



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

**ESTABELECIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTÉICA
DA ALGA MARINHA VERMELHA *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN J. V.
LAMOUREUX) PARA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS PROTEÔMICOS
ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)**

SARA MONALIZA SOUSA NOGUEIRA

Monografia submetida ao Departamento de Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte integrante das exigências para a obtenção do título de Engenheira de Pesca.

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
NOVEMBRO/2009**

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)

N715e Nogueira, Sara Monaliza Sousa.
Estabelecimento de uma metodologia de extração protéica da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen J. V. Lamouroux) para utilização em estudos proteômicos através de eletroforese bidimensional (2-DE) / Sara Monaliza Sousa Nogueira. – 2009.
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2009.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Algas marinhas . I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Orientador/Presidente

Prof^a. Kyria Santiago do Nascimento, D.Sc.
Membro

Prof. Celso Shiniti Nagano, Ph.D
Membro

VISTO

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc.
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Aos meus pais e amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha feliz e saudável existência.

À minha família pelo carinho concedido.

Ao meu namorado por tanto amor e companheirismo.

Aos meus grandes amigos.

À turma de graduação.

Ao Prof. Alexandre Holanda Sampaio pela amizade e orientação.

Ao Prof. Benildo S. Cavada por ceder espaço para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora e amiga, Kyria Santiago do Nascimento.

À minha grande parceira de laboratório, Antônia Sâmia F. do Nascimento.

Aos demais colegas do laboratório pela amizade recebida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores da Engenharia de Pesca por seus trabalhos prestados com carinho e atenção.

Aos membros da Banca Examinadora pelas reflexões, críticas e sugestões.

A todos que torceram pelo meu sucesso.

"O desejo sincero e profundo do
coração é sempre realizado."
Gandhi

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	v
RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – ALGAS MARINHAS	1
1.1.1 – ALGAS MARINHAS VERMELHAS	2
1.1.1.1 – ALGA MARINHA VERMELHA <i>HYPNEA MUSCIFORMIS</i>	5
1.2 – COMPOSTOS BIOLÓGICOS DE ALGAS MARINHAS	7
1.2.1 – COMPOSTOS DA <i>HYPNEA MUSCIFORMIS</i>	8
1.3 – PROTEOMA	9
1.3.1 – FERRAMENTAS PROTEÔMICAS	11
1.3.1.1 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)	12
1.3.2 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	15
2 – MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 – COLETA	18
2.2 – EXTRAÇÃO PROTEÍCA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	18
2.2.1 – 1ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL	18
2.2.2 – 2ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL	18
2.2.3 – 3ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL	19
2.3 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD	20
2.4 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-D PAGE)	21
2.4.1 – RE-HIDRATAÇÃO DAS TIRAS DE GEL (<i>DRYSTRIP'S</i>)	21
2.4.2 – 1ª DIMENSÃO: FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF)	22
2.4.3 – EQUILÍBRIO DAS <i>DRYSTRIP'S</i>	23
2.4.4 – 2ª DIMENSÃO: ELETROFORESE 2-D EM SDS-PAGE	24
2.4.5 – REVELAÇÃO DOS GÉIS COM AZUL DE COOMASSIE	25
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4 – CONCLUSÃO	34
5 – REFERÊNCIAS	35

RESUMO

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos, sustentando mais de dois terços da biomassa mundial; são responsáveis por quase metade da atividade fotossintética global; e são responsáveis pela renovação da maior parte do oxigênio para o ar atmosférico. As macroalgas marinhas constituem uma fonte de substâncias naturais, muitas delas de imenso interesse biotecnológico, como ácidos graxos, carotenóides, ficocolóides, lipídeos, minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, toxinas, lectinas, etc. As rodofíceas, popularmente conhecidas como algas vermelhas, possuem como pigmento predominante a ficoeritrina; e delas também, são extraídos o ágar e a carragenana, produtos utilizados principalmente nas indústrias alimentícias, humana/animal e farmacológicas. Proteínas são longos polímeros de aminoácidos e são divididas segundo sua função biológica, das quais desempenham papéis essenciais em praticamente todos os processos biológicos. Ferramentas biotecnológicas para estudos proteômicos como a eletroforese bidimensional (2-DE), são amplamente utilizadas para o mapeamento e a caracterização destas, estudos de função, interações proteína-proteína, entre outros, a fim de analisarem o comportamento/papel destas e aprimorarem e ampliarem seus usos nessas e em outras indústrias. Por isso, a presente pesquisa relata a importância de se avaliar proteínas presentes na alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 <i>Hypnea musciformis</i> .	6
Figura 02 Fluxograma das metodologias utilizadas.	20
Figura 03 Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> com tampão fosfato de sódio 150 mM com cloreto de sódio 10 mM, pH 7,4. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.	26
Figura 04 Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> com Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β-mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM e precipitação de proteínas com TCA. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.	28
Figura 05 Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> com Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β-mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM seguida de precipitação de proteínas com fenol saturado com Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.	29
Figura 06 Gel de eletroforese bidimensional (pH imobilizado variando de 3 a 10, com 11 cm) editado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7 apresentando a identificação de spots de proteínas presentes na macroalga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> .	30
Figura 07 Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> com Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β-mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM seguida de precipitação de proteínas com fenol saturado com Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 4-7 possuindo 11 cm.	31
Figura 08 Gel de eletroforese bidimensional (pH imobilizado variando de 4 a 7, com 11 cm) editado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7 apresentando a identificação de spots de proteínas presentes na macroalga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> .	32

ESTABELECIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTÉICA DA ALGA MARINHA VERMELHA *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN J. V. LAMOUREUX) PARA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS PROTEÔMICOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

SARA MONALIZA SOUSA NOGUEIRA

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – ALGAS MARINHAS

As algas são indivíduos que variam de uni a pluricelulares, autótrofos e heterótrofos, eucariontes e procariontes (RAVEN *et al.*, 2001).

As macroalgas são organismos eucarióticos e compreendem um grupo de plantas inferiores, desprovidas de raízes e folhas, por isso chamadas de talófitas, que não apresentam sistema vascular e com ausência de uma cobertura de células estéreis ao redor das células reprodutivas (LEE, 1999).

As algas pluricelulares, eucariontes e autótrofas são também conhecidas como macrófitas. De acordo com a predominância de pigmentos fotossintéticos, as macrófitas podem ser classificadas como Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas) (RAVEN *et al.*, 2001; LEE, 1999).

As algas estão mais abundantemente distribuídas em regiões quentes, próximas ao equador, onde apresentam tamanho reduzido e maior variabilidade de espécies, mas estendem-se até águas frias atingindo maiores proporções, porém com menor variabilidade de espécies. Nas regiões polares e temperadas, as divisões Phaeophyta e Chlorophyta são geralmente mais abundantes (LEE, 1999; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

A clorofila e os pigmentos acessórios são importantes elementos que tornam as algas organismos fotossintéticos. Na natureza, as algas estão

amplamente distribuídas em ambientes aquáticos dulcícolas ou marinhos e em ambientes terrestres. (RAVEN *et al.*, 2001; LEE, 1999).

Além disso, elas são capazes de habitar praticamente qualquer ambiente provido de luz e umidade suficiente que possibilitem a extração dos nutrientes essenciais a sua sobrevivência (VIDOTTI; ROLLEMBERG; 2004). Para se desenvolverem, as algas necessitam de um substrato para se fixarem, podendo ser substratos calcários como rochas e conchas de moluscos e até mesmo outras algas (RAVEN *et al.*, 2001; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

As algas ocupam também zonas extremas como, por exemplo, regiões de altas e baixas temperaturas (como é o caso das algas termófilas e psicrófilas, respectivamente) e regiões de elevado e baixíssimo pH (representadas pelas algas alcalífilas e acidófilas, respectivamente) (LEE, 1999).

As algas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e sustentam mais de dois terços da biomassa mundial, além de serem responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global (DAY *et al.*, 1999), sendo responsáveis pela renovação da maior parte do oxigênio presente no ar atmosférico (LEE, 1999).

1.1.1 – ALGAS MARINHAS VERMELHAS

As rodofíceas (Rhodophyceae, do grego *rhodon*, 'vermelho' e *phycos*, 'alga'), rodófitas ou algas vermelhas são seres fototróficos e estão enquadradas na divisão Rhodophyta (LEE, 1999).

Seus cloroplastos possuem como pigmentos principais as clorofilas *a* e *d*, e como pigmentos acessórios as bilinas, ficocianinas e ficoeritrinas, também conhecidas por ficobiliproteínas. O pigmento predominante nas algas vermelhas é a ficoeritrina, que absorve comprimentos de onda de luz na região do verde (495 - 570 nm), refletindo onda de luz na região do vermelho (LOBBAN; HARRISON, 1997) o que lhes confere a cor avermelhada, característica do grupo. A presença desse pigmento vermelho permite a sobrevivência de algas que habitam regiões bastante profundas, até cerca de 200 metros. Estes pigmentos são capazes de absorver o comprimento de onda da luz solar que atinge grandes profundidades do oceano (REVIERS, 2006; LEE, 1999).

Além de pigmentos característicos, a divisão Rhodophyta apresenta carboidratos de reserva, também específicos para as algas vermelhas. O rodamilo ou amido das florídeas são carboidratos de reserva das algas vermelhas e se formam próximo a membrana plasmática (REVIERS, 2006; LEE, 1999).

A parede celular, em sua parte fibrilar, é constituída de celulose na maioria das espécies, exceto em algumas espécie de Bangiales, que é constituída de xilanos, e em sua parte mucilaginosa, constitui-se de galactanos sulfatados. Na ordem das Corallinales, suas espécies possuem calcário (calcita cristalizada) depositado em suas paredes (REVIERS, 2006).

Das algas marinhas vermelhas, são extraídos mucilagens, ágar e carragenana ou carragenina. O ágar é composto de agarose e agarpectina que na indústria alimentícia são utilizados no processamento de queijos, maioneses, cremes, geléias, gelatinas, entre outros produtos. Já na indústria farmacêutica estes compostos são usados como laxantes leves, agentes de dispersão em drogas, emulsificadores, espessantes, loções, cosméticos, etc. Em laboratórios, estes carboidratos de algas vermelhas são utilizados como fonte de alimento para o crescimento de culturas bacteriológicas, géis de eletroforese para separação de biomoléculas e microesferas de cromatografia para purificação de biocompostos. A carragenana é composta principalmente pela κ (capa)-carragenana e λ (iota)-carragenana que industrialmente são utilizadas como agentes geleificantes, estabilizantes, espessantes ou emulsificantes (REVIERS, 2006; LEE, 1999).

