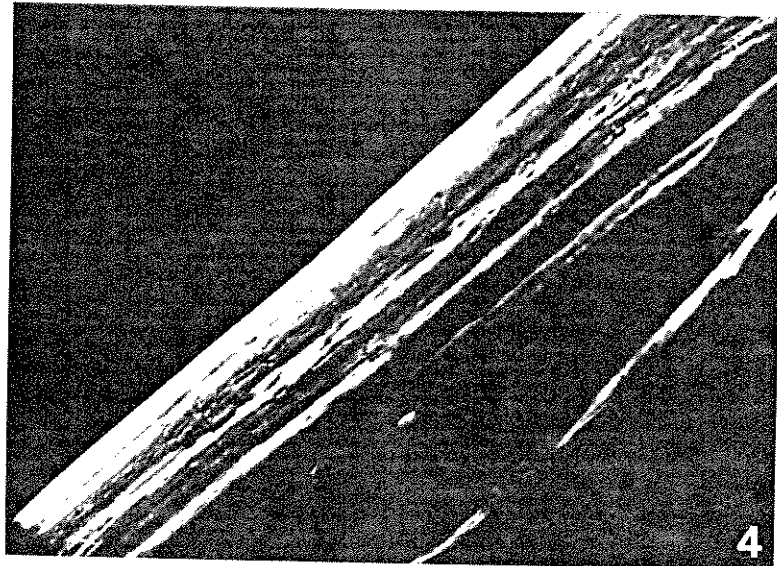


Fig. 4 e 5 - Corte não corado de pena de lula, *Loligo brasiliensis*, examinado à microscopia de polarização. 170X.

Fig. 4 - Birrefringência do material.

Fig. 5 - Aspecto do material da figura anterior após compensação da birrefringência.

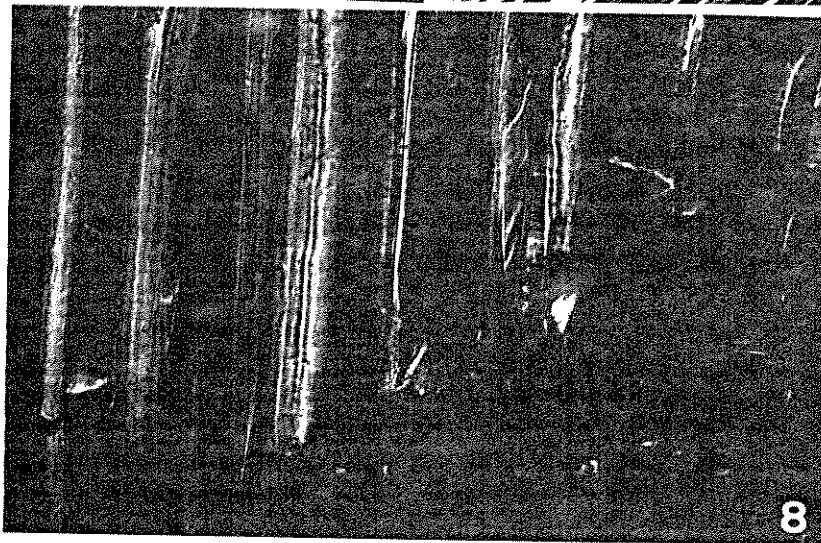
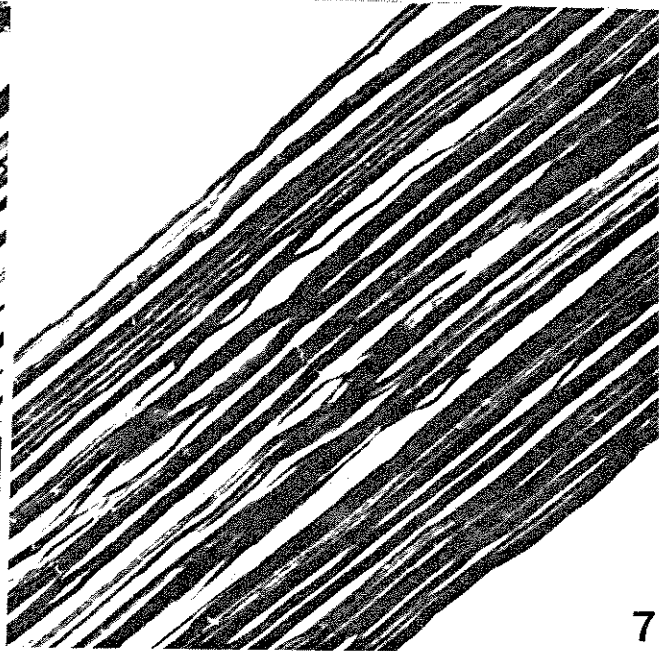
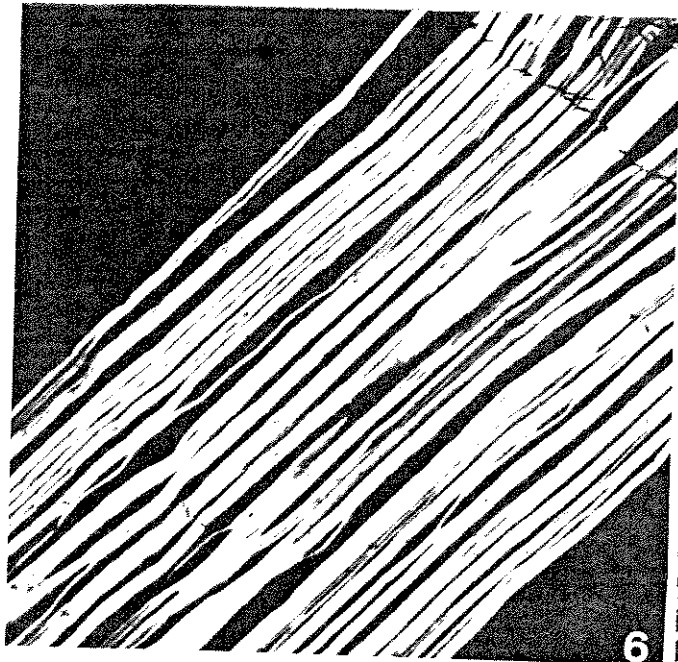


Fig. 6-8 - Corte não corado de pena submetida à hidrólise alcalina, examinado ao microscópio de polarização.  
Fig. 6 - Birrefringência do material posicionado a  $45^\circ$  com relação ao polarizador. 170X  
Fig. 7 - Compensação da birrefringência mostrada na figura anterior. 170X.  
Fig. 8 - Mesmo material das figuras anteriores, em maior aumento e em posição de extinção da birrefringência. 420X

Tabela I - Características topoquímicas das penas de *Loligo brasiliensis*.

Testes	Resultados		Observações	Referências
	controle	hidrolisado		
PAS	+++	++	Polissacarídeos neutros e glicoproteínas	Lison (1960)
Congo red	+++	++	Polissacarídeos	Wood(1980); Vidal & Carvalho(1986)
Xylidine Ponceau(XP)	+++	++	Radicais eletropositivos totais;dicroísmo	Vidal (1970)
Desaminação + XP	+	+	Reatividade de grupos amino	
Sirius red	+++	+++	Cores anômalas de interferência e dicroísmo	
Picrosirius (PS)	+++ (laranja)	+++ (vermelha)	Coloração diferencial; dicroísmo	
Desaminação + PS	-	-	Reatividade de grupos amino	
ANS - butanol	++	-	Regiões hidrofóbicas	Vidal(1978)
Azul de toluidina (AT) pH 2,5	+	-	GAGAs sulfatadas e carboxiladas	Lison(1960)
AT pH 4,0	+	-	GAGAs sulfatadas e carboxiladas	Lison(1960)
Azul de alcian (AA) pH 1,0	++	+	GAGAs sulfatadas	Lev e Spicer (1964)
AA pH 2,5	+	+	GAGAs sulfatadas e carboxiladas	Lison (1960)

(+++) - Coloração intensa

(++) - Coloração moderada

(+) - Coloração fraca

(-) - Não corado



A coloração pelo picrossírius é diferencial, sendo laranja para os cortes não tratados e vermelha para o material hidrolisado. A hidrólise alcalina remove parte do material PAS-positivo encontrado no controle, resultando numa coloração menos intensa após tal tratamento. Os cortes de pena não hidrolisada coram-se fracamente em verde pelo azul de toluidina nos valores de pH utilizados. A intensidade de coloração pelo azul de alcian a pH 1,0 é maior que aquela obtida a pH 2,5. Tanto o material hidrolisado quanto aquele não tratado coram-se intensamente pelo Congo red.

#### Microscopia de fluorescência

Cortes de penas não corados apresentam uma pálida fluorescência natural azulada. Esta fluorescência é abolida pelo tratamento hidrolítico.

Por sua vez, os cortes tratados pelo ANS-butanol exibem fluorescência azul característica. Se o material tratado pelo ANS-butanol for observado em microscópio de fluorescência, também equipado para a microscopia de polarização, substituindo-se o filtro de supressão por um analisador, pode-se estimar a birrefringência do material, provocada pela deposição ordenada das moléculas do ANS (VIDAL, 1978). No presente caso, tal birrefringência não foi encontrada.

## Microscopia de polarização

### Birrefringência

O material não hidrolisado, de formação compacta, exibe birrefringência positiva (Fig. 4), apresentando linhas longitudinais que não se compensam junto à maior parte do material (Fig. 5), embora possua extinção total. Por sua vez, o material hidrolisado mostra birrefringência também positiva, (Figs. 6 e 7; 9 e 10), com extinção parcial apenas (Fig. 8).

Após coloração pelos xylidine ponceau (Fig. 11), sirius red e picrosírius (Figs. 13 e 17) o material apresenta-se com maiores intensidades de birrefringência, segundo avaliação visual. A birrefringência do material corado pelo xylidine ponceau apresenta cor de interferência vermelha, com extinção quase total. Corado pelo picrosírius, o material exibe cores de interferência verde, laranja e vermelha (Fig. 14), sendo que o material hidrolisado apresenta birrefringência com extinção parcial apenas (Fig. 18), indicando a inexistência de um arranjo predominantemente paralelo das moléculas do corante, como aconteceu com aquelas do xylidine ponceau.

