

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DO HEPATOPÂNCREAS
DE LAGOSTAS DO GÊNERO Panulirus (White).

Alexandre Martins Barbosa

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ

-1988 . 1-

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B195e Barbosa, Alexandre Martins.
Eletroforese de proteínas do hepatopâncreas de lagostas do gênero *Panulirus* (White) /
Alexandre Martins Barbosa. – 1988.
22 f. : il.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1988.
Orientação: Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira.

1. Lagosta - Criação. I. Título.

CDD 639.2

Prof. Adjunto GUSTAVO HITZSCHKY FERNANDES VIEIRA

- Professor Orientador -

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Titular ANTONIO ADAUTO FONTELES FILHO

- Presidente -

Prof. Auxiliar CARLOS GEMINIANO NOGUEIRA

- Auxiliar -

VISTO:

Prof. Adjunto VERA LÚCIA MOTA KLEIN

Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Adjunto JOSÉ RAIMUNDO BASTOS

Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

A Alexandre Holanda Sampaio, Silvana Saker Sampaio e Gustavo Hitzchy Fernandes Vieira, pelo apoio, ajuda e amizade.

Ao Prof. José Raimundo Bastos, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. José Fausto Filho, pelo auxílio concedido.

A Waldemar da Costa Patrão, um grande amigo, o apoio necessário para esta conquista de mais uma etapa da minha vida.

Ao Grupo Maré Vermelha, pela amizade, esperança e vontade de uma Universidade melhor.

INTRODUÇÃO

A identificação de peixes é usualmente feita pelos processos clássicos, que dão especial atenção às características morfométricas e merísticas.

Nos anos mais recentes, as técnicas bioquímicas vêm sendo utilizadas na identificação de peixes, tendo as da eletroforese uma maior difusão (TSUYUKI & ROBERTS, 1965 ; TSUYUKI et al., 1965). Estas técnicas permitem conhecer as espécies de peixes que foram processadas sob a forma de postas, filés e outros produtos da indústria pesqueira (BASTOS et al., 1975). *ou 1971 ?*

Desde 1962 os serviços oficiais dos Estados Unidos da América identificam as espécies de peixes, importadas na condição de produtos de pescado, através da eletroforese de proteínas de músculos, para comparação com padrões previamente conhecidos (LANE et al., 1966).

A eletroforese é um método analítico de separação de misturas, cujo principal agente é o campo elétrico.

Os princípios eletroforéticos baseiam-se em partículas, moléculas ou íons que têm capacidade de adquirir carga eletrostática livre, em soluções ou em suspensão, migram para o pólo de carga oposta às suas, quando submetidas à ação de um campo elétrico. Para que uma partícula se mova no campo elétrico, é necessário que possua carga, isto é, um excesso ou deficiência de elétrons resultando em carga eletrostática livre. Esta migração é regida pela Lei de Coulomb: moléculas ou íons de carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo); e moléculas, partículas ou íons de carga negativa vão para o pólo positivo (ânodo).

A velocidade com que uma partícula se movimenta no campo elétrico depende de vários fatores, mas o de maior importância é a sua propriedade em adquirir carga elétrica. Desta maneira, quanto maior for a densidade de carga elétrica livre de uma partícula maior será a sua velocidade quando submetida à ação de um campo elétrico; as mais lentas serão aquelas de menor densidade de carga elétrica livre.

As proteínas contêm grupos ácidos (COO^-) e grupos básicos (NH_3^+), portanto quando em solução ou em suspensão, podem se apresentar:

- a) Carregadas positivamente ou seja, apresentam maior número de grupos (NH_3^+). Isto ocorre em pH ácido uma vez que os grupos (COO^-) vão se neutralizando pela adição de prótons (H^+) e, conseqüentemente, haverá excesso de grupos (NH_3^+).
- b) As partículas ficam carregadas negativamente, isto é com maior número de grupos (COO^-), o que acontece com pH alcalino pela neutralização dos grupos (NH_3^+), quando se adiciona álcali (OH^-).
- c) As partículas podem permanecer neutras se o pH do tampão empregado corresponde ao ponto isoelétrico de proteínas. Desta maneira não haverá migração, pois as cargas positivas serão iguais às cargas negativas, igual número de grupos (COO^- e NH_3^+).

O ponto isoelétrico é o pH de uma solução em que as cargas positivas se equivalem às cargas negativas e, conseqüentemente, o movimento sob a ação do campo elétrico é nulo.

Força iônica é a ionicidade da solução tampão, tendo influência básica sobre a eletroforese. Soluções de baixa força iônica permitem migrações mais rápidas, oferecendo menor resistência e, em decorrência, o desprendimento de ca-

lor será menor. Com tampões de força iônica alta acontece o contrário, porém melhoram a definição das zonas.