Dentro da divisão Rhodophyta estima-se que haja cerca de 700 gêneros com 4.000 a 6.000 espécies, das quais, a maior parte é marinha, com apenas cerca de 20 gêneros dulcícolas (LEE, 1999).

Vários pesquisadores, por décadas, vêm propondo sistemas de classificação para as algas vermelhas, baseando-se principalmente em seu sistema de reprodução sexual. E, um prestigiado banco de dados de algas, o Algaebase, uniu diversas classificações dos mais bem-conceituados autores, e as arranjou da seguinte maneira (<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/> - acesso em: 17 nov. 2009):

Império: Eukaryota (24.676 espécies)

Reino: Plantae (12.402 spp)

Sub-Reino: Biliphyta (6.086 spp)

Filo: Rhodophyta (6.081 spp)

Sub-filo: Eurhodophytina (5.982 ssp)

Classe: Bangiophyceae (133 ssp)

Ordem: Bangiales (131 ssp)

Ordem: Goniotrichales (2 ssp)

Classe: Florideophyceae (5.849 ssp)

Ordem: Acrochaetiales (272 ssp)

Ordem: Acrosymphytales (14 ssp)

Ordem: Ahnfeltiales (8 ssp)

Ordem: Balbianiales (3 ssp)

Ordem: Balliales (4 ssp)

Ordem: Batrachospermales (150 ssp)

Ordem: Bonnemaisoniales (32 ssp)

Ordem: Ceramiales (2.397 ssp)

Ordem: Colaconematales (35 ssp)

Ordem: Corallinales (623 ssp)

Ordem: Florideophyceae incertae sedis (7ssp)

Ordem: Gelidiales (181 ssp)

Ordem: Gigartinales (839 ssp)

Ordem: Gracilariales (236 ssp)

Ordem: Halymeniales (268 ssp)

Ordem: Hildenbrandiales (19 ssp)

Ordem: Nemaliales (239 ssp)

Ordem: Nemastomatales (66 ssp)

Ordem: Palmariales (43 ssp)

Ordem: Pihelliales (1 ssp)

Ordem: Plocamiales (41 ssp)

Ordem: Rhodogorgonales (2 ssp)

Ordem: Rhodymeniales (335 ssp)

Ordem: Sebdeniales (19 ssp)

Ordem: Thoreaales (14 ssp)

Sub-filo: Metarhodophytina (63 ssp)

Classe: Compsopogonophyceae (63 ssp)

Ordem: Compsopogonales (14 ssp)

Ordem: Erythropeltiales (48 ssp)

Ordem: Rhodochaetales (1 ssp)

Sub-filo: Rhodophytina (36 ssp)

Classe: Porphyridiophyceae (14 ssp)

Ordem: Porphyridiales (14 ssp)

Classe: Rhodellophyceae (4 ssp)

Ordem: Rhodellales (4 ssp)

Classe: Stylonematophyceae (18 ssp)

Ordem: Rufusiales (1 ssp)

Ordem: Stylonematales (17 ssp)

1.1.1.1 – ALGA MARINHA VERMELHA *HYPNEA MUSCIFORMIS*

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen). J. V. Lamouroux pertence à ordem Gigartinales, família Hypneaceae (REIS *et al.*, 2006)

Morfologicamente essa espécie possui tamanho geral que pode variar entre 3 e 30 cm, apresentando ramos cilíndricos e cartilaginosos com ramificações variáveis e irregulares. Um padrão morfológico bastante característico da alga marinha vermelha *H. musciformis* é a presença de ganchos nas extremidades das ramificações (http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/pdf%20files/hypea_musciformis.pdf – acesso em: 05 out.2009).

Esta alga geralmente habita regiões de estuários e habitats marinhos. É comum encontrá-las em marés calmas e rasas, porém, elas são mais freqüentemente encontradas em recifes, bancos de areia e rochas, epifitando *Sargassum* e outras algas. No estágio de florescimento, pode ser encontrada flutuando livremente. Devido sua característica de epífita, a *H. musciformis* pode ser considerada como um invasor altamente oportunista. (REIS, 2000).

Sua ampla distribuição pelos oceanos deve-se ao fato de uma fácil dispersão, rápida taxa de crescimento, capacidade de epifitar outras algas e fácil fragmentação. Muitas vezes, a disseminação pode ser reforçada também por viagens quando presas em cascos de barcos (<http://www.hawaii.edu/reef>

algae/invasive_algae/pdf%20files/hypnea_musciformis.pdf – acesso em: 05 out. 2009).

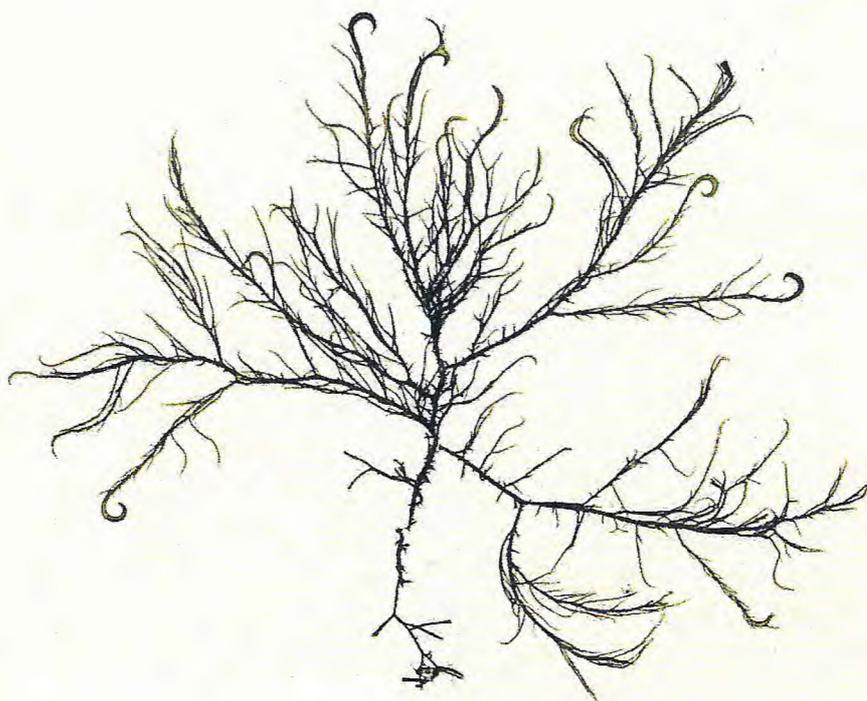


Figura 01. *Hypnea musciformis*.

Recentemente, a alga marinha vermelha *H. musciformis* foi introduzida no Havaí e rapidamente se tornou um incômodo. A Universidade do Havaí destinou U\$ 60.000,00 dólares para financiar pesquisas que estão sendo realizadas para controlar cinco espécies invasoras no país, incluindo a *H. musciformis* (<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=728&fr=1&sts=&lang=EN> – acesso em 05 out. 2009).

A *H. musciformis* constitui uma das fontes de alimento de seres herbívoros marinho, dentre estes, tornou-se parte significativa da sua dieta alimentar da tartaruga verde, *Chelonia mydas*, considerada espécie ameaçada de extinção (<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=728&fr=1&sts=&lang=EN> – acesso em 05 out. 2009).

1.2 – COMPOSTOS BIOLÓGICOS DE ALGAS MARINHAS

As algas marinhas têm se mostrado uma rica fonte de compostos naturais, muitos deles de imenso interesse biotecnológico (CARDOSO *et al.*, 2007). Elas compreendem um grupo promissor no fornecimento de compostos para nutrição humana como vitaminas, minerais e antioxidantes (MAYER; HAMANN, 2004). Pesquisas de novas drogas de fontes naturais indicam as algas marinhas como grandes potências no fornecimento de novas substâncias biologicamente ativas como ácidos graxos, carotenóides, ficocolóides (ágar e carragenana), lipídeos, minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, toxinas e lectinas (SMIT, 2004; NORZIAH; CHING, 2000; LEE, 1999).

Para as algas marinhas, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), são fundamentais no funcionamento normal de suas células, regulando a fluidez da membrana celular e adaptando-as a diversas variações térmicas ambientais (GILL; VALIVETY, 1997). Ao serem ingeridos por humanos, esses PUFAs são fontes importantes de ômega 3, 6 e 9, importantes para a saúde humana. Na aquicultura, tem sido demonstrado que esses ácidos graxos e seus derivados são necessários na dieta de crustáceos. Óleo de algas (rico em PUFAs), associados à farinha de peixe, tem sido utilizado em experimentos como fonte alternativa de proteína ao ser usado como um substituto de óleo de peixe (fonte de ácidos graxos altamente insaturados - HUFAs) para complementar e melhorar a palatabilidade de dietas em cultivos de camarões peneídeos, *Litopenaeus vannamei* (PATNAIK *et al.*, 2006).

Carotenóides são pigmentos acessórios importantes na captação de energia solar para a posterior realização da fotossíntese nas algas marinhas. Esses pigmentos são divididos em carotenos e xantofilas, no qual o caroteno mais abundante é o β -caroteno; e a xantofila mais importante é a fucoxantina (LEE, 1999). Esses pigmentos constituem uma reserva natural de provitamina A. Sua atividade antioxidante representa um grande benefício para a saúde humana diminuindo os riscos de certas patologias (STANLEY *et al.*, 2005) e podem ser de utilidade para a indústria alimentícia na dieta humana, como fonte alternativa de ingredientes com alto valor nutritivo (NORZIAH; CHING, 2000).