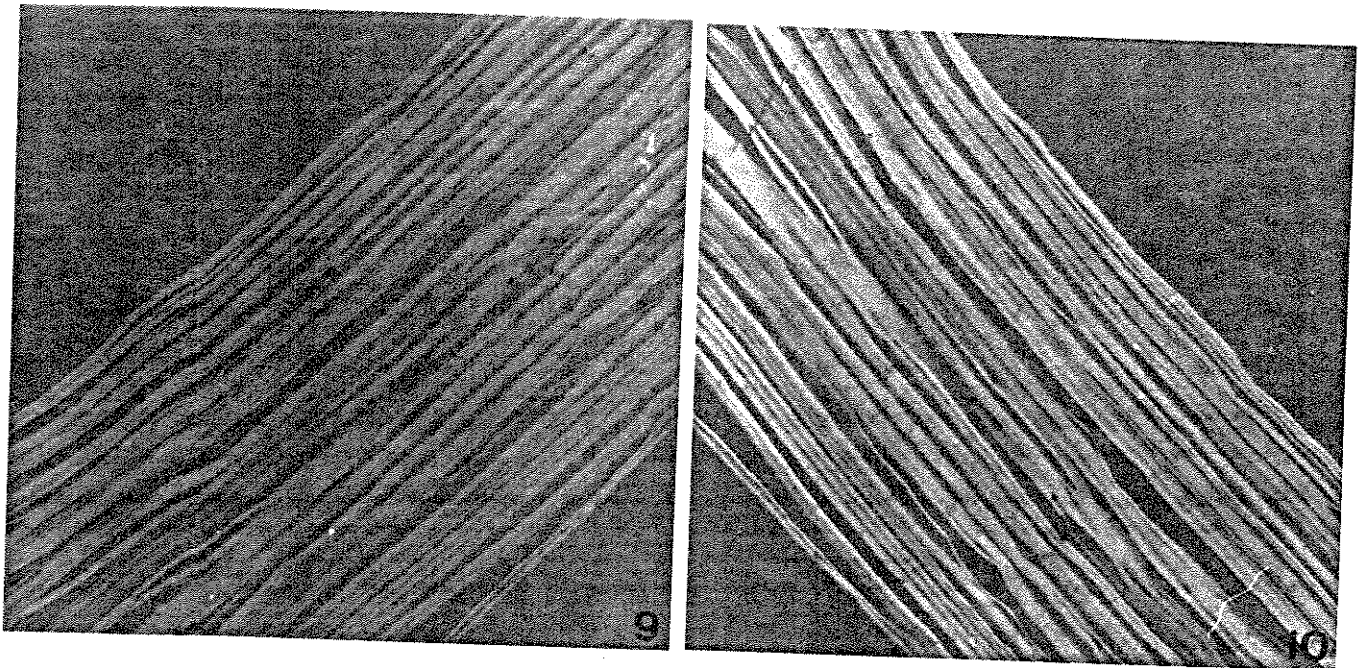


Fig. 9-10 - Corte de pena hidrolisada observada à microscopia de polarização sob compensador de mica, vermelho de primeira ordem. 170X.

Fig. 9 - Material posicionado paralelamente à direcção de maior índice de refração do compensador ( $\gamma$ ).

Fig. 10 - Idem, perpendicular ao  $\gamma$  do compensador.

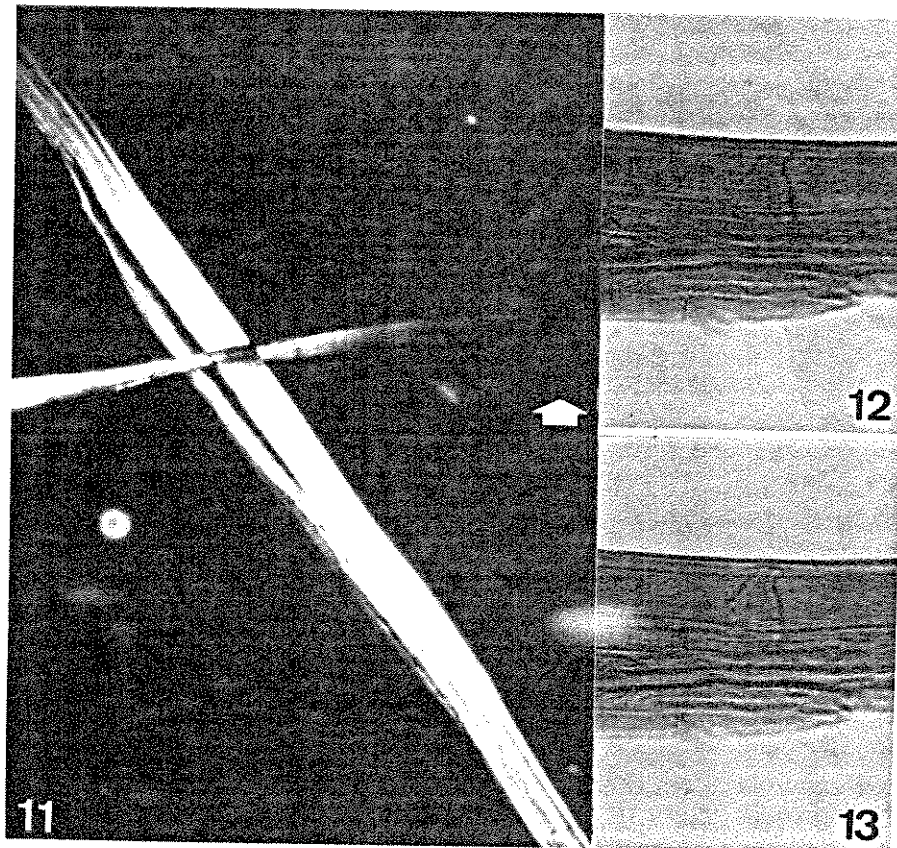


Fig. 11 - 13 - Corte de pena não hidrolisada, corado pelo xylidine ponceau e examinado ao microscópio de polarização

Fig. 11 - Birrefringência do material. Parte do material, posicionado paralelamente ao analisador, encontra-se em posição de extinção (seta). 70X.

Fig. 12 e 13 - Dicroísmo linear. Absorção apresentada pelo material em posição paralela (Fig. 12) e perpendicular (Fig. 13) à direção de propagação da luz polarizada. 170X.

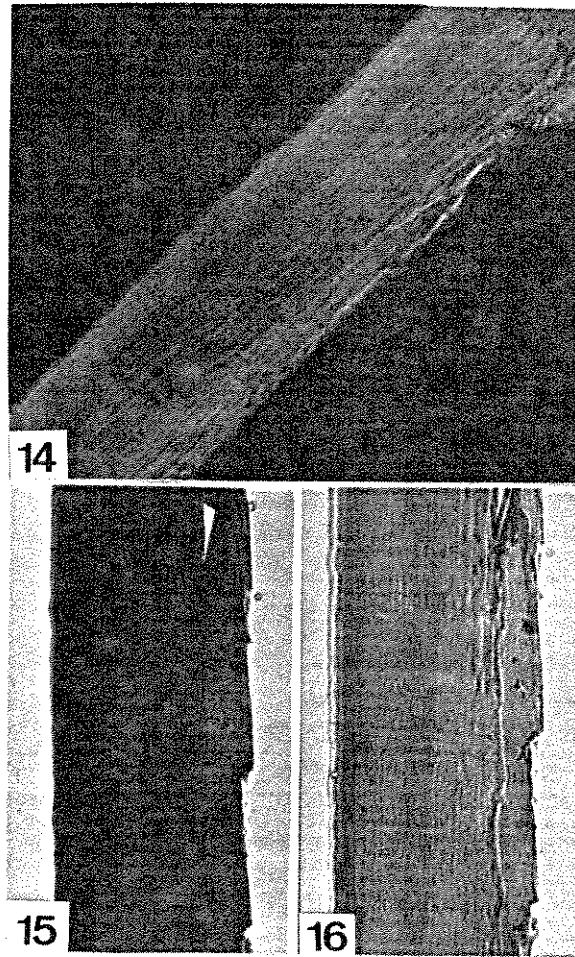


Fig. 14-16 - Corte de pena não hidrolisada, corado pelo picosírius. 420X.

Fig. 14 - Birrefringência do material corado. Notar as cores de interferência da mesma.

Fig. 15 e 16 - Dicroísmo linear apresentado pelo material da Fig. 14, posicionado paralela (Fig. 15) e perpendicularmente (Fig. 16) ao eixo de propagação da luz polarizada.