Na prática sempre se trabalha com tampões de força iônica entre 0,025 e 0,075 para os tampões de veronal. Apesar dos tampões de alta força iônica darem zonas mais definidas, deve-se trabalhar com os de baixa força iônica por causa da rapidez e efeitos térmicos, como neste trabalho.

Foi Kohn quem utilizou pela primeira vez membranas de acetato de celulose como material suporte em eletroforese de zona. Este material apresenta inúmeras vantagens sobre o papel de filtro, tanto no que se refere a eletroforese propriamente dita, como às etapas complementares do processo (BECHTEL & ALVES, 1973).

Para o desenvolvimento desta pesquisa algumas modificações da técnica acima mencionada foram procedidas para permitir a obtenção de diagramas, que fornecessem uma visualização mais clara da análise eletroforética dos extratos protéicos.

A possibilidade de utilização destes diagramas na identificação de espécies já foi evidenciada por alguns pesquisadores, empregando eletroforese em papel filtro, acetato de celulose, eletroforese livre, tipo TISELIUS, em gel de amido ou em poliacrilamida.

Estes métodos também são aplicados para o acompanhamento das várias fases de purificação de um determinado extrato. Isto é de suma importância nos trabalhos bioquímicos porque permite avaliar se os métodos de purificação aplicados são os adequados para aquele tipo de material.

O principal órgão de reserva em crustáceos é o he-

patopâncreas, o qual estoca glicogênio, gordura e cálcio. Nele estão contidas as enzimas responsáveis pelo metabolismo da purina, segregação de ácidos biliares, substâncias que devem ser usadas para a alimentação e demanda especial de materiais e energia durante o processo de muda (PASSANO, 1960). Em consequência disto ocorre uma intensa mobilização dessas reservas para suprir as necessidades de outros tecidos (TRAVIS, 1955).

Embora os conhecimentos sobre a estocagem de proteínas e sua utilização sejam escassos, as proteínas parecem ser o mais importante componente de reserva orgânica armazenada durante o período compreendido entre duas mudas sucessivas. Dessa forma, o crescimento normal dos tecidos é possibilitado nos estágios de pós-muda, segundo SAKER ^{et al.} (1982) e SAMPAIO ^{et al.} (1982).

Estudos realizados por VONK (1960) com crustáceo Maja squinado demonstraram a presença de, pelo menos, quatro componentes proteolíticos no hepatopâncreas e suco intestinal: proteinases, carboxipeptidases, aminopeptidases e dipeptidases. A proteinase de Maja pode muito bem ser relacionado com a tripsina dos vertebrados, parecendo estar presente no suco estomacal e no hepatopâncreas como enzima ativada.

Os cefalotórax de Lagostas são jogados ao mar pelos barcos lagosteiros. O estudo das proteínas contidas no hepatopâncreas, pode levar a um aproveitamento deste material, principalmente na indústria de alimentos.

A obtenção de hidrolizados protéicos, com o objetivo de enriquecer resíduos alimentares, tem contribuído de modo satisfatório para aumentar o valor nutricional dos produtos destinados a alimentação do homem e de outros animais.

Os concentrados protéicos de pescado são largamente aplicados em alimentos, no mundo inteiro, por disporem de uma proteína animal abundante, barata e sem contra indicação.

Muitos produtos ricos em proteína de alto valor biológico já se encontram disponíveis no mercado consumidor. Tais produtos são constituídos de proteínas de origem animal e vegetal, previamente tratados por exoproteases, resultando na hidrólise das cadeias polipeptídicas com liberação de peptídeos e aminoácidos livres que são rapidamente assimilados, metabolizados, pelo organismo. Esses produtos podem ser ministrados em todas as faixas etárias para melhorar o desenvolvimento da atividade física e mental.

Dessa forma, o presente trabalho objetiva avaliar se a metodologia empregada para a purificação de extratos de hepatopâncreas em atividade proteolítica é adequada, acompanhando através de bandas protéicas dos extratos bruto, de pó acetônico e das frações obtidas por tratamento em sulfato de amônia do pó acetônico.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram utilizadas amostras de hepatopâncreas de lagostas do gênero Panulirus (White), provenientes do litoral cearense desembarcadas no porto do Mucuripe.

Preparação do extrato bruto

Foram tomados 5g de hepatopâncreas macerados em Potter com 50ml de tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0 e centrifugados a 20.000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises posteriores.