Os ficocolóides são polissacarídeos sulfatados presentes na parede celular das algas e estão envolvidos em mecanismos de reconhecimento entre as algas e os patógenos (ANDREAS *et al.*, 2004). Os principais ficocolóides extraídos de algas são o ágar, a carragenana e o alginato. O ágar e a carragenana são extraídos de algas marinhas vermelhas, enquanto que o alginato é encontrado em algas marinhas pardas. Estes compostos apresentam propriedades emulsificantes e alta viscosidade, que despertam permanentes interesses industriais nas áreas farmacêuticas, alimentícias, têxteis, dentre outras (HALLEGRAEFF *et al.*, 2003). Na aquicultura tem-se usado a farinha de algas, devido à presença desses ficocolóides, que agem como ligantes em rações de camarão, substituindo o uso de aglutinantes sintéticos ou de farinha de vegetais, a fim de reduzir a perda de nutrientes por lixiviação e evitar a poluição da água, além de ampliar a atratividade, palatabilidade e texturização, resultando em maior sobrevivência de camarões e melhoria do crescimento, contribuindo para o aumento da produção de proteína animal (RIVERA *et al.*, 2002; CRUZ-SUÁREZ *et al.*, 2000; PEIKFLORIDA; GOLEZ, 1996).

Há relatado ainda, o uso de polissacarídeos sulfatados como agentes imunoestimulantes a fim de reduzir o impacto do estresse causado no cultivo de organismos aquáticos durante a larvicultura de peixes e camarões, melhorando a taxa de sobrevivência das pós-larvas (BARROSO *et al.*, 2007). Além disso, ocorre um aumento da imunidade e da resistência contra infecções patogênicas, especialmente por víbrios, examinados em camarões, moluscos e peixes, principalmente no período larval e juvenil (CHEN *et al.*, 2007; SKJERMO *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2006; HOU; CHEN, 2004; ASCENCIO *et al.*, 2002).

1.2.1 – COMPOSTOS DA *HYPNEA MUSCIFORMIS*

Na natureza a alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* ocorre como epífita e apresenta uma das maiores taxas de crescimento, por isso, a espécie vem sendo usada potencialmente na maricultura (REIS, *et al.*, 2006; 2003).

No Brasil, esta é uma das únicas espécies até agora exploradas como matéria-prima para a produção de k-carragenina (REIS, 1998; BERCHEZ *et al.*, 1993), um produto muito importante utilizado nas indústrias como ficocolóide gelificante (BRAVIN; YONESHIGUE-VALENTIN, 2006).

Salimabi (1980) concluiu que a capa-carragenina extraída de *H. musciformis* mostrou atividade anti-inflamatória contra edemas induzidos em pata de rato. Uma fração protéica obtida a partir de *H. musciformis* rica em aglutininas foi testada por Melo *et al.* (1997) em experimentos biológicos demonstrando atividade antifúngica contra os fungos *Trichophyton rubrum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, com inibição total da germinação dos esporos. Freitas *et al.*, (1999) conseguiram identificar proteínas, presentes nessa espécie algal, com atividade hemaglutinante. Nagano *et al.*, (2002; 2005) conseguiram isolar uma lectina de *H. musciformis* denominando-a de HML, que juntamente com a lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cerviconis* formaram uma nova família de proteínas.

1.3 – PROTEÔMA

O termo proteoma foi proposto em 1995 em um Congresso de Eletroforese Bidimensional em Siena por Wilkins (1997) e representa o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um dado momento de desenvolvimento.

Com isso, o proteoma permite analisar o estado atual de funcionamento de um organismo em condições fisiológicas específicas representando a expressão funcional de um genoma. Com o estudo do proteoma é permitido identificar, caracterizar e quantificar todas as proteínas envolvidas no funcionamento de uma organela, célula, tecido, órgão ou organismo. Isso faz com que o estudo do proteoma se torne um grande desafio já que a expressão de proteínas na célula é bastante dinâmica e varia com o ambiente. Dependendo da condição ambiental, muitas proteínas podem deixar de ser expressas e outras, não expressas em condições normais de desenvolvimento, apresentam estímulo para serem expressas (SILVEIRA, 2003).

Estudar o potencial destas proteínas, que apresentam expressão inibida ou estimulada, é o grande motivo para se fazer estudo de bioprospecção de proteínas com grande potencial biotecnológico.

Os projetos proteômicos disseminados mundialmente têm como objetivos: identificar todas as proteínas que atuam em uma célula, tecido ou órgão no estado normal e em diferentes situações fisiológicas ou patológicas;

analisar sua abundância, suas variações; entender as vias de sinalização usadas pelas células para enviar mensagens da membrana para o núcleo, do núcleo para outros setores internos e vice-versa; investigar como as proteínas são codificadas pelos genes e alteradas por múltiplas interações dentro das células promovem as atividades biológicas (BELIZÁRIO, 2008); determinar os níveis de expressão; estudar interações proteína-proteína; identificar modificações pós-translacionais de proteínas (YARMUSH; JAYARAMAN, 2002).

Duas importantes ferramentas como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa têm permitido identificar as proteínas expressas de um organismo (JAMERS *et al.*, 2009).

Um termo anterior ao proteoma é o genoma que tornou-se um termo genérico na biologia molecular. Muitas outras “ômicas” surgiram em função de um maior entendimento da representação dos códigos de letras presentes no DNA de um organismo. A genômica compreende o estudo dos genes funcionais e não funcionais existentes do DNA de um organismo. O transcriptoma permite estudar todos os transcritos/RNA mensageiro (mRNA) e o proteoma estuda os transcritos traduzidos em uma célula sob uma dada condição de desenvolvimento (JAMERS *et al.*, 2009).

A complexidade de um organismo não é determinada pela quantidade de genes que o mesmo possui, mas sim pela variação do número de proteínas que um organismo é capaz de sintetizar. Alguns processos complexos como diferentes combinações de éxons por splincing alternativo, processamento pós traducional (exemplo: clivagem de pró peptídeo), modificações pós traducionais (exemplo: acetilação, glicosilação) podem somente ser avaliados quando submetidos a análises complementares à genômica. Além disso, essas análises complementares, como o transcriptoma e a proteômica, permitem estudar o controle da expressão gênica no que diz respeito à transcrição e tradução. A análise proteômica permite uma descrição dinâmica da regulação da expressão gênica, através do estudo das proteínas de um indivíduo e suas modificações pós-traducionais. Uma abordagem proteômica é baseada em três principais metodologias: (i) eletroforese bidimensional que separa milhares de proteínas presentes em uma única amostra, (ii) espectrometria de massa extremamente importante para identificar proteínas bem como suas

modificações pós traducionais e (iii) bioinformática utilizada para criar um banco de dados das proteínas identificadas. A cromatografia multidimensional também pode ser empregada. A utilização da análise proteômica é bastante ampla e complementar com as abordagens genômicas e pode ser uma poderosa ferramenta para identificação de marcadores associados a doenças e também alvos de drogas (WILKINS *et al.*, 1997).

1.3.1 – FERRAMENTAS PROTEÔMICAS

Tecnologias proteômicas podem ser amplamente classificadas como aquelas utilizadas para o mapeamento e a caracterização de proteína, e aquelas para estudar as interações proteína-proteína e a função da proteína (YARMUSH; JAYARAMAN, 2002).

Os imunoenaios são capazes de extrair um tipo de proteína em baixíssimos níveis de concentração em uma mistura com dezenas de milhares de proteínas (EGAS; WIRTH, 2008) e têm como fundamentos o isolamento, a seletividade e o rápido transporte de massa. O imunoensaio é baseado na ligação específica de um anticorpo à proteína, através de um arranjo espacial dos grupos funcionais que se encaixam como chave-fechadura, com os grupos funcionais da proteína ou outra substância de interesse (WOOF; BURTON, 2004)

Microarray é uma versátil ferramenta na avaliação das atividades das proteínas, na identificação de drogas e medicamentos-alvo em diagnósticos clínicos, e na análise do aspecto de reatividade dos anticorpos nos indivíduos, em presença de um número limitado de proteínas. Anticorpos (ou outros reagentes de afinidade dirigidos contra proteínas definidas) são “spotados” em uma superfície como uma lâmina de vidro. Uma mistura complexa, como uma célula lisada ou soro, é passada sobre a superfície para permitir que os antígenos presentes se liguem aos seus anticorpos cognatos (ou reagentes específicos). O antígeno ligado é detectado tanto usando proteínas lisadas contendo marcadores fluorescentes ou marcadores radioativos, ou usando um derivado de anticorpo contra os antígenos de interesse. Os microarrays de proteína têm desempenhado um papel importante na identificação das enzimas responsáveis por muitas modificações e na especificidade de substrato dessas

enzimas, bem como para medir os níveis de várias proteínas no sangue e soros em matrizes de anticorpos de baixa densidade (ZHU *et al.*, 2003).

A espectrometria de massa (MS) está sendo usada para a caracterização e identificação de proteínas, determinação do massa molecular e concentrações, bem como a composição de aminoácidos de uma determinada proteína. (YARMUSH; JAYARAMAN, 2002). Recentemente a espectrometria de massa evoluiu para a análise simultânea da expressão de mais de 1.000 proteínas e na identificação e mapeamento de alterações pós-translacionais de proteínas (ZHU *et al.*, 2003).

Várias são as técnicas utilizadas para separar uma mistura de proteínas para estudos proteômicos, dentre elas podemos citar CZE (capillary zone electrophoresis), RPLC (reversed-phase liquid chromatography), SCX (strong cation Exchange), MudPIT (multidimensional protein identification technology), SEC (size exclusion chromatography), IMAC (immobilized metal affinity chromatography), e 2D-PAGE (polyacrylamide gel in a two-dimensional electrophoresis) (EGAS; WIRTH, 2008).

1.3.1.1 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

Eletroforese é um procedimento bioquímico no qual é realizada a separação de proteínas pela migração destas, de acordo com sua massa, em um campo elétrico, a partir do qual se pode estimar seu grau de pureza e seu massa molecular (LEHNINGER, 2006).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é um poderoso método, amplamente utilizado, para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas a partir de células, tecidos ou outras amostras biológicas (GE, 2005). Esta técnica separa proteínas de acordo com duas propriedades independentes em duas etapas distintas.