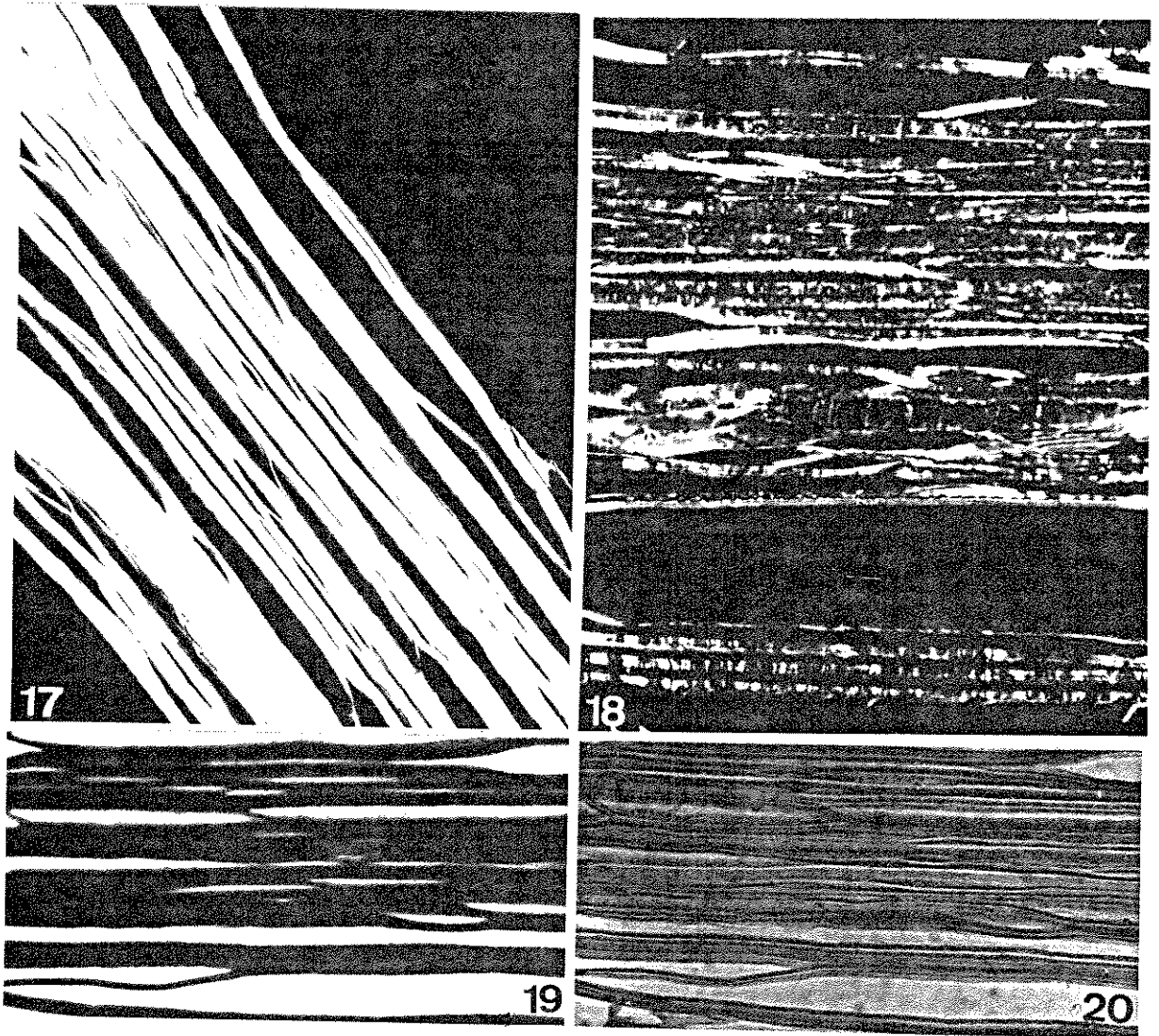


Fig. 17 - 20 - Corte de pena hidrolisada, corado pelo picrosírius e observado em microscópio de polarização. 420X.  
 Fig. 17 - Aspecto da birrefringência mostrada pelo material corado.  
 Fig. 18 - Material direcionado paralelamente ao polarizador, em posição de extinção da birrefringência.  
 Fig. 19 e 20 - Dicroísmo linear. Aspectos da absorção da luz polarizada pelo material posicionado paralela (Fig. 19) e perpendicularmente (Fig. 20) ao seu eixo de propagação.

## Dicroísmo linear extrínseco

Tanto o material não tratado como aquele hidrolisado exibem dicroísmo linear extrínseco positivo quando corados pelo xylidine ponceau, sirius red e picrosírius (Figs. 12 e 13; 15 e 16; 19 e 20), com intensidades crescentes na ordem apresentada. O dicroísmo mais intenso, apresentado pelo material não tratado após coloração pelo picrosírius exibia diferentes intensidades de laranja, enquanto o material hidrolisado exibia cores vermelha, quando posicionado paralelamente ao polarizador, e rósea, quando em posição perpendicular.

## Curvas de birrefringência de forma

As curvas de birrefringência de forma construídas para cortes de penas submetidas ou não à hidrólise alcalina são mostradas na Fig. 21. Os perfis das duas curvas são semelhantes, com valores de retardo ópticos maiores para o material hidrolisado. A curva obtida para o material hidrolisado tem seu ramo esquerdo mais inclinado. O ponto de menor retardo, relacionado à birrefringência intrínseca do material, localiza-se nos dois casos em  $n = 1.435$  (glicerina 80%).

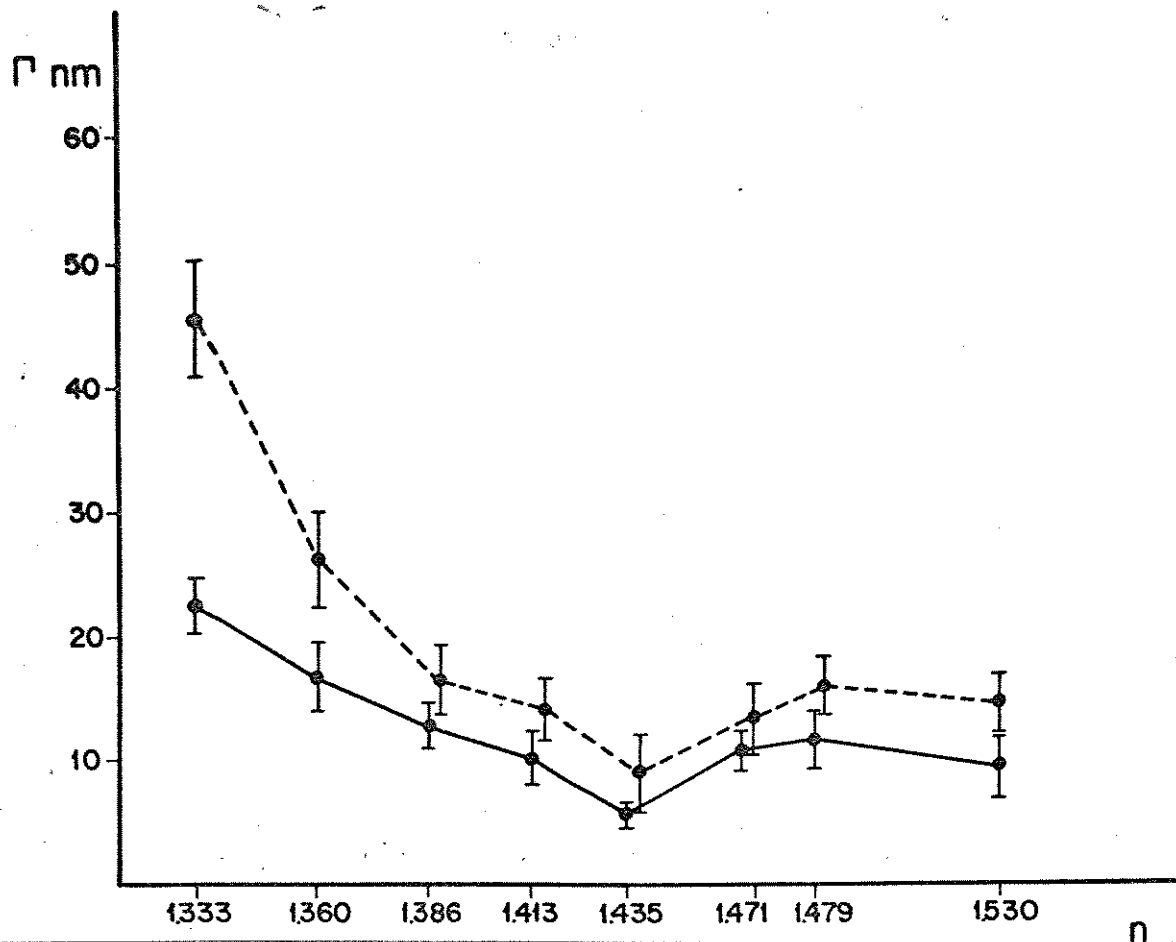


Fig. 21 - Curvas de birrefringência de forma construídas para os cortes de penas não tratadas (————) e submetidas à hidrólise alcalina (- - - - -). Cada ponto representa a média de 20 medidas, acompanhada do respectivo desvio padrão.  $\Gamma$  = retardos ópticos;  $n$  = índice de refração do meio de embebição



## Relações entre as birrefringências intrínseca e de forma e a espessura dos cortes

Os valores de retardo óptico apresentados pelo material hidrolisado em cortes de diversas espessuras são mostrados na Fig. 22. Os parâmetros das regressões lineares realizadas para os valores de retardo óptico referentes às birrefringências total e intrínseca são apresentados na Tabela II. Os coeficientes de correlação, bem como a análise de variância, mostrados na Tabela II demonstram a existência de grande identidade entre os valores experimentais e as equações calculadas.