Preparação do pó acetônico

O pó acetônico foi obtido mediante o tratamento de 55,7g de hepatopâncreas em 275ml de acetona fria através de agitação constante por 30 minutos. O precipitado obtido foi novamente suspenso em acetona na proporção de 1:5 (p/v). Finalmente o precipitado foi tratado com a mistura éter-acetona, 1:1 (v/v), com agitação por 10 minutos. O pó obtido foi secado à temperatura de 25°C, e utilizado para as análises posteriores.

Purificação com sulfato de amônio

No extrato de pó acetônico de hepatopâncreas de lagosta, preparado em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0 foi adicionado, gradualmente, sulfato de amônio sólido para 20% de saturação, sendo o precipitado removido por centrifugação a 20.000xg por 30 minutos a 4°C em centrífuga internacional IEC modelo HT. O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0 e dialisados contra água destilada fria, durante um período de

tempo suficiente para que a reação entre a água e o hidróxido de bário apresentasse resultado negativo.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica, capacidade de hidrolisar a caseína, foi determinada pela reação de 0,5ml do extrato das várias fases de preparação, 5,0ml de caseína (segundo HAMMARSTEN, E. MERCK A.G. DARNSTADT) a 1% em solução tampão $\text{KCl} + \text{H}_3\text{BO}_3$ 0,5M - NaOH 0,5M (CLARK & LUBS) citado por DAWSON *et al.*, (1969). A incubação ocorreu a 50°C por 60 minutos em banho maria Unitemp (Fanen). Parou-se a reação com 1 ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40% (AINOUZ *et al.*, 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman 42, sendo a atividade proteolítica estimada na fração solúvel em TCA e quantificada pela leitura da absorbância registrada a 750nm em espectrofotômetro Baush & Lomb modelo Spectronic 20, depois da reação com o reagente fenólico de Folin Ciocolteau (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando uma curva padrão de L-tirosina (Merck, Figura 1). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição do TCA a 40%. Todos os valores de absorbância das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A atividade proteolítica foi expressa em micrograma (μg) de tirosina por grama de pó acetônico e a atividade proteolítica específica determinada por meio da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína, sendo expressa em μg de tirosina por mg de proteína.

Eletroforese

A aparelhagem é constituída de uma cuba fonte eletroforese modelo Argos 12, unidade de leitura modelo Argos 8 e um densitômetro integrador automático de eletroforese modelo Argos 7, todos da TECNOW.

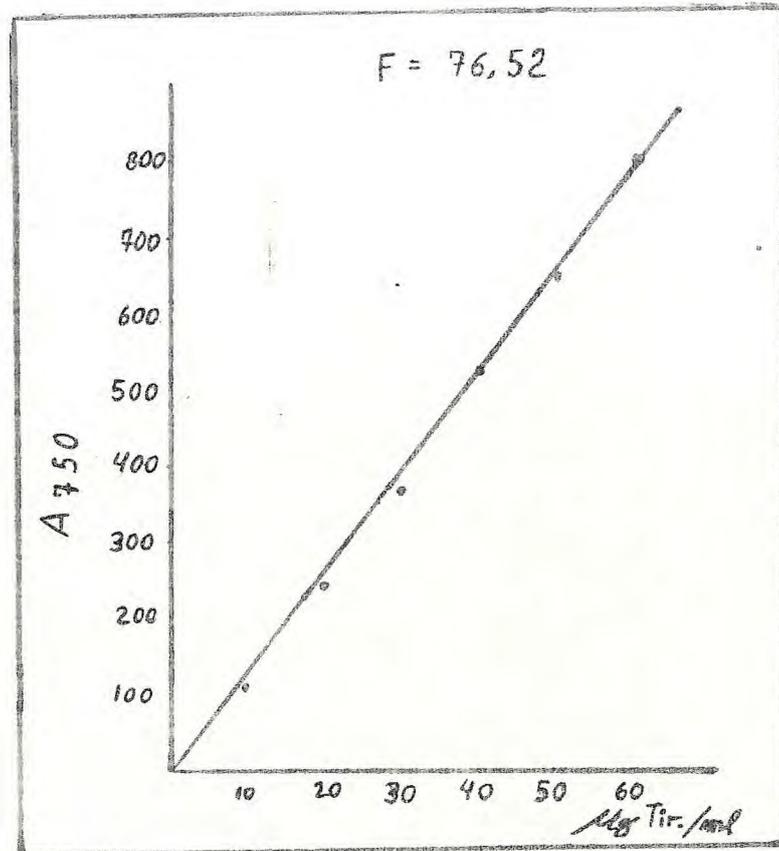


Figura (1): Curva padrão L-tirosina, (Merck).

Foi realizado um longo trabalho de pesquisa com o objetivo de determinar as melhores condições de fracionamento dos extratos e melhor visualização das bandas protéicas.