Na primeira etapa tem-se a focalização isoeletrica (IEF) conhecida também como primeira dimensão, que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). A separação ocorre do seguinte modo: um gradiente de pH é estabelecido no gel de focalização isoeletrica pela presença de anfólitos. A amostra rica em proteínas é adicionada ao gel que, em seguida, é submetido a um campo elétrico, permitindo a migração das proteínas carregadas ao longo do gel. No caminho percorrido pelo gel contendo gradiente

de pH, a proteína em um determinado momento apresenta carga líquida total igual a zero, ou seja, não apresenta carga e portanto não migra mais no decorrer do gel. O valor de pH em que a proteína apresenta carga líquida zero ou nula é denominado ponto isoelétrico (pI) da proteína. Neste caso, o valor numérico de pH é o mesmo valor numérico de pI para as proteínas com carga nula que cessaram sua migração (LEHNINGER, 2006).

Na segunda dimensão tem-se a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), no qual o SDS se liga às moléculas de proteínas conferindo-lhes uma carga negativa. Ao aplicar um campo elétrico ao gel SDS-PAGE, as proteínas migram ao longo do mesmo e assim, a separação das proteínas ocorre de acordo com suas massa moleculares aparentes (LEHNINGER, 2006).

Ao final da segunda dimensão, a revelação das bandas protéicas presentes no gel indica a presença de diferentes proteínas separadas por dois parâmetros físico-químicos: ponto isoelétrico e massa molecular aparente. Neste caso, cada banda protéica corresponde potencialmente a uma espécie única de proteína na amostra e é denominada "spot" (LEHNINGER, 2006).

Milhares de proteínas diferentes podem assim ser separadas, e informações como o pI da proteína, a massa molecular aparente (MW) e a quantidade de cada proteína podem ser obtidas (GE, 2005).

Muitas tecnologias alternativas vêm sendo criadas com o propósito de estudar proteínas, porém a 2-DE é atualmente a única técnica que pode ser aplicada rotineiramente para se fazer o paralelo do perfil quantitativo de expressão de grandes conjuntos de misturas de proteínas complexas. Além disso, proporciona um mapa de proteínas intactas, que reflete as mudanças no nível de expressão de proteínas, isoformas, ou modificações pós-traducionais. Ainda existem desafios no que diz respeito às amostras que abrangem uma imensa gama proteômica de abundância relativa e uma variedade físico-química incluindo propriedades como solubilidade, hidrofobicidade / hidrofiliabilidade, tamanho e/ou carga (GE, 2005).

Dentre as várias técnicas de separação para análise proteômica, a técnica de eletroforese bidimensional provou ser uma das mais poderosas técnicas para a detecção e quantificação confiável de proteínas diferencialmente expressas, pois esta fornece um alto potencial para a

detecção de proteínas de baixa abundância e uma maior resolução em comparação com outros métodos (GE, 2005).

A 2-DE tem sido a principal ferramenta para a obtenção de uma visão global dos níveis de expressão de um proteoma sob várias condições (ZHU *et al.*, 2003). Utilizando a 2-DE, a análise de um estado celular normal e um anormal podem ser comparados ao identificar as proteínas pelo aparecimento ou desaparecimento de um spot em um local do gel, ou mudanças na intensidade do registro do spot de proteína (YARMUSH; JAYARAMAN, 2002).

Uma desvantagem da 2-DE é que nem sempre esta metodologia representa o proteoma inteiro. Em uma célula, as proteínas são expressas sobre uma ampla variedade e abundância, e uma célula em um dado momento expressa de 5.000 a 10.000 genes, o que poderia resultar em uma síntese de pelo menos 20.000 a 30.000 proteínas distintas, devido, por exemplo, a splicing de mRNA e modificações pós-traducionais. No entanto, usando o método atual de eletroforese 2-D, só é possível detectar cerca de 3.000 spots de proteínas em um gel de 18-20 cm², introduzindo erros na detecção de proteínas, bem como na quantificação. Outra desvantagem da tecnologia 2-DE atual é a incapacidade para quantificar de forma confiável os níveis de proteína a partir de perfis proteômicos. Quantificação de proteínas *in loco* depende de uma grande medida sobre a detecção e resolução de cada spot de proteína através da análise de imagem (YARMUSH; JAYARAMAN, 2002).

Sabe-se que as proteínas têm várias propriedades que variam devido à diversidade de aminoácidos. As mais notáveis são o massa molecular, carga e hidrofobicidade. A separação tridimensional (3D) de proteínas é o que se deseja no isolamento de proteínas em amostras complexas. Porém, a terceira dimensão, caracterizada pela hidrofobicidade, não é usada em conjunto com géis de 2-DE, pois as proteínas são desnaturadas pelo dodecilsulfato de sódio (SDS) na segunda dimensão, que mascara a hidrofobicidade da proteína. Assim, para a separação das proteínas por essa propriedade, após a separação por 2-DE, os spots (proteínas desnaturadas) são removidos individualmente do gel SDS-PAGE e digeridos pela enzima proteolítica tripsina formando peptídeos que serão identificados por espectrometria de massa. (EGAS; WIRTH, 2008).

A 2-DE associada à MS é uma tecnologia que permitiu a evolução no campo de identificação de proteínas presentes em misturas complexas. Graças ao desenvolvimento dos dois principais métodos de ionização de proteínas Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) e a ElectroSpray Ionization (ESI) foi possível tornar viável a análise de biomoléculas como peptídeos e proteínas (ZHU *et al.*, 2003).

1.3.2 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Diferentes tipos de proteínas são expressas em resposta às variações nos níveis de hormônios, ritmos biológicos e estímulos externos. Até hoje, cerca de 5 mil proteínas já foram identificadas (BELIZÁRIO, 2000).

O sequenciamento da estrutura primária de uma proteína define sua forma e função. Sabe-se que, após serem sintetizadas, as proteínas podem sofrer importantes modificações chamadas pós-traducionais, como glicosilações, fosforilações. Tais informações não podem ser retiradas somente da sequência dos genes, havendo necessidade de estudos proteômicos. Além disso, o estudo do genoma não permite saber realmente que proteínas estão sendo expressas em uma determinada célula em um dado momento. Assim, torna-se evidente o estudo em larga escala das proteínas por meio de projetos de análise de proteômas (SOUSA *et al.*, 2000).

A qualidade dos dados das sequências das proteínas é essencial para a compreensão de sistemas biológicos. Informações sobre a expressão da proteína, modificações pós-traducionais, estrutura terciária e função são importantes para serem utilizadas no momento da deposição da sequência em bancos de dados. Para estudo proteômico existem alguns relevantes bancos de dados de sequências de proteínas, sequências de nucleotídeo, géis de 2-DE e de estrutura tridimensionais (JAMERS, 2009).

O Swiss-Prot é um banco de dados cujas sequências de proteínas são depositadas manualmente e apresentam dados confiáveis além de um elevado nível de anotação como a descrição da função de uma proteína, a sua estrutura de domínios, modificações pós-traducionais, um nível mínimo de redundância e alto nível de integração com outras bases de dados. Este banco de dados foi criado em 1986 pelo Instituto Suíço de Bioinformática e do Instituto Europeu de Bioinformática. (BOECKMANN *et al.*, 2003)

Em 2002 foi criado o consórcio UniProt que é uma colaboração entre o Instituto Suíço de Bioinformática, a Comissão Europeia e o Instituto de Pesquisas de Bioinformática financiados pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. O banco de dados Swiss-Prot uniu-se ao banco de dados de sequências gênicas TrEMBL para criar o banco de dados UniProt que atualmente é o catálogo mais completo do mundo contendo informações sobre genes e proteínas (WU *et al.*, 2006).

O banco de dados 2-D PAGE contém mapas de referência de géis 2-DE e informação de proteínas identificadas de uma variedade de amostras biológicas. Existem alguns bancos de dados para estudos proteômicos utilizando eletroforese bidimensional. Alguns bancos de dados são específicos para organismos como é o caso do 2DBase-Ecoli (banco de dados com informações referentes a bactéria *Escherichia coli*), o Cornea-2DPAGE (banco de dados contendo informações específica a amostras da córnea humana), DOSAC-COBS 2D-PAGE (banco de dados contendo informações de proteínas presentes em diferentes tipos de células humanas), Peroxisomal-2DPAGE (banco de dados contendo informações específicas a proteínas presentes em fígado de camundongo), Plasmo2Dbase (banco de dados de *Plasmodium falciparum*). Outros bancos de dados de amostras oriundas de 2-DE apresentam informações de diversos organismos como os bancos de dados: KAIKO 2DDB e SWISS-2D PAGE (WILKINS *et al.*, 1997).

SWISS-2DPAGE é um banco de dados de anotações de dados referentes à eletroforese bidimensional foi criado em 1993 e reúne dados sobre proteínas identificadas em vários mapas de 2-DEPAGE e SDS-PAGE. Cada entrada no banco de dados SWISS 2-DEPAGE contém dados textuais sobre uma proteína, incluindo os procedimentos de mapeamento, as informações fisiológicas e patológicas, os dados experimentais (ponto isoelétrico, massa molecular, composição em aminoácidos e massa dos peptídeos) acompanhados de referências bibliográficas. Além de dados textuais, o SWISS-2DEPAGE fornece várias imagens de 2-DEPAGE e SDS-PAGE mostrando experimentalmente a localização de determinada proteína, bem como a sequência da proteína determinada por cálculos teóricos (HOOGLAND *et al.*, 2004).

Com estes bancos de dados é possível conhecer a função de algumas proteínas presentes numa determinada amostra. Uma estratégia alternativa para identificar proteínas não identificadas pelos bancos de dados de 2-DE é a utilização de um espectrômetro de massa. Através dele é possível determinar a estrutura primária de diversas proteínas presentes num gel de poliacrilamida e, a partir da estrutura primária novamente utilizar bancos de dados para identificar a função da proteína. Para proteínas com função desconhecidas é necessário fazer inúmeros estudos de atividades biológicas, caracterização de estrutura tridimensional dentre outras análises (WILKINS *et al.*, 1997).

Por isso, diante do que foi exposto, este trabalho teve como objetivo geral determinar uma metodologia efetiva na extração de proteínas totais presentes na macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* para posterior análise proteômica através de eletroforese bidimensional (2-DE).