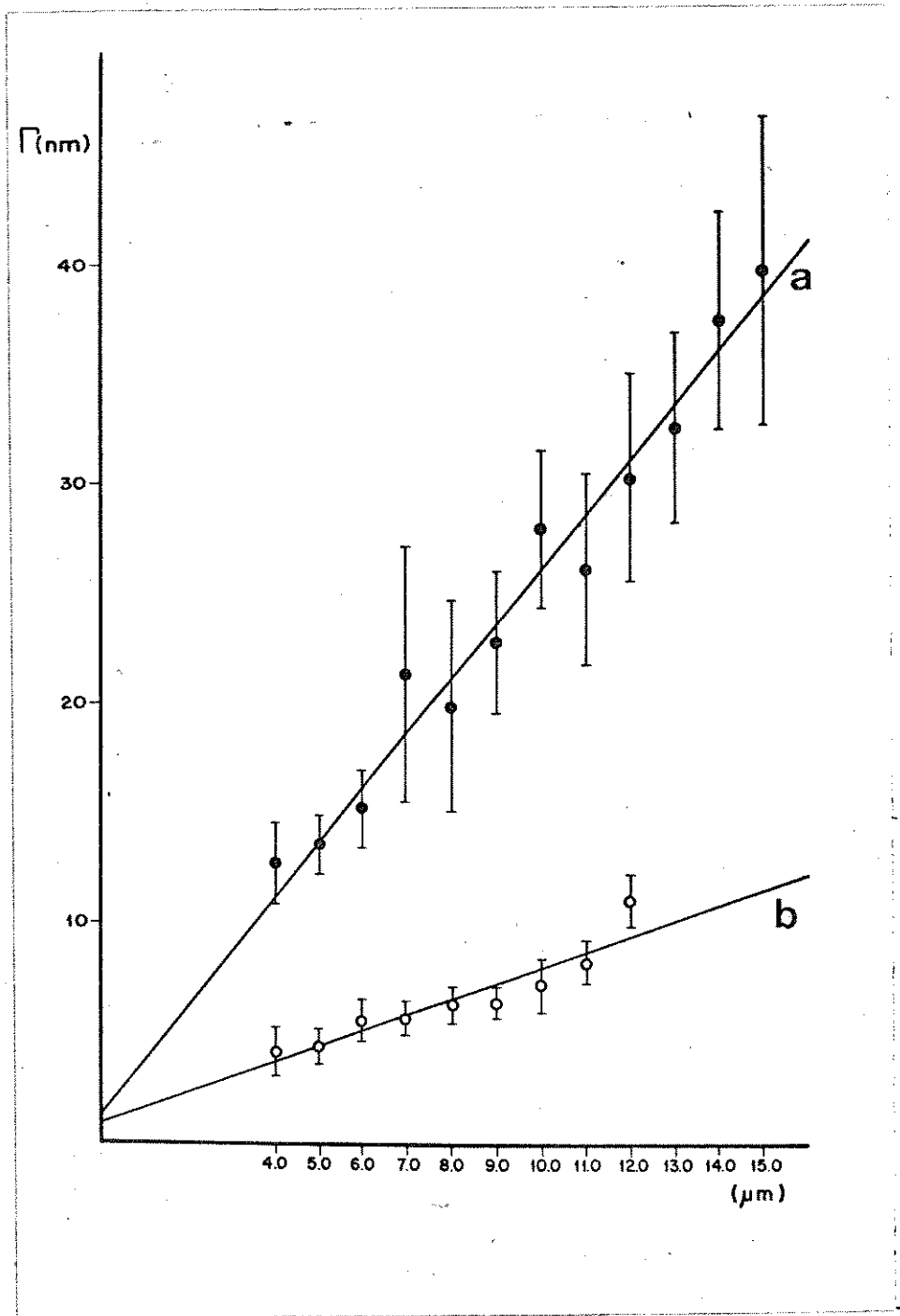


Fig. 22 - Curvas construídas com medidas de retardo óptico referentes às birrefringências total (a) e intrínseca (b) de penas de lulas em cortes histológicos com diferentes espessuras e as respectivas retas obtidas por regressão linear.

Tabela II - Parâmetros da análise de regressão dos valores de retardos ópticos como variáveis dependentes da espessura dos cortes de pena de lula, *Loligo brasiliensis*

	Intercepto	Inclinação	Valor F	Coefficiente de correlação
Birrefringência total (embebição em água)	1,145	2,493	1037,27* GL=238/1	0,9019
Birrefringência intrínseca (embebição em glicerol 80%)	0,786	0,715	449,20* GL=178/1	0,8463

\* p<0.01%; altamente significativo.

## SDS-PAGE

O padrão eletroforético do material extraído de penas de lulas é mostrado nas Figs. 23 e 24. Embora a uréia e o  $\text{GnCl}$  sejam ambos agentes caotrópicos, no presente caso eles extraem diferentes componentes da pena de lula, como demonstrado pelos padrões eletroforéticos. A presença do 2-mercaptoetanol como agente redutor muda o padrão de bandas da amostra extraída por uréia, tornando aparente a presença de três bandas principais, com pesos moleculares aproximados de 50.000 Da, 30.000 Da e 17.000 Da, identificadas na Fig. 24. O material extraído por  $\text{GnCl}$  destaca-se por sua insensibilidade à redução pelo 2-mercaptoetanol.

Não foram detectadas diferenças entre os padrões obtidos pela coloração pelo fast green FCF (Fig. 24) e pela impregnação pela prata. Por sua vez, a resolução de bandas na eletroforese em disco (Fig. 23) parece ser melhor que aquelas obtidas pela eletroforese em placa vertical (Fig. 24).

Todas as bandas obtidas pela eletroforese em SDS-PAGE e coradas pelo fast green FCF foram reativas ao teste do PAS.

Os pesos moleculares aparentes, calculados através da migração de padrões de peso moleculares são mostrados na Tabela III.

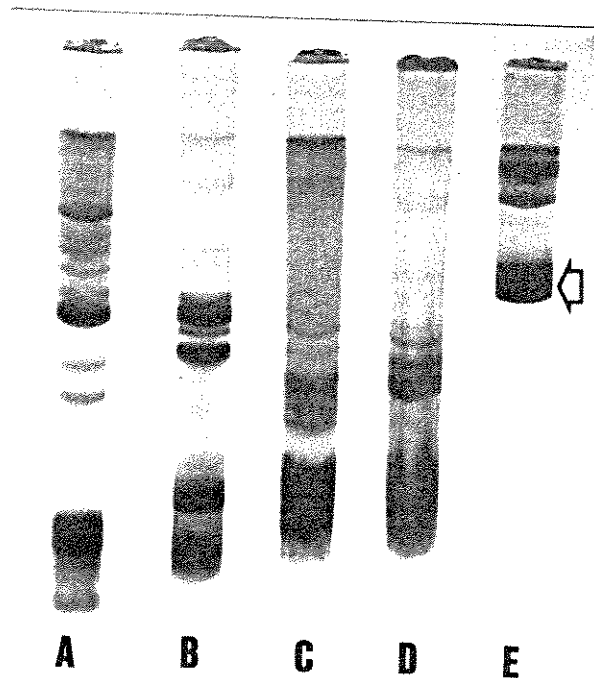


Fig. 23 - Eletroforese em disco de proteínas solúveis de penas de lulas em gel a 11%. Coloração pelo coomassie brilliant blue R250.

A - Material extraído por uréia

B - Material extraído por uréia e reduzido por 2-mercaptoetanol

C - Material extraído por GnCl

D - Material extraído por GnCl e reduzido por 2-mercaptoetanol

E - BSA (+); PM = 66.000 Da.

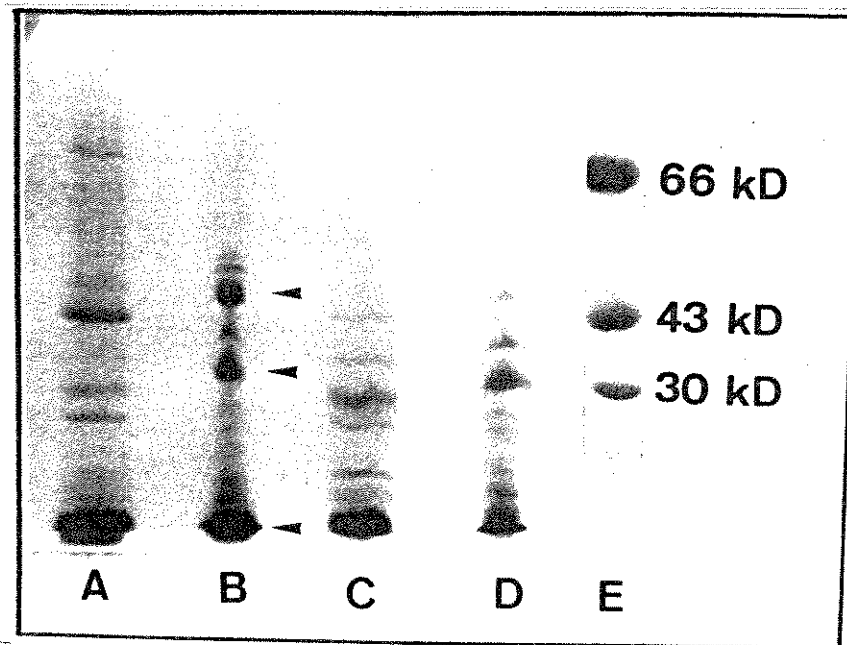


Fig. 24 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 11% de proteínas de penas de lulas, corada pelo fast green FCF.

A - Proteínas extraídas por uréia

B - Proteínas extraídas por uréia e reduzidas por 2-mercaptoetanol. As pontas de setas indicam as três principais bandas obtidas após redução.

C - Proteínas extraídas por GdnCl

D - Proteínas extraídas por GdnCl e reduzidas por 2-mercaptoetanol

E - Padrões de pesos moleculares.

Tabela III - Pesos moleculares das diferentes bandas obtidas por eletroforese de extratos de penas de lulas, estimados a partir da migração de padrões de peso molecular.

URÉIA			GuCl		
Migração	Rf	Peso molecular	Migração	Rf	Peso molecular
3,85	,3392	73.000			
6,15	,5419	45.000			
6,40	,5639	43.000			
6,90	,6079	39.000	7,00	,6167	38.500
			7,75	,6828	32.500
8,35	,7357	28.500	8,60	,7577	27.500
8,90	,7841	25.500	8,90	,7841	25.500
10,10	,8899	20.000	10,00	,8811	20.300
			10,45	,9207	18.500
10,80	,9515	17.000	10,90	,9604	17.000

Padrões de peso molecular

Migração	Rf	Peso molecular
3,80	,3348	66.000
6,55	,5770	43.000
7,75	,6828	30.000

# Discussão 4



## DISCUSSÃO

### Estrutura, composição e orientação macromolecular

Os cortes de pena hidrolisada revelam a natureza lamelar destas estruturas, especialmente detectada quando se observa uma região de fratura do material, o que não pode ser observado no material não hidrolisado.

O aumento da intensidade da birrefringência conforme tais lamelas são empilhadas, sem no entanto apresentar diferentes cores de interferência, demonstra o carácter aditivo da birrefringência e neste caso, relaciona-se à existência de um direcionamento concordante das fibras que compõem as diferentes camadas.

A hidrólise alcalina parece dissociar as lamelas uma das outras. Isto sugere a existência de um material cimentante, provavelmente protéico, que mantém unidas tais lamelas, formando assim a estrutura compacta observada nos cortes de penas não hidrolisadas.

A existência de faixas mais claras intermeando o

material birrefringente não hidrolisado, após compensação, revela a existência de lamelas formadas por fibras com direção de deposição diferente ou ainda, refere-se à substância cimentante.

Estruturas esclerosadas não respondem a testes topoquímicos. Este fato tem sido relacionado a não disponibilidade dos radicais reativos por impedimentos espaciais (estéreo arranjo) ou ainda por comprometimento dos radicais investigados em ligações intermoleculares (RUNHAM, 1961; MELLO & GARÓFALO, 1986; MELLO *et alii*, 1987).

Os cortes histológicos de penas de lulas foram reativos a todos os testes topoquímicos empregados, o que demonstra a disponibilidade química e espacial dos componentes investigados.

A fraca coloração verde exibida pelo material não hidrolisado corado pelo azul de toluidina indica a existência de radicais ácidos, ionizados neste valor de pH, relativamente raros e distantes entre si, o suficiente para não caracterizarem um fenômeno ortocromático (TOEPFER, 1970).