As informações contidas no manual da TECNOW foram tomadas como base para que as modificações necessárias fossem realizadas.

Em cada canaleta da cuba foram colocados 75ml de tampão barbitúrico de pH 8,6 e força iônica (u) igual a 0,1. As fitas de acetato de celulose da poligel, 25x120 mm, foram mergulhadas no tampão barbitúrico por 10 minutos. O excesso de tampão das fitas foi removido com auxílio de papel filtro.

As fitas foram esticadas, em número de 4 por vez, na ponte da cuba, de forma que as duas extremidades da fita ficassem em contato com o tampão em cada canaleta (ânodo e cátodo). A aplicação da amostra foi feita com o macro aplicador da TECNOW à 1cm do ânodo por 5 vezes. A cuba foi ligada a uma fonte de 220 volts e regulada para 300volts e o tempo de corrida estabelecido em 25 minutos.

As bandas foram fixadas com solução de ácido tricloroacético a 5% por 10 minutos. O corante utilizado foi o Ponceau S por 10 minutos.

A lavagem constou da retirada do excesso de corante das fitas com solução de ácido acético a 5% até obtermos um fundo perfeitamente claro.

Após a lavagem as fitas foram mergulhadas em metanol por 30 segundos para a desidratação.

As fitas foram então mergulhadas em ácido acético, glicerina, metanol (14ml:1ml:85ml) por 1 minuto para permi-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estabelecimento dos padrões eletroforéticos é feito basicamente através das diferenças de intensidade de coloração e mobilidade das zonas de proteínas de cada espécies (JONES & MACKIE, 1970).

Os extratos preparados com hepatopâncreas, com pó acetônico e aqueles obtidos pelo tratamento com sulfato de amônia com 0-20, 20-40 e 40-60% de saturação apresentaram zonas coradas, ao passo que as frações 60-80 e 80-100% não exibiram qualquer tipo de mancha nas fitas de acetato de celulose, usando o tampão barbitúrico pH 8,6 e u igual a 0,1.

As distâncias medidas entre o ponto de aplicação do material e o centro das bandas protéicas foram confirmadas nos diagramas, onde o primeiro pico a aparecer corresponde exatamente ao ponto onde se fez a aplicação dos extratos.

Para o extrato obtido com hepatopâncreas parece clara a ocorrência de duas zonas com média intensidade de cor, boa mobilidade e separadas de forma nítida. A primeira zona apareceu a 13mm do ponto de aplicação, ao passo que a segunda ocorreu a 19mm (Figura 2-A) como pode ser visto no diagrama (Figura 3-A), onde os dois picos surgiram nas mesmas distâncias citadas acima. Devido a ajustes realizados no densitômetro, o diagrama A da figura 3 perdeu 3mm em altura, embora a área medida sob a curva seja de 278mm^2 . Os demais diagramas não sofreram qualquer tipo de alteração e as áreas foram iguais a 325, 78, 280 e 255mm^2 para os diagramas B, C, D e E, respectivamente. As medidas das áreas possibilitam uma avaliação da concentração de proteína, embora haja necessidade de se dispor de algum outro dado de dosagem de