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – COLETA

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* foi coletada na Praia do Pacheco, situada no Município de Caucaia - CE, no dia 20 de outubro de 2009, com maré de altura 0,4 m, realizada entre 10 e 12 horas, de acordo com o momento mais propício pela maré.

Essas amostras foram manipuladas com luvas e submetidas a um cuidadoso processo de remoção manual de organismos e de outras espécies de algas epifitadas pela *H. musciformis*, já que esta espécie consiste em um tipo de epífita (REIS, 1998), e então foram coletados 150 g de biomassa algal, com bastante cuidado, tentando-se preservá-las ilesas ao máximo possível.

2.2 – EXTRAÇÃO PROTEÍCA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste trabalho foram testadas três metodologias distintas para a extração das proteínas totais, descritas a seguir.

2.2.1 – 1ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL

50g de alga maceradas com nitrogênio líquido foram acrescidos 250 mL (1:5 - p/v) de tampão fosfato de sódio 150 mM com cloreto de sódio 10 mM (PBS), pH 7,4 e deixou-se sob agitação por aproximadamente 12 horas. Após isso, este material foi filtrado para remover partículas grandes da alga, depois centrifugado e o sobrenadante foi liofilizado.

Desse material liofilizado, 1 mg foi pesado e solubilizado em 500 µL de uréia 7,0 M com tiuréia 2,0 M para ser aplicado no gel de eletroforese 2D.

2.2.2 – 2ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL

Utilizou-se outros 50g de alga, também macerados, que foram adicionados 200 mL de tampão Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β-mercaptoetanol 0,4%, 0,2% de Triton X-100 10% e PMSF (fenilmetanosulfonil fluorídeo) 1,0 mM.

O material ficou sob agitação por 1 hora a 4°C. Em seguida, a fim de melhor romper as células da alga, o material foi sonificado três vezes em ciclo de 10 segundos com intervalos de 30 s, potência de 70 W. Então, foi agitada em vortex por 3 minutos e, na sequência, centrifugada a 9.000xg por 20 min a 4 °C. Do extrato total, foram retirados 180 mL e a ele foram adicionados 4 volumes de acetona gelado com 10% de TCA (ácido tricloroacético), com objetivo de precipitar proteínas e purificar o extrato protéico de possíveis contaminantes como sais. O material foi deixado em repouso por 10 min a 4 °C. Na sequência foi centrifugado a 22.000xg por 20 min a 4 °C. O precipitado foi seco em *speed vacuum* e depois foi adicionado 1 mL de acetato de amônio 1 M em metanol para remover resquícios de TCA e acetona. Esta amostra foi submetida à vortex por 5 min e depois a centrifugação a 9.000xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em *speed vacuum*. Por fim, foi adicionado 500 µL de uréia 7,0 M com tiuréia 2,0 M para solubilizar as proteínas a serem submetidas a eletroforese bidimensional. Antes, 100 µL do material protéico foram quantificados pelo método de Bradford (1976), a fim de se obter a concentração protéica, e o restante foi usado na eletroforese bidimensional (2-DE).

2.2.3 – 3ª METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO PROTEÍCA TOTAL

Outros 50 g de alga macerada foram adicionados 200 mL de tampão de extração: Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β-mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM. Este material foi submetido a extração protéica por agitação durante 1 hora a 4 °C. Depois o extrato protéico foi sonificado três vezes por 10 segundos, com potência de 70 W, com intervalos de 30 segundos e na sequência, foi centrifugado a 9.000xg por 20 min a 4 °C.

Proteínas presentes em um volume de 20 mL do sobrenadante foram concentradas ao volume de 500 uL com auxílio de *speed vacuum*. A esta amostra foi adicionado igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e, submetido à vortex por 15 min e em seguida centrifugado a 6.000xg por 10 min a 4 °C. A fase fenólica foi coletada e adicionada 1 volume de tampão de extração. Em seguida, este material foi submetido à vortex por 5 min seguido de centrifugação a 6.000xg por 10 min a 4 °C. A fase fenólica foi transferida

para outro tubo e a ela foi adicionado 5 volumes de acetato de amônio em metanol. O material foi mantido a -20°C por 12 horas para permitir uma máxima precipitação de proteínas. Após isso, o material foi centrifugado a $16.000\times g$ por 20 min a 4°C sendo o precipitado lavado cinco vezes com $200\ \mu\text{L}$ de acetona com 0,2% de DTT. Após evaporação da acetona com auxílio de *speed vacuum* o precipitado foi solubilizado com $500\ \mu\text{L}$ de solução de uréia 7,0 M com tiuréia 2,0 M. Do material protéico, $100\ \mu\text{L}$ foram quantificados pelo método de Bradford (1976) e o restante usado na 2-DE.

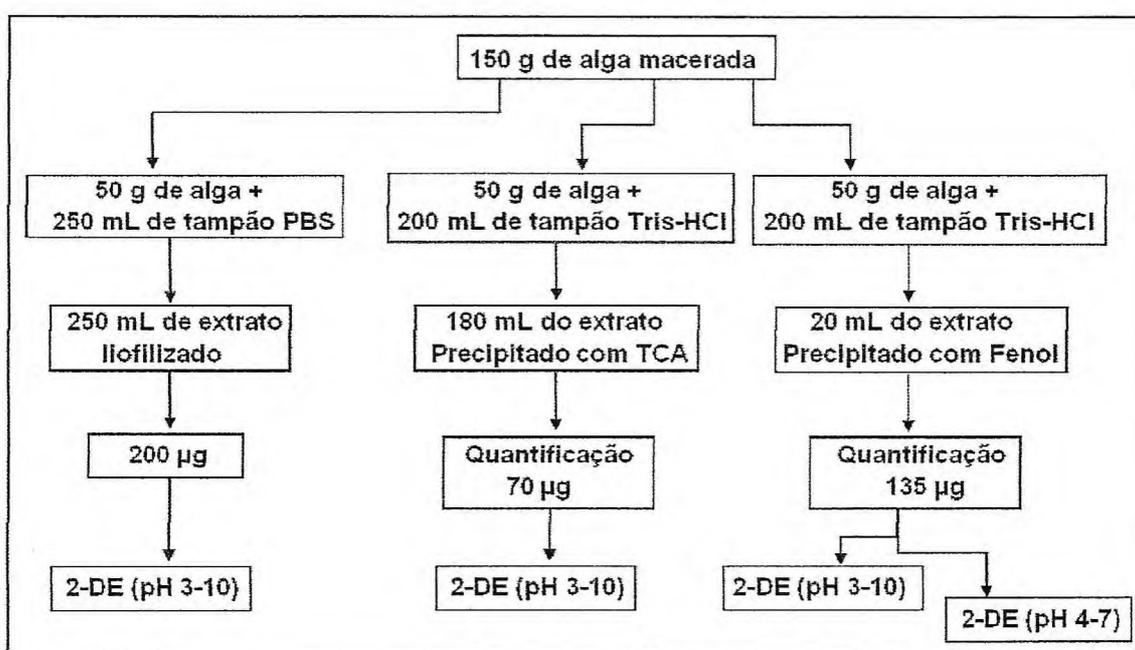


Figura 02. Fluxograma das metodologias utilizadas.

2.3 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

As quantificações de proteínas totais foram realizadas de acordo com o método de Bradford (1976). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas solúveis foi estimada com relação à curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

2.4 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-D PAGE)

A metodologia experimental adotada para a eletroforese 2-D seguiu a seguinte seqüência:

1. Re-hidratação das fitas de gel (*DryStrip's*)
2. 1ª Dimensão: Focalização isoelétrica (IEF)
3. Equilíbrio das *DryStrip's*
4. 2ª Dimensão: Eletroforese 2-D em SDS-PAGE
5. Revelação dos géis com Coomassie Blue coloidal
6. Análise

2.4.1 – RE-HIDRATAÇÃO DAS TIRAS DE GEL (*DRYSTRIP'S*)

Primeiramente, foi feito o preparo do tampão de re-hidratação das tiras. Para isso, foram preparados e aliqüotados os seguintes reagentes:

Uréia	7,0 M
Tiouréia	2,0 M
DTT	65,0 mM
IPG buffer	0,5%
CHAPS	0,5%
Azul de bromofenol	Traços
Água Milli-Q q.s.p	500 µL

Observações:

- A uréia e a tiuréia são agentes caotrópicos, ou seja, asseguram uma maior solubilização às proteínas (desnaturam-as).
- O DTT (ditiotreitól) é um agente redutor que tem por função romper pontes de dissulfeto de proteínas, reduzindo-as a –SH livre.
- O IPG buffer contém anfólitos concentrados que aumentam a solubilidade das proteínas, contribui com uma condutividade mais uniforme, aumenta a velocidade de focalização e otimiza o gradiente de pH das *DryStrip's*.

- O CHAPS é um detergente emulsificante sem carga que assegura uma solubilização completa e previne agregações através de interações hidrofóbicas.
- O azul de bromofenol consiste num corante que se movimenta do pólo negativo para o positivo, permitindo o acompanhamento da corrida.

As seguintes quantidades foram adicionadas à água nessa ordem e em seguida a solução foi agitada em vortex.

100 μ L do volume de cada amostra de extração protéica (PBS: 200 μ g/100 μ L; TCA: 70 μ g/100 μ L; Fenol: 135 μ g/100 μ L; obtidos por cálculo de Bradford) foram adicionados separadamente, a 100 μ L do tampão de re-hidratação das tiras, resultando assim, em 200 μ L (1:1) de solução de re-hidratação com amostra protéica para cada respectiva fita. Essa quantidade de solução total (200 μ L) se dá em função do tamanho da tira (11 cm) e a quantidade de proteína, em função do seu grau de saturação (GE, 2005).

Em seguida, depositou-se as seguintes soluções aos *strip holder* (suportes de porcelana que acomodam os géis com sua solução protéica) e, então, colocou-se as tiras de pH sobre suas respectivas soluções, com o gel para baixo para entrar em contato com a solução de proteínas. Pipetou-se 1 mL de óleo mineral sobre todas as fitas para que fosse impedida que a amostra evaporasse ou ressecasse. Por fim, deixou-se as fitas re-hidratando *overnight* (de 10 a 15 horas) e em temperatura ambiente.