As intensidades de coloração pelo azul de alcian aos pH 2,5 e 1,0 diferem daquelas relatadas normalmente para estruturas que possuem radicais carboxílicos e sulfatados livres. Nestes casos, a maior coloração é obtida a pH 2,5, quando estes dois radicais estão ionizados. Contrariamente, a pH 1,0 somente aqueles sulfatados estariam hábeis em ligar moléculas do corante, concorrendo para uma menor intensidade de reação. Os resultados obtidos neste trabalho, no entanto, podem significar que o azul de alcian possui outras maneiras de ligação que não

eletrostática, como já reportado por MARSHALL & HOROBIN (1973) e/ou este corante poderia ser quelado através do cobre de suas moléculas pela quitina, que é capaz de adsorver metais (TSEZOS & VOLESKY, 1982), como o faz a sua derivada quitosana (OGAWA *et alii*, 1984). Neste caso, o pH teria influência sobre a formação do complexo quitina-metal. RUNHAM (1961) propôs mecanismo semelhante para justificar a reatividade da quitina presente em rádulas de *Patella vulgata* ao azul de alcian e à reação de Hale para glicosaminoglicanos ácidos.

O Congo red liga-se a polissacarídeos por pontes de hidrogênio (WOOD, 1980) e é especialmente utilizado na coloração de mucinas (CONN, 1967) e corpos amilóides. No caso presente, as colorações apresentadas pelos dois materiais são tão intensas que impossibilitam a detecção de diferenças entre eles. O que poderia acarretar diferenças na resposta ao Congo red seria a remoção de glicoproteínas que, possivelmente, ligassem moléculas do corante à sua porção glicídica, colaborando com a colorabilidade do material não tratado.

A intensa colorabilidade que o material não hidrolisado apresentou após tratamento pelo xylidine ponceau, pelo sirius red e pelo picrosírius relaciona-se à existência de radicais eletropositivos, comumente atribuídos a grupos amino livres pertencentes às proteínas. A reatividade do material hidrolisado é atribuída à presença de grupos amino ionizáveis não acetilados da quitina, já que a hidrólise alcalina é tida como eficiente na remoção de proteínas. A existência de grupos amino não acetilados

pode ser devida à deacetilação provocada pela hidrólise ou ainda à exposição de tais grupos em sítios de ligação entre a quitina e proteínas (RUDALL, 1963; RUDALL & KENCHINGTON, 1973).

Embora não existam diferenças na colorabilidade do material não tratado e aquele hidrolisado, frente às colorações pelo xylidine ponceau e sirius red, a colorabilidade pelo picrosírius é diferencial. O material controle cora-se em tons de laranja, enquanto o material hidrolisado cora-se em vermelho.

A tonalidade laranja exibida por estruturas protéicas coradas pelo picrosírius compõe-se de uma mistura de cores, vermelha do corante (sirius red) e amarela do ácido pícrico presente na solução corante. Pode-se então afirmar que a coloração vermelha apresentada pelo material hidrolisado é devida à sua reatividade exclusiva com o corante e não com o ácido pícrico. Desde que a colorabilidade de ambos materiais é abolida pela reação de bloqueio dos grupos amino, pode-se concluir que a ligação das moléculas do sirius red dá-se por interações eletrostáticas com os grupos amino, enquanto a ligação do ácido pícrico ocorre de outra forma que não eletrostática, com outras regiões das proteínas.

A deposição orientada de moléculas do ANS foi relatada quando a secreção salivar de *Bombus atratus* foi tratada pelo ANS-butanol (MELLO & VIDAL, 1979), combinando-se observação de fluorescência e anisotropia (VIDAL, 1978). Este tipo de secreção é rico em  $\alpha$ -fibroína (MELLO & VIDAL, 1979), uma proteína com predominância em aminoácidos com cadeias laterais curtas, o que

possibilita uma alta agregação lateral de suas cadeias e com isso alta cristalinidade. A deposição do ANS pôde ser orientada devido a sua estrutura molecular plana e rígida, além da existência de ordenação molecular dos sítios hidrofóbicos do material onde o corante se deposita (MELLO & VIDAL, 1979). A não constatação deste fenômeno em cortes não hidrolisados de penas de lulas, examinados da mesma forma, sugere uma distribuição não arranjada dos sítios hidrofóbicos onde é depositado o ANS ou, mais provavelmente, estes sítios sejam grandes o suficiente para alojar um bom número de moléculas deste corante, estas sim, sem orientação preferencial. Isto corroboraria as suposições de HUNT & NIXON (1981) sobre a existência de uma estrutura globular, ao menos em parte, do componente protéico presente nas penas de lulas.

A remoção de parte do material PAS-positivo pela hidrólise alcalina indica a existência de radicais glicídicos associados às proteínas removidas, constituindo glicoproteínas, o que foi comprovado pelas eletroforeses.

As eletroforeses demonstram ainda a existência de pelo menos 10 componentes glicoprotéicos. Este número é maior que aquele referido por HUNT & NIXON (1981).

A mudança do padrão eletroforético do material extraído por uréia em presença de 2-mercaptoetanol demonstra que a pequena quantidade de resíduos de cisteína encontrada na fração solúvel das proteínas da pena (HUNT & HUCKERBY, 1987) está envolvida na estabilização de complexos protéicos formados pelos três

componentes principais encontrados após redução.

Corado quer seja pelo xyloidine ponceau, pelo sirius red ou pelo picrosírius, o material apresenta birrefringência positiva, com cores de interferência vermelha no primeiro caso e verdes, amarelas e vermelhas em vários tons e combinações nos outros dois. Estas cores de interferência da birrefringência são semelhantes àquelas obtidas para agregados de moléculas do sirius red e àquela de feixes de colágeno corados da mesma forma (VIDAL *et alii*, 1982).

As cores de interferência resultam da interação de cada comprimento de onda da luz policromática utilizada com o material corado e refletem variações na concentração desse material.

A presença de cores de interferência em cortes de pena corados pelo sirius red e pelo picrosírius resultam da não homogeneidade na distribuição do material protéico ao longo do corte, como acontece com feixes de colágeno tratados com estes corantes (VIDAL *et alii*, 1982), sendo que, apresentadas mesmo por cristais do corante, estas cores de interferência relacionam-se à quantidade e ao estado de agregação das moléculas do corante.

A inexistência de correlação lógica entre a natureza do fenômeno e a composição química do material inviabiliza a utilização das cores de interferência da birrefringência, obtidas pela coloração com o picrosírius na identificação de diferentes tipos de colágeno, como foi proposto por JUNQUEIRA e colaboradores (1979).

Por sua vez, a análise do dicroísmo linear consiste num dos métodos mais refinados para a determinação de organização molecular (NORDÉN, 1977). Este fenômeno anisotrópico óptico baseia-se na absorção diferencial da luz polarizada pelo material corado, conforme sua orientação em relação ao azimute do vetor elétrico da luz, causada pela associação orientada do corante a um substrato biológico macromolecularmente organizado.

O dicroísmo linear apresentado pelo material em estudo, após coloração pelos xylidine ponceau, sirius red e picrossírius, indica que o componente protéico presente nas penas de lulas possui radicais eletropositivos organizados de modo a determinar uma deposição ordenada das moléculas dos corantes. A maior participação dos grupos amino das proteínas na colorabilidade e no dicroísmo linear apresentado é sugerida pelo fato de que a quantidade de grupos amino restantes após hidrólise é bem reduzida, como comprovado por experimento microespectrofotométrico, aplicando-se o corante Coomassie Brilliant Blue G250 a cortes histológicos (CARVALHO & VIDAL, 1989 - Trabalho não publicado).

Desta maneira, tais achados são fortes indicadores da existência de uma ordenação macromolecular do componente protéico presente nas penas de lulas.



## Organização molecular e estado de agregação

A birrefringência apresentada por cortes histológicos de penas de lulas, antes e após hidrólise alcalina, sofre alterações que acompanham variações do índice de refração do meio de embebição indicando a participação de um componente de forma (birrefringência de forma) na birrefringência total exibida pelo material.

Assume-se que materiais com birrefringência de forma positiva possuam moléculas com natureza assimétrica, sendo semelhantes a bastonetes cuja rede cristalina guarda certas relações de dimensões com o comprimento de onda da luz utilizada (FREY-WISSLING, 1948; MÓDIS, 1974).

Contrariamente ao perfil da curva de birrefringência de forma <sup>S</sup> <sub>A</sub> ~~construída~~ para tendões quitinosos (VIDAL & CARVALHO, 1986), que se aproxima a uma parábola, existe para o presente material uma assimetria dos ramos da curva em relação a um eixo imaginário que passe pelo seu ponto mínimo. Tal fato relaciona-se a diferenças entre as frações volumétricas da micela cristalina e do meio de embebição, o que é mais acentuado no material hidrolisado.

Comparando-se as curvas obtidas para o material antes e após hidrólise alcalina, nota-se que os valores obtidos são mais afastados quando o meio de embebição é a água ou glicerina a 20% e 40%. Tendo-se em vista a polaridade da quitina, em especial o



tipo  $\beta$  encontrado nas penas, que é mais facilmente hidratado (PERVAIZ & ABDUL-HALEEM, 1975), descarta-se a possibilidade de que este aumento de retardos ópticos seja devido a uma contração do material em resposta a diferenças de hidrofobicidade entre o meio de embebição e o material hidrolisado.

Por outro lado, a obtenção de valores superiores ao longo de toda a curva construída para o material hidrolisado relaciona-se provavelmente a uma maior interação entre as fibrilas de quitina, o que possibilitaria a formação de novas pontes de hidrogênio, resultando em uma estrutura mais agregada e com maior cristalinidade.

Reforça esta idéia, o fato observado de que a pena deproteïnizada é menos solúvel em ácido fórmico a 88% do que o material não tratado (HUNT & NIXON, 1981). Isto claramente indica uma maior estabilidade do sistema, de acordo com o suposto acima.

Apesar desta maior estabilidade frente ao tratamento ácido pelo material hidrolisado, é de consenso que a presença de uma matriz embebendo fibrilas concorreria para o estabelecimento de biocomplexos com propriedades biomecânicas superiores (JENSEN & WEISS-FOGH, 1962; SANWYER & GEORGE, 1984). Adicionalmente, a existência de uma ordenação molecular nesta matriz embebente seria outro fator que atuaria no aprimoramento das características fisiológicas, além de mecânicas, de complexos macromoleculares biológicos (VIDAL, 1963; 1964; VIDAL & MELLO, 1984).