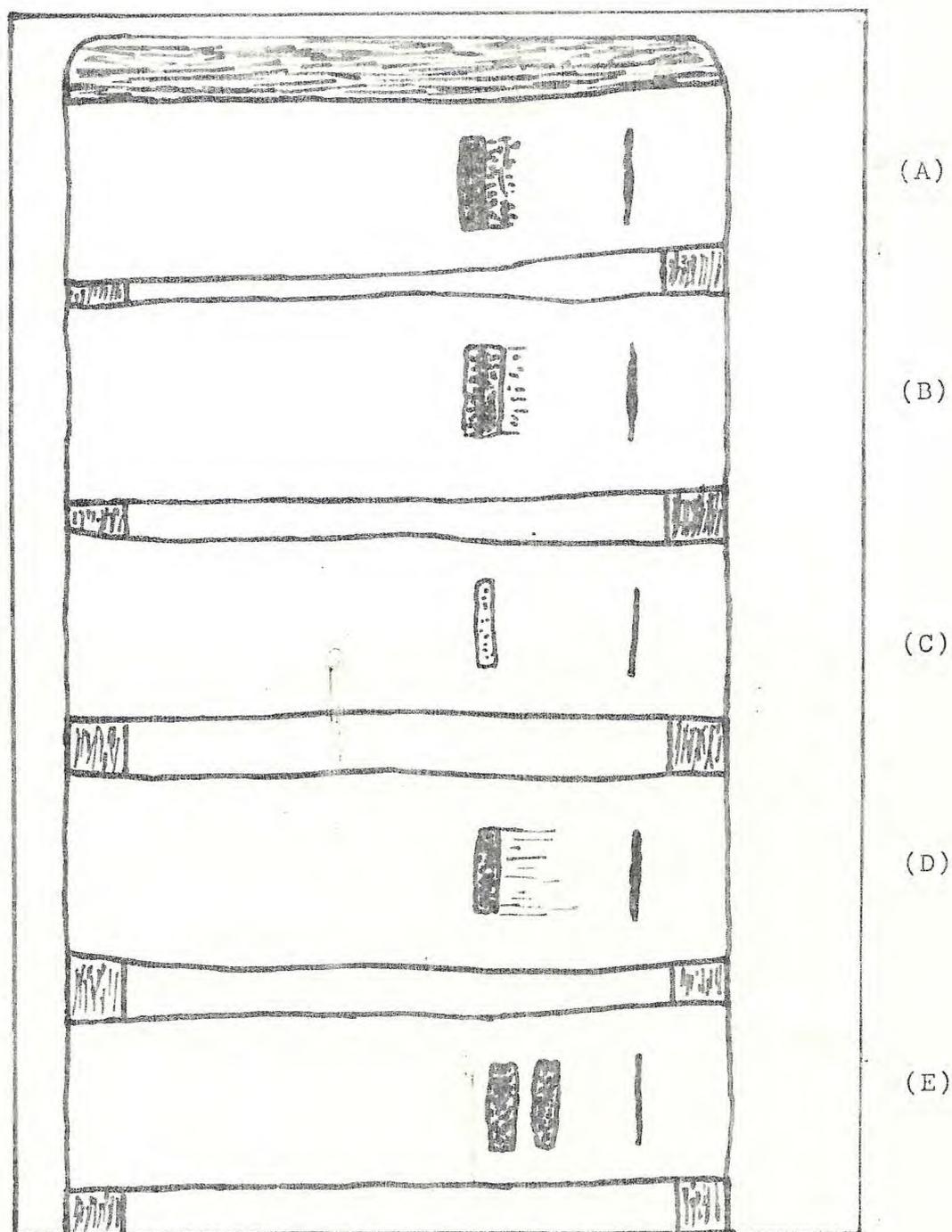


Figura (2): Fitas de acetato de celulose com aplicações de (A)-extrato bruto, (B)-extrato do pó acetônico, (C)-fração de 0-20%, (D)-fração de 20-40% e (E)-fração de 40-60%.