2.4.2 - 1ª DIMENSÃO: FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF)

As *strip's* foram levadas ao focalizador isoelétrico (*Ettan IPGphor II*) e este foi programado da seguinte maneira: (voltagem/tempo):

Passo 1 – 200 V/1h

Passo 2 – 500 V/2h

Passo 3 – 5000 V/2h

Passo 4 – 10.000 V até 22.000 VhT

As voltagens mais baixas ajudam a retirar impurezas, e as proteínas de menor massa molecular aparente começam a migrar.

2.4.3 - EQUILÍBRIO DAS *DRYSTRIP'S*

Após a focalização das fitas (*Drystrip's*), estas necessitam, primeiramente, serem equilibradas, antes da etapa seguinte, a separação em gel de poliacrilamida.

Para o equilíbrio das fitas, a seguinte solução de equilíbrio estoque foi anteriormente preparada:

Solução Tris (50 mM)	1,675 mL (pH 8,8 1,5M)
Glicerol (87%)	15 mL
Uréia (6,0 M)	18,02 g
SDS (2%)	1,0 g
Azul de bromofenol	Traços
Água Milli-Q q.s.p	50,0 mL

Observação:

- O SDS se liga às moléculas de proteínas, conferindo-as uma carga negativa e desnaturando-as.

Depois de retirar as *Drystrip's* do focalizador, com o gel para cima, as fitas foram colocadas em tubos de ensaio, e a elas foram adicionados 3 mL da solução de equilíbrio mais 57,8 mg de DTT, por gel, e deixou-se agitando durante 15 min na posição horizontal.

Posteriormente, a solução foi descartada e aos géis foram adicionados 3 mL da solução de equilíbrio com 69,3 mg de Iodoacetamida (IAA), por gel, e deixou-se agitando por mais 15 min na posição horizontal.

Observação:

- O IAA é um reagente sulfidrílico alquilante que impede que as pontes de sulfeto se refaçam.

2.4.4 - 2ª DIMENSÃO: ELETROFORESE 2-D EM SDS-PAGE

Para a preparação dos géis, foi feita a limpeza com água, sabão, água destilada e etanol das placas de vidro e estas foram, então, montadas.

Para a elaboração de cada gel de poliacrilamida a 15%, segundo a metodologia de Shagger e Jagow (1987), a seguinte solução foi preparada, respeitando a ordem dos reagentes:

Água Milli-Q	9,4 mL
Acrilamida 30% e Bis-acrilamida 0,8%	20,0 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	10,0 mL
SDS (10%)	0,4 mL
Persulfato de amônio (10%)	180,0 µL
TEMED	30,0 µL

Observações:

- Acrilamida e bis-acrilamida formam a malha do gel de poliacrilamida.
- O TEMED e o persulfato de amônio são catalisadores da polimerização.

As soluções para os géis foram preparados e colocados entre as placas. Após sua polimerização, cada fita foi colocada no topo do gel, cuidadosamente para evitar que as mesmas tocassem nas placas de vidro. Aos géis, também foi adicionado um marcador de peso molecular (*Amersham*), com os seguintes valores:

Peso (KDa)	Proteína de referência
97,0	Fosforilase b
66,0	Albumina
45,0	Ovoalbumina
30,0	Carbônico anidrase
20,0	Inibidor tripsina
14,4	α lactalbumina

As partes superiores das placas foram vedadas (seladas) com agarose 0,5% fundida.

A solução de agarose 0,5% foi assim preparada:

Tampão de corrida SDS desnaturante q.s.p	100 mL
Agarose	0,5%
Azul de bromofenol	0,002%

Para a corrida dos géis o seguinte tampão de corrida com SDS, dez vezes concentrado (estoque) foi preparado:

Tris-HCl 0,25 M (pH 8,8)	30,285 g
Glicina 1,92 M	144,13 g
SDS 1%	10,0 g
Água Milli-Q q.s.p	1000 mL

O tampão de corrida SDS foi diluído para uma vez concentrado e o sistema foi montado. A fonte (*Power Pac 3000*) foi ligada, com voltagem 120V a 150V e amperagem 20 mA, por gel, por aproximadamente 6 horas.

2.4.5 - REVELAÇÃO DOS GÉIS COM AZUL DE COOMASSIE

Inicialmente cada gel foi fixado três vezes, por 20 minutos cada lavagem, em 200 mL de etanol 30% e ácido fosfórico 2% em água Milli-Q, sob agitação moderada. Depois, foram lavados mais três vezes em 200 mL de ácido fosfórico 2% em água Milli-Q por 20 minutos, também sob agitação moderada. Em seguida, foram lavados uma única vez, por 20 minutos, com 200 mL de solução contendo ácido fosfórico 2%, etanol (ou metanol) 18% e sulfato de amônio 15% em água Milli-Q, ainda sob agitação moderada. Finalmente, aos géis, foram adicionados 4 mL de uma solução contendo o Coomassie Blue Silver G-250 (20,0 g de coomassie/L de água MilliQ mais azida 0,02%). E deixou-se corar durante 24 a 72 horas sob agitação moderada.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso de uma análise proteômica utilizando eletroforese bidimensional depende muito do preparo da amostra a ser analisada. Não foram detectados estudos experimentais analisando proteínas de macroalgas vermelhas utilizando eletroforese bidimensional. Portanto, três diferentes metodologias foram utilizadas neste experimento a fim de se determinar uma melhor condição de extração de proteínas totais livres de contaminantes.

A primeira tentativa foi utilizar 200 µg de proteínas extraídas em tampão PBS (fosfato de sódio 150 mM com cloreto de sódio 10 mM, pH 7,4). A figura 1 mostra o resultado negativo da utilização das proteínas extraídas neste tampão. Muito provavelmente, além de proteínas este tampão extraiu também outras biomoléculas solúveis no mesmo. Isso inviabilizou a migração das proteínas nas tiras contendo pH imobilizado. Sendo assim, nenhuma proteína foi separada utilizando esta metodologia.

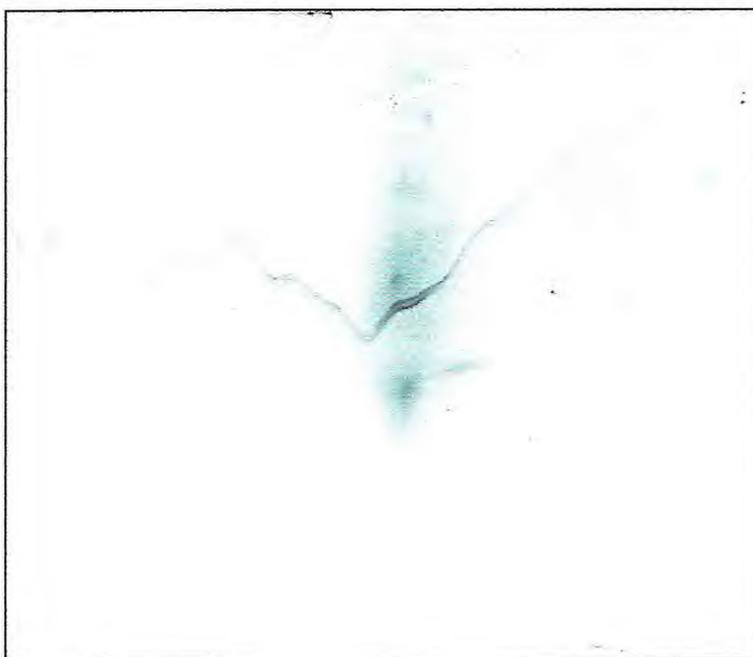


Figura 03. Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha *H. musciformis* com tampão fosfato de sódio 150 mM com cloreto de sódio 10 mM, pH 7,4. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.

A segunda metodologia de extração de proteínas foi baseada em estudos proteômicos feitos em bactérias. Esta metodologia utilizou tampão Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β -mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM para extrair proteínas totais. Vale ressaltar que alguns componentes adicionais foram utilizados nesta metodologia para garantir uma maior extração de proteínas. O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos inibindo a ação de enzimas proteolíticas dependentes de íons metálicos para se manterem ativas, o ácido ascórbico tem atividade antioxidante, β -mercaptoetanol é usado para desnaturar proteínas que possuem pontes dissulfeto, Triton X-100 é um surfactante não-iônico também utilizado para desagregar complexos protéicos, e o fenilmetilsulfonilfluorídeo (PMSF) é um inibidor irreversível que inativa algumas proteases (GE, 2005). Adicionalmente foi utilizada ácido tricloroacético como metodologia alternativa para precipitar proteínas e livrá-las de contaminantes que possivelmente poderiam impedir a migração das mesmas na fita de pH imobilizado durante a focalização isoeletrica. O uso de TCA, baseado em estudos experimentais realizados em bactérias, possibilitou a extração de 70 μ g de proteína/100 μ L de solução contendo a amostra. Como apresentado na figura 3, esta metodologia não foi efetiva, pois as proteínas não foram separadas muito provavelmente pelo fato da amostra conter contaminantes. O claro "arraste" presente ao longo da região direita do gel indica que as proteínas foram focalizadas nesta região de pH básico, porém a presença de contaminantes impediu que o gel apresentasse boa resolução.



Figura 04. Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha *H. musciformis* com Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β -mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM e precipitação de proteínas com TCA. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.

Com a amostra produzida pelo terceiro método de extração de proteínas da macroalga marinha vermelha *H. musciformis* foi feita uma nova eletroforese bidimensional mostrada na Figura 4. O tampão utilizado para extrair proteínas totais foi Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β -mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM, seguida de precipitação de proteínas com fenol saturado com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, possibilitando a extração de 135 μ g de proteína/100 μ L de solução contendo a amostra.

Este tampão foi utilizado com base na análise proteômica de dinoflagelados onde o uso de fenol saturado com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 garantiu a precipitação de proteínas totais livres de contaminante. De fato, esta metodologia até o momento foi a que melhor garantiu resolução das proteínas

separadas no gel de eletroforese bidimensional, sendo mais efetiva que a anterior. Este método precisa ser otimizado, pois na região inferior do gel, as proteínas focalizadas apresentaram baixa resolução.