Num sistema como o encontrado nas penas de lulas, parte

das proteínas atuaria mantendo um afastamento entre as fibrilas, o que concorreria para que a estrutura se tornasse mais plástica, o que já foi sugerido por HUNT e NIXON (1981).

Alguns dos componentes protéicos encontrados poderiam estar envolvido na formação de "pontes" entre diferentes fibras de uma mesma lamela e ainda participar como cimentante, mantendo unidas diferentes lamelas, impedindo o livre deslocamento entre elas.

No caso de estruturas compostas por quitina do tipo  $\beta$ , como nas penas, as proteínas que constituem a matriz onde estão embebidas as fibrilas de quitina, atuariam ainda reduzindo a sensibilidade à hidratação e à degradação enzimática (BLACKWELL & WEIH, 1984).

Ambas as curvas de birrefringência de forma obtidas possuem o ponto com valores mínimos de retardo óptico localizado em  $n = 1,435$  (glicerina 80%). Este ponto relaciona-se à birrefringência intrínseca do material e corresponde àquele encontrado para tendões quitinosos (VIDAL & CARVALHO, 1986).

Descartando-se a possibilidade de que variações nas espessuras dos cortes fossem as responsáveis pelas variações na birrefringência intrínseca, alterações nos valores de retardo óptico referentes à birrefringência intrínseca seriam promovidos por mudanças na concentração de elétrons polarizáveis e pela dispersão dos dipolos de todas as transições eletrônicas do material (LANDOWNE, 1985; VIDAL & CARVALHO, 1989a).

O maior valor de retardo óptico referente à

birrefringência intrínseca do material hidrolisado em relação ao material não tratado relaciona-se a uma maior cristalinidade do primeiro. Tal fato envolve a idéia de existência de um fenômeno de auto-compensação provocada pela orientação não concordante dos momentos de transição de elétrons presentes em grupos de ligações moleculares de componentes extraídos pela hidrólise, em relação àqueles da quitina, de tal sorte a subtrair parte de sua birrefringência intrínseca.

Além disto, HUNT e HUCKERBY (1987) descreveram a existência de resíduos de aminoácidos no polipeptídeo covalentemente associado à quitina que, segundo eles, facilitaria a adoção de uma conformação pregueada ("β-pleated sheet"). Para acomodar-se aos nossos achados, tais polipeptídeos alongados deveriam estar inclinados em relação ao longo eixo das fibrilas quitinosas.

Entretanto, além de possuírem 1/3 de seus aminoácidos representados por glicina, o que em parte justifica a suposição de HUNT e HUCKERBY (1981), este polipeptídeo possui ainda 1/10 de seu conteúdo em aminoácidos em tirosina e 1/10 em prolina, o que aumentaria a possibilidade de ocorrência de uma conformação globular, ao ~~menos~~ <sup>MENOS</sup> em parte, já que estes últimos aminoácidos são hábeis em formar sítios hidrofóbicos e formar falhas em estruturas secundárias da molécula ("β-turn inducer"; FREEDMAN, 1979), respectivamente.

Pode-se supor também, a ocorrência de uma distorção das cadeias de quitina, após remoção das proteínas, o que concorreria

para um melhor alinhamento das mesmas e maiores valores de retardo óptico devido à birrefringência intrínseca. Esta distorção dar-se-ia em função da adoção de uma nova geometria pelo agregado cristalino como um todo, o que, segundo DE VOE (1964), poderia determinar uma nova direção preferencial de oscilação.

Estas observações não decrescem o mérito dos achados concernentes ao dicroísmo linear e das conclusões deles decorrentes.

A pena é mais uma estrutura quitinosa por nós analisada e que apresenta birrefringência positiva independente do índice de refração do meio de embebição utilizado, que tem sempre variado entre  $n = 1,333$  e  $n = 1,530$  e, com exceção do óleo Cargill ( $n = 1,530$ ), tem sempre carácter hidrofílico. Estes dados discordam de achados anteriores que descreveram a existência de birrefringência intrínseca negativa para a quitina, atribuídos à ligação  $-H_3C=O$  do grupo acetilamino, supostamente com direção perpendicular ao longo eixo da molécula (FREY-WISSLING, 1948; PICKEN & LOTMAR, 1950).

Estas discrepâncias podem ser atribuídas à ocorrência de variações da birrefringência intrínseca de um material anisotrópico em função da natureza dos meios de embebição utilizados (CASSIM & TAYLOR, 1965). Além disto, tais variações têm sido descritas para outros sistemas como feixes de colágeno (VIDAL *et alii*, 1975; VIDAL, 1980a; PIMENTEL, 1981), queratinas de alto peso molecular (VIDAL & CARVALHO, 1989a) e fibras de

poli- $\gamma$ -benzil-L-glutamato (VIDAL, 1986).

Variações devidas a este fator específico foram também encontrados em estruturas quitinosas (CASTLE, 1936; FREY-WISSLING, 1948). Neste casos, existe ainda uma inversão do sinal da birrefringência, o que não foi encontrado para os outros sistemas mencionados acima.

As alterações encontradas para a quitina parecem não estar relacionadas à hidropaticidade do meio de embebição (CASTLE, 1936), mas sim a outros fenômenos tais como à associação orientada de componentes dos meios de embebição ou à sua penetração incompleta (CASTLE, 1936; FREY-WISSLING, 1948; ASCENZI & BONUCCI, 1961; VIDAL & CARVALHO, 1986), sem relacionar ainda pequenas variações metodológicas como a forma e o período de embebição e o comprimento de onda da luz utilizada na medidas.

Tais fatos advogam mais uma vez a maior adequação dos meios de embebição aqui utilizados, quais sejam, água, misturas de água e glicerol e glicerol puro, além do nujol.

#### Relações entre birrefringências e espessura do corte

A análise da variação da birrefringência em função da espessura dos cortes, ao lado de outras metodologias, foi utilizada recentemente para se averiguar a influência da não homogeneidade da espessura de cortes histológicos nos valores de retardo óptico quando se comparam diferentes estados fisiológicos

de uma estrutura anisotrópica (VIDAL & CARVALHO, 1989b).

Como constatado em feixes de colágeno (VIDAL & CARVALHO, 1989b) existe pouca variação de valores de retardo óptico apresentado por penas hidrolisadas, em torno de um valor médio (ou mediano - resultado não mostrado) para uma dada espessura do corte, possibilitando assim o seu uso na detecção de alterações de ordenação macromolecular.

Tal estudo demonstra a dependência direta dos valores de retardo óptico da espessura do material anisotrópico e, além disto, a homogeneidade do material dentro do intervalo de espessuras examinadas.

Como a birrefringência total depende da fração volumétrica dos filamentos constituintes do material, a inclinação da curva obtida para incrementos nesta birrefringência em função da espessura do corte deve ser ditado pela geometria específica de suas moléculas e do estado de agregação em que se encontram, sendo estes os mesmos fatores que determinam a inclinação das curvas de birrefringência de forma (VIDAL & CARVALHO, 1989b), embora discriminem parâmetros diferentes.

Por outro lado, já que os incrementos específicos da birrefringência intrínseca que acompanham aumentos na espessura do corte relaciona<sup>m</sup>-se à densidade de elétrons polarizáveis, estatisticamente orientados no material anisotrópico, Estes incrementos poderiam talvez ser utilizados na determinação da densidade superficial de elétrons polarizáveis, tendo-se em mãos alguns fatores dimensionáveis que resultam na birrefringência.

Embora tais fatores venham sendo estimados para proteínas (CASSIM *et alii.*, 1968; LANDOWNE, 1985) eles são totalmente desconhecidos para polissacarídeos. Para estes, nem mesmo a localização das transições eletrônicas polarizáveis responsáveis pela birrefringência é conhecida.

Assumindo-se como positiva a birrefringência intrínseca da quitina, o posicionamento dos grupos acetilamino estando a  $52^\circ$  de inclinação com relação ao longo eixo da cadeia (PERVAIZ & ABDUL-HALEEM, 1975) e a existência de uma protuberância lateral na cadeia polimérica devida à ligação C=O (REVOL *et alii.*, 1988), pode-se admitir a existência de transições eletrônicas paralelas ao longo eixo da cadeia, como também ocorre na celulose, a qual também apresenta birrefringência intrínseca positiva (FREY-WISSLING, 1948). Adicionalmente, estas transições na quitina devem sobrepor a maior contribuição dos grupos acetilamino para uma birrefringência intrínseca.

A natureza exata destas transições eletrônicas responsáveis pela birrefringência intrínseca da quitina e da celulose permanece por ser determinada.

#### Perspectivas de trabalho

Quitina e proteínas associam-se na formação do complexo quitinoso encontrado nas penas de lulas. A ordem molecular apresentada pelo polissacarídeo é acompanhada pela ordenação molecular do componente protéico, como sugerido pelas

anisotropias (birrefringência e dicroísmo linear) exibidos pelo material tratado por corantes específicos para proteínas e pelas curvas de birrefringência de forma.

Entretanto, a arquitetura do complexo quitinoso encontrado nas penas, com a proposição de modelos específicos, permanece por ser estabelecida. Isto só seria possível após a determinação das dimensões dos componentes fibrilares e da conformação molecular das proteínas associadas à quitina, principalmente através do emprego de técnicas de difração eletrônica ou de raios X.

Finalmente, uma questão evolutiva concernente ao sistema aqui estudado refere-se ao mecanismo que conduziu à não calcificação das penas de lulas. Como primeira hipótese, este fato teria ocorrido dada a perda de proteínas ácidas, tidas como responsáveis pelo processo de calcificação nas conchas atuais. Por outro lado, a não calcificação poderia ser devida à internalização da concha.

Desta forma, a caracterização dos diferentes componentes protéicos, especialmente dada a presença daqueles com baixo peso molecular ( $\approx 17.000$  Da), poderia dizer da presença de polipeptídeos hábeis em induzir o processo de calcificação, principalmente realizando-se estudos comparativos com outros sistemas relacionados e que estejam sujeitos à mineralização. Caso tais componentes sejam encontrados, o papel da internalização na não calcificação das penas de lulas poderia ser delimitado.