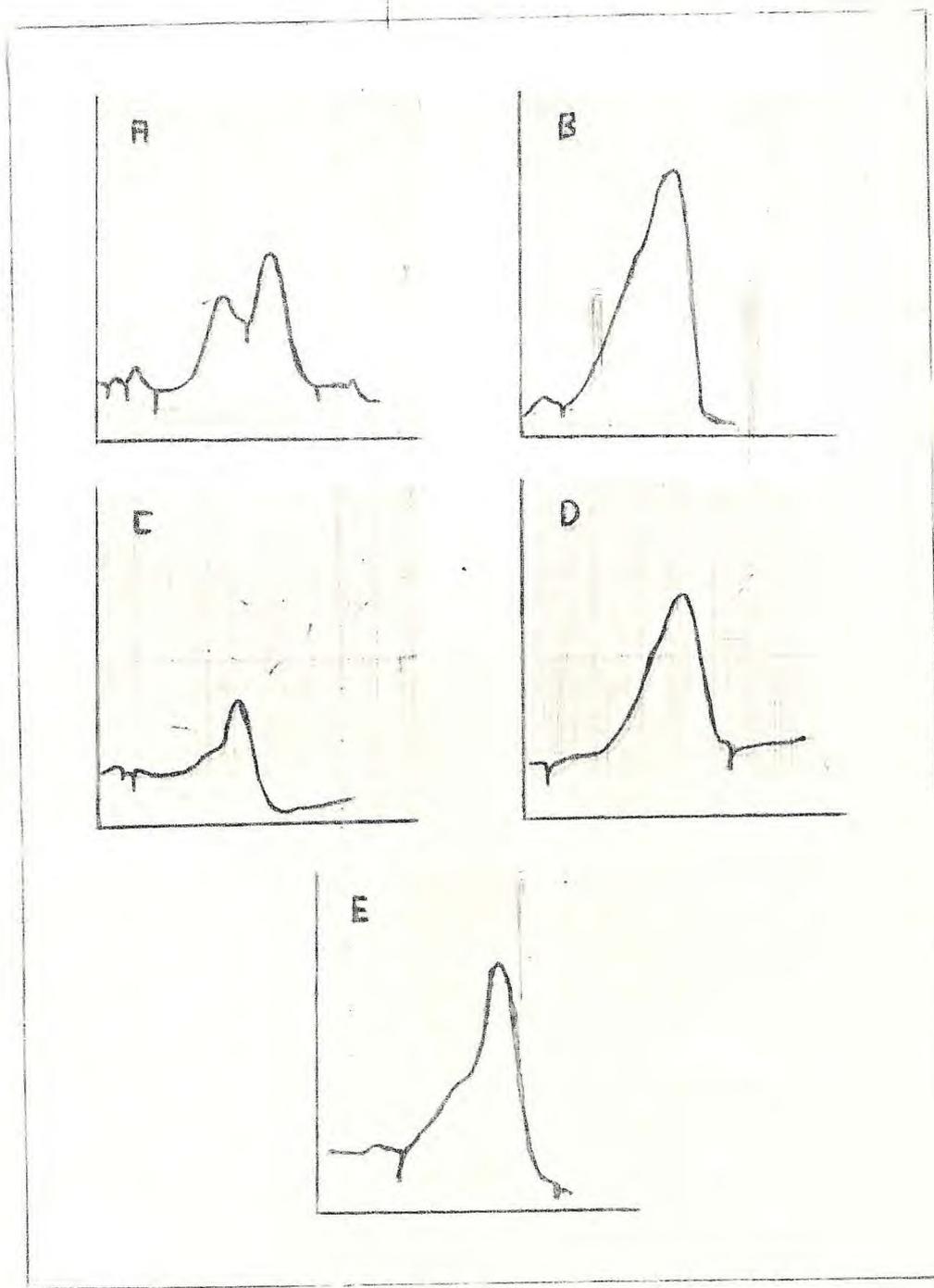


Figura (3): Diagramas de (A)-extrato bruto, (B)-extrato do pó acetônico, (C)-fração de 0-20%, (D)-fração de 20-40%, (E)-fração de 40-60%.

proteína, uma vez que diagramas com pequenas diferenças em suas configurações, devido a velocidade do registrador, possam revelar quantidades comparáveis de proteína, mesmo quando elas se apresentam concentradas em uma determinada faixa ou, ainda quando se estendem por uma banda um pouco mais ampla.

Na fita onde foi aplicado extrato preparado a partir do pó acetônico, somente uma zona fortemente corada pôde ser visualizada, exibindo grande mobilidade. A banda apareceu a 19mm do ponto de aplicação (Figura 2-B), como também pode ser observado pelo pico registrado no diagrama 3-B, onde uma pequena inflexão na curva ocorreu a 13mm. É possível que tal fato seja resultado do deslocamento da primeira banda do extrato bruto para a posição da segunda zona, ainda que um pouco espalhada, causado pelo tratamento com éter-cetona que provavelmente carregou a proteína negativamente. Esta tendência ainda continuou até a fração 40-60% de saturação com sulfato de amônia, onde a inflexão é bem maior do que nas demais, quase retornando a posição registrada inicialmente no extrato bruto situados a 13mm do ponto de aplicação. Isto talvez possa ser explicado com base na hipótese de que a característica isoelétrica inicial da proteína ou grupo protéico foi restabelecido em parte pelo tratamento com o sal.

A fita correspondente a fração 0-20% exibiu uma banda fraca em coloração mas com boa mobilidade (Figura 2-C), mostrando também no diagrama com um pico fraco aos 18mm do ponto de aplicação (Figura 3-C). Esta distância e mobilidade foram mantidas nas frações de 20-40 e 40-60%, apresentando diferenças com relação a intensidade de cor, que foi

maior para a fração de 40-60%, chegando próximo a altura do diagrama correspondente ao extrato do pó acetônico.

Para as frações de 60-80 e 80-100% não foram observadas marcas nas fitas, nem mesmo a referente ao ponto de aplicação.

O perfil das zonas eletroforéticas foi comparado com a atividade enzimática dos extratos bruto e de pó acetônico e aqueles obtidos a partir do tratamento de purificação protiolítica específica (Tabela I) dos extratos com a intensidade de cor e mobilidade das proteínas (Figura 2) pode-se observar que as frações 20-40 e 40-60% foram consideradas melhores sob este ponto de vista. Com relação aos dados de teor de proteína, a fração 40-60% foi aquela que exibiu maior intensidade de cor observada na fita da figura 2-E.

A análise eletroforética de proteínas embora não tenha sido considerada excelente sob a ótica do poder de resolução (SCOPES, 1984), consiste de um método simples e rápido para avaliar o sucesso da purificação pelo fracionamento com sulfato de amônia, entre outras aplicações.