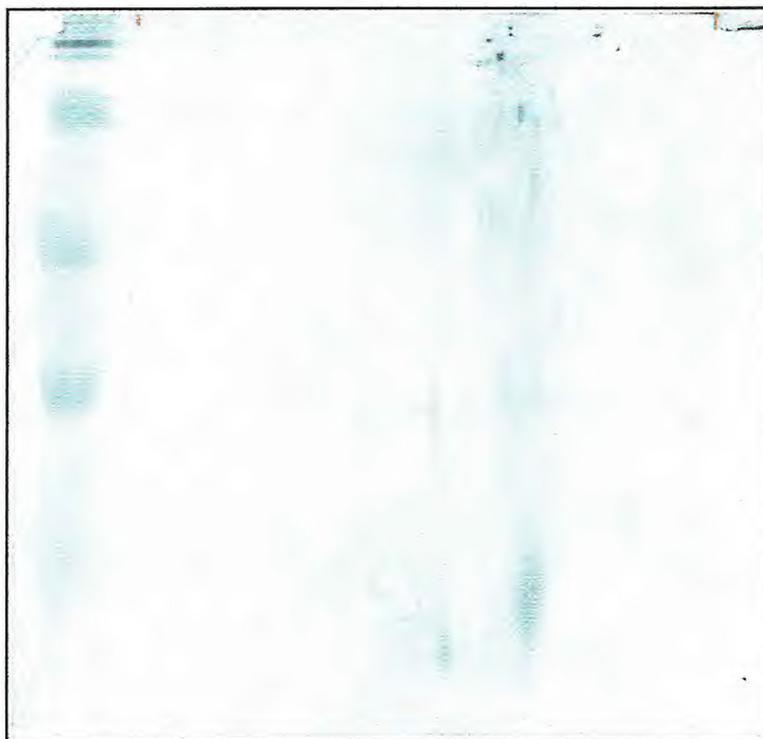


Figura 05. Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha *H. musciformis* com Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β -mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM seguida de precipitação de proteínas com fenol saturado com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 3-10.

Mesmo com baixa resolução, este gel foi editado no programa ImageMaster 2D Platinum 7 onde as massa dos spots foram determinadas baseadas nas proteínas presentes no marcador de massa molecular e o pI determinado com base na identificação do valor de pH no início e fim da tira de pH imobilizado utilizada neste experimento. Vale ressaltar que a tira utilizada neste experimento possui 11 cm e variação de pH de 3 a 10, com as extremidades marcadas em vermelho em cada gel mostrado neste trabalho.

O gel mostrado na Figura 5 foi submetido a uma análise de identificação de proteínas com base no banco de dados de géis 2-DE. O servidor ExpASY

Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>) apresenta uma ferramenta denominada TagIdent que permite identificar as proteínas de um gel experimental (onde cada spot apresenta um dado de pI e massa molecular) com os géis presentes nos bancos de dados. As identificações mostradas no gel editado, representam o pI e a massa molecular de cada spot.

A análise deste gel indicou que o spot de número 82 apresenta pI 8,07304 e massa molecular 147.861 Daltons (Da). Esses parâmetros foram suficientes para indicar que muito provavelmente a proteína presente o spot 82 é uma subunidade beta da RNA polimerase DNA dirigida presente na microalga *Cyanophora paradoxa* (P48120-1) codificada pelo genoma dos plastídios desta microalga. Esta proteína está localizada nos plastídios da alga e possui a função de catalizar a transcrição do DNA em RNA necessitando de quatro moléculas de ribonucleosídeo trifosfato como substrato (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html> - acesso em: 02 nov. 2009).

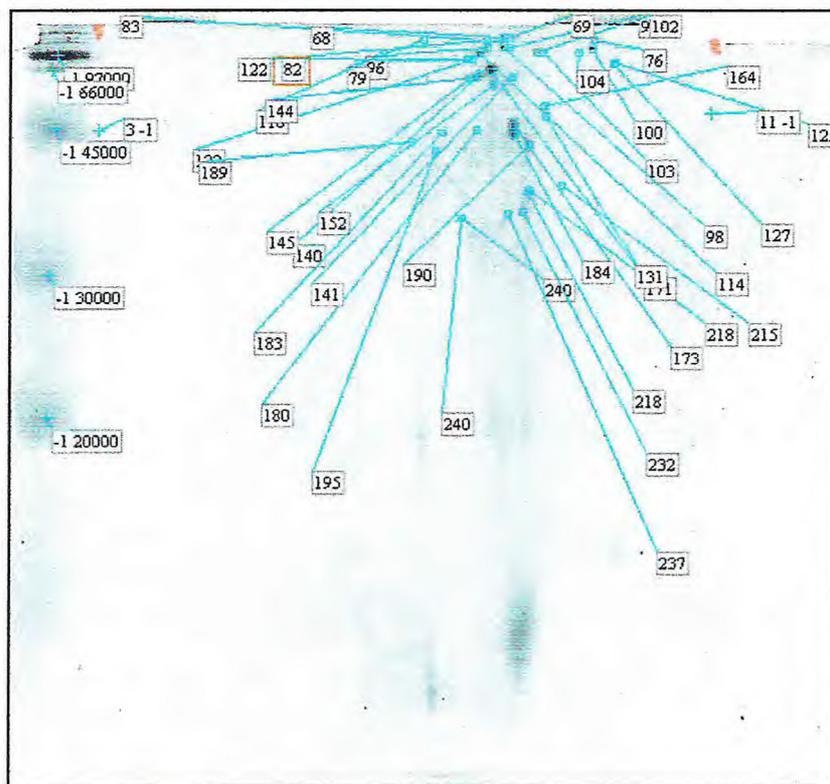


Figura 06. Gel de eletroforese bidimensional (pH imobilizado variando de 3 a 10, com 11 cm) editado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7 apresentando a identificação de spots de proteínas presentes na macroalga vermelha *H. musciformis*.

Com o intuito de melhor visualizar os spots concentrado numa única região de pH, a mesma amostra utilizada no gel anterior foi aplicada numa tira de 11 cm de pH imobilizado variando de pH 4 a 7. Como mostrado na Figura 6 essa tira melhorou a efetividade e aumentou a resolução da distribuição das proteínas no gel, permitindo identificar novas proteínas.

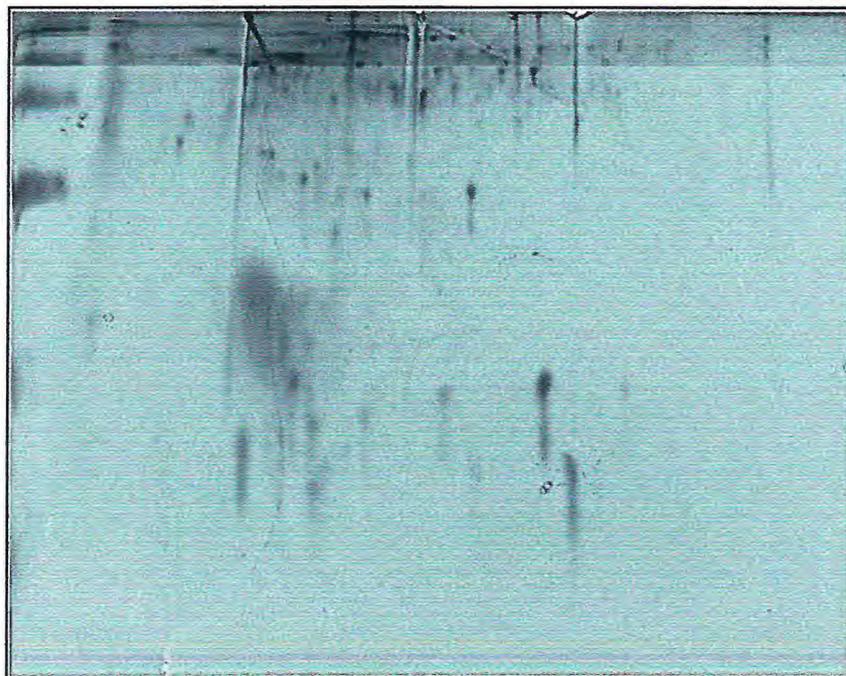


Figura 07. Gel de eletroforese bidimensional de proteínas extraídas da alga marinha vermelha *H. musciformis* com Tris-HCl pH 8,0 50,0 mM, Sacarose 0,7 M, EDTA 10,0 mM, Ácido Ascórbico 4,0 mM, β -mercaptoetanol 0,4 %, Triton X-100 10% 0,2 %, PMSF 1,0 mM seguida de precipitação de proteínas com fenol saturado com Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Neste procedimento foi utilizada tira de pH imobilizado na faixa de pH 4-7 possuindo 11 cm.

Para identificação de novas proteínas, este gel foi editado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7 mostrado na Figura 7. Em seguida, o gel editado foi submetido à análise de bioinformática, programa TagIdent, para identificação de proteínas a partir de bancos de dados de géis de eletroforese bidimensional. O procedimento foi o mesmo utilizado na identificação da proteína anterior.

Felizmente, a resolução desse gel nos permitiu identificar mais duas novas proteínas presentes na alga marinha vermelha *H. musciformis*.

O spot 302 apresenta pI de 5,92 e massa molecular de 92.562 Da. Estes dados indicam que provavelmente esta proteína é uma subunidade beta da adenilato ciclase fotoativada encontrada na microalga *Astasia longa* (Q76L33). Esta proteína atua como um fotorreceptor que está envolvido na catálise da conversão de ATP em AMP cíclico, uma importante molécula sinalizadora em eucariótico (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html> - acesso em: 02 nov. 2009).

Mesmo com estes resultados preliminares, ainda é necessário aperfeiçoar os processos de preparação de uma boa amostra para que possamos obter géis de boa resolução e então maximizar a identificação das proteínas utilizando bancos de dados públicos. Além disso, um gel de boa resolução nos permitirá que spots não identificados possam ser utilizados em análises no espectrômetro de massa. Devido à grande diversidade de tipos de proteína na amostra, o processo de preparação de amostra ideal deve ser determinado empiricamente. Preferencialmente, o melhor procedimento de extração de proteínas deve resultar numa amostra contendo proteínas solúveis, desagregadas, desnaturadas, reduzidas e livre de contaminantes como ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos e sais (GE, 2005).