**Conclusões 5**

## CONCLUSÕES

- 1 - Nas penas de *Loligo brasiliensis* o material quitinoso se apresenta sob a forma de camadas, unidas entre si por uma material cimentante de natureza protéica. Estas camadas são formadas por feixes que assumem direção predominantemente paralela entre si e nas diferentes camadas.
- 2 - Como demonstrado pela reatividade aos testes topoquímicos, existe na pena uma disponibilidade química e espacial de radicais reativos, diferindo de alguns outros sistemas quitinosos.
- 3 - A coloração pelo azul de alcian, exibida pelos cortes histológicos de pena deve dar-se por ação quelante da quitina.
- 4 - Existem ao menos 10 componentes glicoprotéicos ligados de forma não covalente à quitina, como demonstrado pela eletroforese em poliacrilamida.

- 5 - A reatividade aos corantes xylydine ponceau, sirius red e picrosírius e a presença de dicroísmo linear na pena demonstram a existência de ordenação macromolecular para grupos amino ionizáveis, principalmente de proteínas, o que dita de certa forma uma ordenação delas próprias.
- 6 - O material exibiu birrefringência de forma, antes e após hidrólise alcalina, como demonstrado pelas variações de retardo óptico, seguindo variações do índice de refração do meio de embebição e birrefringência intrínseca em  $n = 1.435$  (glicerina 80%).
- 7 - Com base nos maiores valores de retardo óptico devidos à birrefringência intrínseca obtidos no material hidrolisado, admite-se uma predominância de transições eletrônicas polarizáveis paralelas ao longo eixo dos feixes quitinosos.
- 8 - Existe correlação linear entre os valores de retardo óptico e a espessura dos cortes para as birrefringências total e intrínseca apresentadas por penas hidrolisadas.

9 - Maiores graus de cristalinidade e de agregação, atribuídos a uma maior proximidade, maior interação e formação de pontes de hidrogênio entre as fibrilas de quitina, foram constatadas após hidrólise alcalina, sendo que parte do componente protéico atuaria como uma matriz, mantendo afastadas as fibrilas de quitina, tornando a pena mais plástica e menos susceptível à hidratação e à degradação enzimática.

**Resumo 6**

## RESUMO

O sistema quitinoso da concha resquicial de *Loligo brasiliensis* foi estudado através de eletroforese em poliacrilamida, de testes topoquímicos e da microscopia de polarização.

O material mostra-se intensamente reativo aos xylydine ponceau, sirius red e picrosírius, bem como apresenta incrementos na birrefringência e intenso dicroísmo linear quando examinados sob luz polarizada, o que demonstra a existência de ordenação molecular do componente protéico associado à quitina. O material responde positivamente aos Congo red e PAS e reage fracamente com o azul de alcian e o azul de toluidina.

A eletroforese em poliacrilamida demonstrou a existência de pelo menos 10 componentes glicoprotéicos associados de forma não covalente à quitina. Alguns destes componentes formam complexos estabilizados por pontes dissulfeto.

Curvas de birrefringência de forma construídas para cortes histológicos demonstraram a existência de maiores cristalinidade e agregação lateral das fibrilas de quitina após hidrólise alcalina, o que faz supor que as proteínas atuem mantendo certo afastamento entre os componentes fibrilares, atribuindo plasticidade ao sistema, além de reduzir sua susceptibilidade à hidratação e à degradação enzimática.

**Summary 7**

## SUMMARY

The chitin system of *Loligo brasiliensis* pen was studied through electrophoresis, topochemical tests and polarization microscopy.

Pen sections present intense reactivity to xylydine ponceau, sirius red and picrosirius stains, as well as exhibit increases in birefringence and conspicuous extrinsic linear dichroism under polarized light, what suggests on the existence of molecular ordering in the association of the protein moiety to chitin. Positive responses to Congo red and PAS beside weak reaction to alcian blue and toluidine blue were also demonstrated.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis highlighted the presence of at least 10 glycoproteins associated non-covalently to chitin, some of them making up disulfide-bonded complexes.

Form birefringence curves constructed with retardation measurements showed that hydrolised pen has higher crystallinity and lateral aggregation of chitin fibrils. This fact support the assumption that proteins act mantaining apart the fibrillar components and ascribe plasticity and resistance to hydration and enzymatic degradation to this system.



**Referências**

**Bibliográficas 8**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, S.O. Biochemistry of insect cuticle. *A. Rev. Entomol.*, 24: 29-61, 1979.
- ANDERSEN, S.O. Comparison between cuticular proteins from two locust species, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem.*, 18: 751-60, 1988.
- ANDERSEN, S.O. Enzymatic activities in locust cuticle involved in sclerotization. *Insect Biochem.*, 19: 59-67, 1989
- ANDERSEN, S.O. and WEISS-FOGH, T. Resilin. A rubberlike protein in arthropod cuticle. *Adv. Insect Physiol.*, 2: 1-65, 1964.
- ASCENZI, A. and BONUCCI, E. A quantitative investigation on the birefringence of the osteon. *Acta anat.*, 44: 236-62, 1961.
- BANERJEE, S. Organisation of wing cuticle in *Locusta migratoria* Linnaeus, *Tropidacris cristata* and *Romalea microptera* Beuvais (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 17: 313-26, 1988.

- BERTHET-COLOMINAS, C. MILLER, A. and WHITE, S.W. Structural study of the calcifying collagen in turkey leg tendons. *J.mol.Biol.*, **134**: 431-45, 1979.
- BLACKWELL, J. and WEIH, M.A. The structure of chitin protein complexes. In: ZIKAKIS, J.P., ed.. *Chitin, chitosan and, related enzymes*. New York, Academic, 1984. p. 252-72.
- BLACKWELL, J.; PARKER, K.D. and RUDALL, K.M. Chitin fibres of diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. *J. mol. Biol.*, **137**: 49-60, 1967.
- BONFANTE-FASOLO, P.; VIAN, B. and TESTA, B. Ultrastructural localization of chitin in the cell wall of a fungal spore. *Biol.Cell*, **57**: 265-70, 1986.
- BRUNET, P.C.J. Sclerotins. *Endeavour*, **26**: 68-74, 1967.
- CABIB, E.; BOWERS, B. and ROBERTS, R.L. Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proc.natl.Acad.Sci.USA*, **80**: 3318-21, 1983.
- CASSIM, J.Y. and TAYLOR, E.W. Intrinsic birefringence of poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate, a helical peptide, and the theory of birefringence. *Biophys.J.*, **5**: 531-52, 1965.

CASSIM, J.Y.; TOBIAS, P.S. and TAYLOR, E.W. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. *Biochim. Biophys. Acta*, 168: 463-71, 1968..

CASTLE, E.S. The double refraction of chitin. *J. gen. Physiol.*, 19: 797-805, 1936.

CLARKE, L.; TEMPLE, G.H.R. and VINCENT, J.F.V. The effects of a chitin inhibitor - dimilin - on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 23: 241-6, 1977.

CONN, H.J. Stains and staining. *McClung's handbook of microscopical technique*. New York, Hafner, 1967. p. 72-111.

COX, D.L. and WILLIS, J.H. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.*, 17: 457-68, 1987a.

COX, D.L. and WILLIS, J.H. Post-translational modifications of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. *Insect Biochem.*, 17: 469-84, 1987b.

DAVIS, L.L. and BARTINICKI-GARCIA, S. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry*, 23: 1065-73, 1984.

DONOVAN D.T. Cephalopod phylogeny and classification. *Biol.Rev.*, 39: 259-87, 1964.

FRAENKEL, G. and RUDALL, K.M. The structure of insect cuticles. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.*, 134: 111-43, 1947.

FREEDMAN, R. Proline and folding proteins. *Nature*, 279: 756-7, 1979.

FREY-WISSLING, A. *Submicroscopy morphology of protoplasma and its derivatives*. Elsevier, Amsterdam, 1948. 215 p.

FRISTOM,, J.W.; HILL, R.J. and WATT, F. The procuticle of *Drosophila*: Heterogeneity of urea-soluble proteins. *Biochemistry*, 17: 3917-24, 1978.

FURTADO, J.S. Citologia e ultra-estrutura dos fungos. In: LACAZ, C.S.; MINAMI, P.S. & PURCHIO, A., eds. *O grande mundo dos fungos*. São Paulo, Polígono, 1970, Cap. 3, p. 45-61.

GARDINER, B.G. and KHAN, M.F. A new form of insect cuticle. *Zool.J. Linn.Soc.*, 66: 91-4, 1979.

GIRAUD-GUILLE, M.-M.. Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue & Cell*, 16: 75-92, 1984.

HERTH, W. Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poteriochromonas*: Evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *J. Cell Biol.*, 87: 442-50, 1980.

HERTH, W. and SCHNEPF, E. Chitin-fibril formation in algae. In: BROWN Jr., R.M., ed. *Cellulose and other natural polymer systems. biogenesis, structure, and degradation*. New York, Plenum, 1982. Cap. 10, p. 185-205.

HILLERTON, J.E.; REYNOLDS, S.E. and VINCENT, J.F.V.. On the indentation hardness of insect cuticle. *J.exp.Biol.*, 96: 45-52, 1982.

HINES, E.R. and HACKMAN, R.H. Ultrastructure and development of the extensible abdominal intersegmental membranes of the female migratory locust. *Tissue & Cell*, 19: 71-82, 1987.

HUNT, S. and NIXON, M. A comparative study of protein composition in the chitin-protein complexes of the beak, pen, sucker disc, radula and oesophageal cuticle of cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol., B Comp. Biochem.*, 68: 535-46, 1981.

HUNT, S. & HUCKERBY, T.N. A comparative study of molluscan and crustacean chitin proteoglycans by carbon-13 NMR spectroscopy. Identification of carbohydrate and amino acid contributions and the determination of amino acid chemical shifts in anhydrous formic acid. *Comp. Biochem. Physiol., B Comp. Biochem.*, 88: 1107-16, 1987.

JENSEN, M. and WEISS-FOGH, T. Biology and physics of locust flight. V. Strength and elasticity of locust cuticle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 245: 137, 69, 1962.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G. and BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 11: 447-55, 1979.