BECHTEL & ALVES (1973) e BASTOS *et al.* (1975) estudaram proteínas em músculo de pescado através de eletroforese em acetato de celulose e encontraram que este método é de grande valia quando se deseja fazer identificação de espécies. Não foi observada qualquer alteração nos modelos eletroforéticos quando indivíduos de sexo e estágio gonadal diferentes foram analisados.

As proteínas presentes na hemolinfa das lagostas Panulirus laevicauda (Latreille) e Panulirus argus (Latreille), foram analisadas eletroforéticamente por MOTA & VIEIRA (1977), onde a separação protéica não evidenciou diferenças

TABELA (I): Dados relativos a proteína e atividade proteolítica medidos em hepatopâncreas de lagosta do Gênero Panulirus argus (Latreille).

Extratos	Proteína (mg Prot./g)	Atividade proteolítica total (μ g Tir./g)	Atividade proteolítica específica (μ g Tir./mg Prot)
hepatop.	149,60	7.352	49,1
pó acet.	330,00	100.654	305,0
0-20%	0	0	-
20-40%	15,40	18.964	1231,4
40-60%	42,35	42.304	998,9
60-80%	14,85	9.774	658,2
80-100%	2,20	875	397,7

CONCLUSÕES

1. No extrato bruto pareceu clara a ocorrência de 2 zonas com média intensidade de cor. Nos demais extratos, uma única banda foi observada, embora os diagramas densitométricos revelem um ponto de inflexão a 13mm do local de aplicação da amostra.

2. Todos os extratos preparados a partir de hepatopâncreas de lagosta Panulirus (White) exibiram mobilidade protéica considerada boa quando acetato de celulose foi usado como suporte.

3. O diagrama correspondente ao extrato de pó acetônico apresentou a maior área sob a curva e a maior concentração de proteína. Os extratos das frações de 20-40 e 40-60% tiveram áreas de 280 e 255 mm² e teores de proteínas iguais a 15,40 e 42,35 mg/g, respectivamente.

4. A análise eletroforética em acetato de celulose parece um bom método de separação das bandas protéicas dos extratos bruto, de pó acetônico e daqueles obtidos pelo tratamento de purificação com sulfato de amônio, preparados a partir de hepatopâncreas de lagostas do gênero Panulirus (White).

SUMÁRIO

O presente estudo visa avaliar se a metodologia empregada para a purificação de extratos de hepatopâncreas de lagostas do gênero Panulirus (White) com atividade proteolítica é adequada, acompanhando através de zonas protéicas em fita de acetato de celulose e seus respectivos diagramas densitométricos dos extratos bruto, de pó acetônico e das frações obtidas por tratamento em sulfato de amônio do pó acetônico.

As lagostas foram adquiridas no porto do Mucuripe, capturadas na costa do Estado do Ceará.

A matéria-prima foi repetidas vezes tratada com acetona e, finalmente secada, usando-se a mistura acetona - éter (1:1).

O extrato do pó acetônico assim preparado, foi homogeneizado em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0 na proporção de 1:5 (p/v) e centrifugado por 30 minutos a 20.000xg a 4°C. O sobrenadante foi usado para precipitar a 20, 40, 60, 80 e 100% com sulfato de amônio, dialisados contra água destilada fria.

A atividade proteolítica foi determinada pela reação de 0,5ml do extrato das várias fases de preparação com 5,0ml de caseína (segundo HAMMARSTEN, E. MERCK A.G. DARMS-TADT) a 1% em solução tampão KCl + H₃BO₃ 0,5M - NaOH 0,5M. A incubação ocorreu a 50°C por 60 minutos, finda a qual a reação foi parada com 1,0ml de ácido tricloroacético a 40%. A leitura da absorbância a 750nm em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20 foi feita após a reação com o Folin.

A eletroforese de cada extrato foi realizada em

aparelhos da TECNOW constituído de uma cuba fonte eletroforese modelo Argos 12, unidade de leitura modelo Argos 8 e um densitômetro integrador automático de eletroforese modelo Argos 7.

Com estudos feitos para adaptar a técnica aos extratos de hepatopâncreas, usou-se tampão barbitúrico de pH 8,6 e força iônica $\mu=0,1$, 75ml em cada lado da cuba.

Foram feitas corridas em número de 4 fitas de acetato de celulose da marca Poligel, por vez, aplicando a amostra a 1cm do cátodo e regulando a cuba para 300V e estipulando o tempo em 25 minutos.