KRAMER, K.J.; BORK, V.; SCHAEFER, J.; MORGAN, T.D. and HOPKINS, T.L. Solid state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance and chemical analysis of insect noncuticular sclerotized support structures: mantid ootheca and cocoon silks. *Insect Biochem.*, 19: 69-77, 1989.

- KRAMEROV, A.A.; MUKHA, D.V.; METAKOVSKY, E.V. and GVOZDEV, V.A.  
Glycoproteins containing sulfated chitin-like carbohydrate moiety  
are synthesized in an established *Drosophyla melanogaster* cell  
line. *Insect Biochem.*, 16: 417-32, 1986.
- LANDOWNE, D. Molecular motion underlying activation and  
inactivation of sodium channel in squid giant axons.  
*J. Membr. Biol.*, 88: 173-85, 1985.
- LEES, S. Considerations regarding the structure of the mammalian  
mineralized osteoid from viewpoint of the generalized packing  
model. *Connect. Tissue Res.*, 16: 281-303, 1987.
- LEV, R. and SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups  
with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 309, 1964.
- LILLIE, R.D. Acetylation and nitrosation of tissue amines in  
histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 352-62, 1958.
- LIPKE, H. Conjugates of glucosamine in cockroach cuticle. *Insect  
Biochem.*, 1: 189-98, 1971.
- LIPKE, H. SUGUMARAN, M. and HENZEL, W. Mechanisms of  
sclerotization in dipterans. *Adv. Insect Physiol.*, 17: 1-84, 1983.



LISON, L. Réactions fonctionelles de caractère généraal liées a la présence de radicaux chimiques définissables. In: LISON, L. *Histochemie et cytochemie animales*. Paris, Gauthier-Villars, 1960, v.1, cap.10, p.259-304.

LOTMAR, W. and PICKEN, L.E.R. A new crystallographic modification of chitin and its distribution. *Experientia*, 6: 58-9, 1950.

MARKS Jr., S.C. and POPOFF, S.N. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.*, 183: 1-44, 1988.

MARSHALL, P.N. and HOROBIN, R.W. The mechanism of action of "mordant" dyes - A study using preformed metal complexes. *Histochemie*, 35: 361-71, 1973.

McIVER, S. and SIEMICK, R. Fine structure of antennal putative thermohygroreceptors of adult *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *J. Morphol.*, 183: 15-23, 1985.

MELLO, M.L.S. and VIDAL, B.C. The salivary gland secretion of a neotropical bumblebee. *Protoplasma*, 100: 251-65, 1979.

MELLO, M.L.S. and GARÓFALO, C.A. Structural dimorphism in the cocoons of a solitary bee, *Lithurgus corumbae* (Hymenoptera, Megachilidae) and its adaptative significance. *Zool. Anz.*, 217: 195-206, 1986.

MELLO, M.L.S.; GODO, C.; VIDAL, B.C. and ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Annls. Histochem.*, 20: 145-152, 1979.

MELLO, M.L.S.; CARVALHO, H.F. and GARÓFALO, C.A. Polarization and topochemistry of the cocoons of *Lithurge huberi* (Hymenoptera; Megachilidae). *Zool. Anz.*, 219: 269-76, 1987.

MÓDIS, L. Polysaccharides: Topo-optical investigations of mucopolysaccharides (Acid glycosaminoglycans). Stuttgart, Verlag, 1974. v.2, pt. 4, 170p. *Handbuch der Histochemie*.

NEVILLE, A.C. Cuticle: organization. In: HAUN, J.B.; MATOLSTY, A.G. and RICHARDS, K.S. eds., *Biology of the Integument - Invertebrates*. Berlin, Springer, 1984. p. 611-25.

NEVILLE, A.C.; PARRY, D.A.D. and WOODHEAD-GALLOWAY, J. The chitin crystallite in arthropod cuticle. *J. Cell Sci.*, 31: 73-82, 1976.

NIELSEN, J.B. The basis for colored silver protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Molec. Chem.*, 141: 311-5, 1984.

NORDÉN, B. Applications of linear dichroism spectroscopy. *Appl. Spect. Rev.*, 14: 157-248, 1978.

OGAWA, K.; OKA, K.; MIYANISHI, T. and HIRANO, S. X-ray diffraction study on chitosan-metal complexes. In: ZIKAKIS, J.P. ed. *Chitin, chitosan, and related enzymes*. New York, Academic, 1984. p. 327-345.

OH, H.I.; HOFF, J.E.; ARMSTRONG, G.E. and HAFF, L.A. Hydrophobic interaction in tannin-protein complex. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 394-8, 1980.

PACKARD, A. Cephalopods and fish: The limits of convergence. *Biol. Rev.*, 47: 241-307, 1972.

PALLACK, J.H.; LANGE, C.F. and HASHIMOTO, T. Nonfibrillar chitin associated with walls and septa of *Trychophyton mentagrophytes* arthrospores. *J. Bacteriol.*, 154: 965-75, 1983.

PARRY, D.A.D. The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys. Chem.*, 29: 195-209, 1988.

PERVAIZ, S.M. and ABDUL-HALEEN, M. Studies on the structure of  $\beta$ -chitin. *Z. Naturforsch.*, 30C: 571-4, 1975.

PICKEN, L.E.R. and LOTMAR, W. Oriented proteins in chitinous structures. *Nature*, 165: 599-600, 1950.

PIMENTEL, E.R. Form birefringence of collagen bundles. *Acta Histochem. Cytochem.*, 14: 35-40, 1980.

REVOL, J.-F.; Gardner, K.H. and Chanzy, H.  $\beta$ -chitin: Molecular imaging at 0.35-nm resolution. *Biopolymers*, 27: 345-50, 1988.

RONCERO, C. and DURÁN, A. Effect of calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.*, 163: 1180-85, 1985.

RUDALL, K.M. The chitin/protein complexes of insect cuticles. *Adv. Insect Physiol.*, 1: 257-313, 1963.

RUDALL, K.M. Chitin and its association with other macromolecules. *J. Polymer Sci.*, C28: 83-102, 1969.

- RUDALL, K.M. and Kenchington, W. The chitin system. *Biol.Rev.*, 49: 597-636, 1973.
- RUNHAM, N.W. Investigations into the histochemistry of chitin. *J.Histochem.Cytochem.*, 9: 87-92, 1961.
- SANWYER, L.H. and GEORGE, W. Comparisons between synthetic and natural microfibrillar systems. In: BROWN JR., R.M., ed.. *Cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, structure, and degradation.* New York & London, Plenum, 1984. Cap. 21, pp. 429-454.
- SCHAEFER, J.; KRAMER, K.J.; GARROW, J.R.; JACOB, G.S.; STEJSKAL, E.O.; HOPKINS, T.L. and SPEIRS, R.D. Aromatic cross-links in insect cuticle: Detection by solid state  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR. *Science*, 235: 1200-4, 1987.
- SIKES, C.S. and WHEELER, A.P. The organic matrix from oyster shell as a regulator of calcification *in vivo*. *Biol. Bull.*, 170: 494-505, 1986.
- SUGUMARAN, M. and SEMENSI, V. Sclerotization of mosquito cuticle. *Experientia*, 43: 172-6, 1987.
- THURM, U. Mechanoreceptors in the cuticle of the honey bee. Fine structure and stimulus mechanism. *Science*, 145: 1063-5, 1964.

- TOEPFER, K. *Die Thiazinfarbstoffe*. Stuttgart, G.Fisher, 1970.
- TSEZOS, M. and VOLESKY, B. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 385-401, 1982.
- VERMEULEN, C.A. and WESSELS, J.G.H. Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence of a transient non-crystalline state of chitin. *Eur. J. Biochem.*, 158: 411-5, 1986.
- VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 55: 529-36, 1963.
- VIDAL, B.C. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. *Protoplasma*, 59: 472-9, 1964.
- VIDAL, B.C. Dichroism on collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Annls. Histochem.*, 115: 289-96, 1970.
- VIDAL, B.C. Anormal dispersion of birefringence, linear dichroism, and relationships with ORD (Extrinsic Cotton effect). *Histochemie*, 30: 102-7, 1972.
- VIDAL, B.C. The use of the fluorescent probe 8-anilino-naphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 196-201, 1978.

VIDAL, B.C. The part played by proteoglycans and structural glycoprotein in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell.mol.Biol.*, 26: 415-21, 1980a.

VIDAL, B.C. Aorta elasticae and tendon collagen reactivity to 8-anilino-naphthalene sulphate (ANS) and dansylchloride. *Cell.mol.Biol.*, 26: 583-8, 1980b.

VIDAL, B.C. Poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate birefringent fiber as a model of form and intrinsic birefringences of  $\alpha$ -helical polypeptides. *Cell.mol.Biol.*, 32: 109-12, 1986.

VIDAL, B.C. and CARVALHO, H.F. Chitin molecular order in the chitinous tendon of the grasshopper, *Spharagenon bolli*. *Cell.mol. Biol.*, 32: 537-43, 1986.

VIDAL, B.C. and CARVALHO, H.F. Hydrophobicity, lectin affinity and molecular order of keratins in rat stratum corneum and in human breast cells in culture. 1989a (no prelo).

VIDAL, B.C. and CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. 1989b (no prelo).

VIDAL, B.C. and MELLO, M.L.S. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell.mol.Biol.*, 30: 195-204, 1984.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; GODD, C.; CASEIRO F<sup>o</sup>, A.C. and ABUJADI, J.M. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. *Annls. Histochem.*, 20: 15-26, 1975.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. and PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochem. J.*, 14: 857-78, 1982.

DE VOE, H. Optical properties of molecular aggregates. II. Classical theory of the refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals. *J. chem. Phys.*, 43: 3199-208, 1965.

WEINER, S. Organization of organic matrix components in mineralized tissues. *Am. Zool.*, 24: 945-51, 1984.

WEINER, S. and TRAUB, W. X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS Proc.*, 111: 311-6, 1980.

WEINER, J.G.H and TRAUB, W. Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 304: 425-34, 1984.



WESSELS, J.G.H. Cell wall synthesis in apical hyphal growth.

*Int. Rev.Cytol.*, 104: 37-79, 1986.

WOOD, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr.Res.*, 85: 271-87, 1980.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. In: MOREL, C.M. ed. *Genes and antigens of parasites*. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1984. p. 357-363.