Depois das fitas fixadas, coradas com corante Ponceau S, lavadas, desidratadas, transparentizadas e secadas a 60°C por 4 minutos, foi feita a leitura na unidade de leitura e feito os diagramas no densitômetro, respectivamente aos extratos bruto, do pó acetônico e das frações oriundas destes.

No extrato bruto ocorreu duas bandas protéicas, uma a 13mm de distância do ponto de aplicação e outra a 19 mm. Nas demais fitas verificou-se uma única zona à 19mm sendo que encontrou-se uma tendência a permanecer aos 13mm a primeira banda visualizada na fita e diagrama do extrato bruto.

O perfil das zonas eletroforéticas foi comparado com a atividade enzimática de cada extrato, onde pode-se observar que as frações 20-40 e 40-60% foram consideradas melhores sob este ponto de vista, e ainda, com relação ao teor de proteína a fração 40-60% foi aquela que exibiu maior concentração, correspondente a banda de maior intensidade de cor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ BASTOS, J. R.; VIEIRA, G. H. F. & BESERRA, F. J. - 1971 - Eletroforese de Proteínas do Músculo de Peixes do Gênero Lutjanus (Bloch), Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 15(1) : 49-51, 1 fig.
- BECHTEL, M. A. B. & ALVES, J. L. B. - 1973 - Identificação de Espécies de Pescado por Eletroforese em Acetato de Celulose. In Grupo Executivo do Desenvolvimento da Indústria da Pesca - GEDIP, Ser. Tecnol., Porto Alegre, (3) : ã paginado, 16 figs.
- DAWSON, R. M. C.; ELLIUTT, W. H. & JONES, K. M. - 1969 - Data for biochemical research - 2ª ed. Oxford University Press.
- JONES, B. W. & MACKIE, J. M. - 1970 - An application of eletrophoretic analysis of muscle miogens to taxonomic studies in the genus Merlucrius. Comp. Biochem. Physiol; London, 32 : 267-273, 1 fig.
- ✓ LANE, J. P.; HILL, W. S. & LEARSON, R. J. - 1966 - Identification of species en raw processed fishery products by means so cellulose poliaceteb strys eletrophoresis. Conn. Fish. Rev., Washington, 28(3) : 10-13, 4 figs.
- LOWRY, D. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. - 1951 - Protein messurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Manual da TECNOW (Instrumentos Cientificos LTDA). Sistema pa Eletroforese.

AINOUZ et al., 1972 (pág. 7)

- ✓ MOTA, M. H. G. & VIEIRA, G. H. F. - 1977 - Eletroforese de Proteínas da Hemolinfa das Lagostas Panulirus argus Panulirus laevicauda (Latreille), no Estado do Ceará, Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 17(1) : 45-47, 2 figs.
- ✓ PASSANO, L. M. - 1960 - Motting and its control, pp.473-536, in T. H. Waterman (ed), The physiology of crustacea, vol.I Academic Press, XVII + 670 pp., New York.
- ✓ SAKER, S. A.; VIEIRA, G. H. F. & SAMPAIO, A. H. - 1982 - Ensaio Preliminar ao Estudo de Caracterização e Propriedades de Enzimas Proteolíticas em Hepatopâncreas de Jovens da Lagosta Panulirus laevicauda (Latreille), Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 22(1/2) : 57-66, 8 figs.
- ✓ SAMPAIO, A. H.; VIEIRA, G. H. F. & SAKER, S. A. - 1984 - Estudo Preliminar Sobre o Sistema RNA - RNase em Hepatopâncreas de Jovens da Lagosta Panulirus laevicauda (Latreille), Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 23 : 43-49, 6 figs.
- SCOPES, R. K. - 1984 - Protein Purification Principles and Practice. Springer - Verlag. XIII + 282pp. 145 figs.
- TRAVIS, D. F. - 1955 - The molting cycle of sping lobster, Panulirus argus (Latreille) II Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopâncreas and integumental tissues Biol. Bull, London, 108 - 88-112.
- ✓ TSUYUKI, H. & ROBERTS, E. - 1965 - Zene eletrophoretic comparison of muscle myogens and blood proteins of artificial hybrids of Salmonidae With Their pariental species. J. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, 22(3) : 767-773,

5 figs.

✓ TSUYUKI, H.; ROBERTS, E. & VANSTONE, W. E. - 1965 -
Comparative zone eletropherograms of muscle myogens and
blood hemoglobins of marine and freshwater and their
• application to biochemical systematics. J. Fish. Res. Bd.
Can., Ottawa, 22(1) : 203-213, 8 figs.

✓ VONK, H. J. - 1960 - Digestion and metabolism, pp. 291-316 ,
in T. H. Watterman (ed), The physiology of crustacea, vol.
I, Academic Press, XVII + 670 pp., New York.