A eficiência da solubilização depende da escolha do método de ruptura celular, da concentração de proteína, do método de dissolução, da escolha dos detergentes e da composição da solução da amostra. Se qualquer uma dessas etapas não são otimizadas, para uma determinada amostra, a separação pode estar incompleta ou distorcida e a informação pode ser perdida (GE, 2005).

Vale lembrar que estes dados ainda são muito preliminares, mas de grande valia para a continuidade dos estudos relacionados ao proteoma da alga marinha vermelha *H. musciformis*. Estudos futuros utilizando uma abordagem proteômica desta alga submetida a diferentes estresses contribuirão imensamente para a compreensão do desenvolvimento desta alga em condições adversas de sobrevivência, além de fornecer moléculas biologicamente ativas que poderão servir de ferramentas biotecnológicas em diferentes campos da ciência.

4 – CONCLUSÃO

Os experimentos realizados nesta monografia possibilitaram a obtenção de proteínas da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* de maneira efetiva e satisfatória que permitirá a utilização das mesmas para inúmeros estudos de abordagem proteômica utilizando eletroforese bidimensional. Entretanto, ainda há a necessidade de melhoria da otimização das condições de extração das proteínas, bem como, a necessidade de maiores estudos de bioquímica para esse táxon.

5 – REFERÊNCIAS

ALGAEBASE. <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/> - acesso em: 17 nov. 2009.

ANDREAS WEBER P. M.; OESTERHELT C.; GROSS W.; BRAUTIGAM A.; IMBODEN L. A.; KRASSOVSKAYA I.; LINKA N.; TRUCHINA J.; SCHNEIDEREIT J.; VOLL H.; VOLL M.; ZIMMERMANN N.; JAMAI A.; RIEKHOF W. R.; YU B.; GARAVITO R. M.; BENNING C. EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria*. Sulphuraria Reveals Potential for Lipid a Biosynthesis and Unveils the Pathway Of Carbon Export From Rhodoplasts., **Plant Molecular Biology**, 55(1), 17-32, May 2004.

ASCENCIO, F.; CAMPA-CO´RDOVA, A. I.; HERNANDEZ-SAAVEDRA N. Y. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 133. 557–565. 2002.

BARROSO, FRANCISCO ELDER CAVALCANTE; RODRIGUES, JOSÉ ARIÉVILO GURGEL; TORRES, VALESKA MARTINS; SAMPAIO, ALEXANDRE HOLANDA; FARIAS, WLADIMIR RONALD LOBO. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agrônômica**, v.38, n.1, p.58-63, 2007. ISSN 0045-6888

BELIZÁRIO, JOSÉ ERNESTO. Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. **Revista ciência hoje**. Julho de 2000. pág 78-81. Disponível em: <http://ich.unito.com.br/view/309>. Acesso em: 05 out. 2009.

BERCHEZ, F. A. S.; PEREIRA, R. T. L. & KAMIYA, N. F. Culture of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales) on artificial substrates attached to linear ropes. **Hydrobiologia**. 260/261: 415-420. 1993.

BOECKMANN, B.; BAIROCH, A.; APWEILER, R.; BLATTER, M. C.; ESTREICHER, A.; GASTEIGER, E.; MARTIN, M. J.; MICHOU, K.; O'DONOVAN, C.; PHAN, I.; PILBOUT, S.; SCHNEIDER, M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL. **Nucleic Acids Res**. Jan 1;31(1):365-70. 2003.

BOTANY DEPARTMENT MARINE ALGAE OF HAWAII, University of Hawaii, Manoa 2001. Disponível: http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/pdf%20files/hypneamusciformis.pdf - acesso em: 05 nov. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 722: p. 248-254, 1976.

BRAVIN, I. C.; YONESHIGUE VALENTIN, Y.; YOKOYA, N. S. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis*

(Gigartinales, Rhodophyta). 1. obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do agar. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 00, p. 173-180. 2006.

CARDOZO, K. H.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, doi:10.1016/j.cbpc.2006.05.007 (in press). 2007.

CHEN, JIANN-CHU; FU, YU-WIN; HOU, WEN-YING; YEH, SU-TUEN; LI, CHIU-HSIA. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology** 22. 673e685. 2007.

CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GUAJARDO-BARBOSA, C. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) em alimentos para camarón. **Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola**. 19-22 Noviembre, Mérida, Yucatán. 2000.

DAY, J. G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant**, v. 35, p. 127-136, 1999.

EGAS, DAVID A.; WIRTH, MARY J. Fundamentals of Protein Separations: 50 Years of Nanotechnology, and Growing. **Annual Review of Analytical Chemistry**. 1:833-855. 2008.

ExpASY Proteomics Server - TagIdent tool (formerly GuessProt). <http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>. Acesso em: 02 nov. 2009.

FREITAS, A. L. P.; BEZERRA, M. A.; ROCHA, M. L. A. Identificação de proteínas com atividade hemaglutinante da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. **Reunião brasileira de ficologia**. Livro de resumos. Porto de Galinhas, Recife – PE. pág. 146-146. 1999.

GE HEALTHCARE. 2-D Electrophoresis: using immobilized pH gradients - **Principles and Methods**. Printed in Sweden, UK. Manual: 80-6429-60AC. 2005.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and application. **Trends in Biotechnology**, 15: 401-409. 1997.

GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. Disponível em: <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=728&fr=1&sts=&lang=EN>. Acesso em: 05 out. 2009.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. Harmful algal blooms. A global review. In: **MANUAL ON HARMFUL MARINE**

MICROALGAE. IOC MANUALS AND GUIDES, vol. 33. UNESCO, Paris, pp. 1–22. 2003

HOOGLAND, C.; MOSTAGUIR, K.; SANCHEZ, J.-C.; HOCHSTRASSER, D. F.; APPEL, R. D. SWISS-2DPAGE, ten years later. **Proteomics**, 4(8): 2352-2356. 2004.

HOU, W.-Y.; CHEN, J.-C. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology** 19. 127e138. 2005.

HUANG, XUXIONG; ZHOU, HONGQI; ZHANG, HUI. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology** 20. 750e757. 2006

JAMERS, AN; BLUST, Ronny; COEN, Wim De. Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? **Aquatic Toxicology**. vol 92 114–121. 2009.

LEE, R. E. **Phycology**. 3rd ed. Cambridge University Press, United Kingdom, 614p. 1999.

LEHNINGER, ALBERT L.; NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo. Editora Sarvier. ISBN. 8573781661. 2006.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. *Seaweed Ecology and Physiology*. 1st edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1997.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Biotechnology**, 6: 37–52. 2004.

MELO, V. M. M.; MEDEIROS, D. A.; RIOS, F. J. B.; CASTELAR, L. I. M.; CARVALHO, A. F. F. U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, 40(4): 281-284. 1997.

NAGANO, C. S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K. S.; PINTO, V. P. T.; CAVADA, B. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H.; CALVETE, J. J. . HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, v. 14, p. 2167-2176, 2005.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B.; BLOCH-JR, C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and

characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptides Letters**, 9(2):159-66. 2002.

NORZIAH, M. H.; CHING, C. Y. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. **Food Chemistry** 68: 69±76. 2000.

PATNAIK, S.; SAMOCHA, T. M.; DAVIS, D. A.; BULLIS, R. A.; BROWDY, C.L.. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. **USA Aquaculture Nutrition**, 12; 395–401. 2006.

PEIKFLORIDA, VERONICA DY; GOLEZ, NELSON V. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. SEAFDEC, Aquaculture Department, P.O. Box 256, Ibillo, Philippines. 143 393-401. 1996.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 906p. 2001.

REIS, R. P. Variação espaço-temporal de carragenana em *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta - Gigartinales) em bancos naturais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.

REIS, R. P.; CALDEIRA, A. Q.; MIRANDA, A. P. S. and BARROS-BARRETO, M. B. Potencial para maricultura da carragenófita *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales - Rhodophyta) na Ilha da Marambaia, Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta Bot. Bras.** Vol.20, n.4, pp. 763-769. ISSN 0102-3306. 2006.

REIS, R. P.; LEAL, M. C. R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; BELLUCO, F. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). **Acta Bot. Bras.** Vol.17, n.2, pp. 279-286. ISSN 0102-3306. 2003.

REIS, R. P.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Phenology of *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta – Gigartinales) in three populations from Rio de Janeiro state, Brazil. **Botanica Marina** 43: 227-230. 2000.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Editora Artmed, Porto Alegre, 280p. ISBN 85-3630660-2. 2006.

RIVERA, G.; YOONG, F.; RIOFRÍO, G.; REINOSO, B.; HURTADO, F.; MASSUH, P. Inclusión de harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para camarón. I **Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**. 244-252. 2002.

SALIMABI, D. B. Antispasmodic and anti-inflammatory activity of carragenan from *Hypnea musciformis* Wulfen. **Indian J. Pharmacol.**, v. 12, p. 259-261, 1980.

SHAGGER, H.; JAGOW, G. VAN. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, PP 368-379, 1987.

SILVEIRA, E. Brasil começa a entrar na era do proteoma. Publicado em: **O Estado de S. Paulo (GERAL)** em 27 de Janeiro de 2003. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/15225/brasil-comeca-entrar-era-proteoma/>. Acesso em: 05 out. 2009.

SKJERMO, JORUNN; STØRSETH, TROND R.; HANSEN, KARINA; HANDÅ, ALEKSANDER; ØIE, GUNVOR. Evaluation of β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture** 261. 1088–1101. 2006.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **Journal of Applied Phycology**, 16: 245–262. 2004.

SOUSA, MARCELO VALLE DE; WAGNER FONTES, CARLOS ANDRÉ ORNELAS RICART. Análise de proteomas - O despertar da era pós-genômica. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano 2000 pág 12-14. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/analise.pdf>. Acesso em: 05 out. 2009.

STANLEY M.S.; RUTH M. PERRY R.M.; JAMES A. CALLOW J.A. Analysis of expressed sequence tags from the green alga *Ulva linza* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, 41: 1219–1226. 2005.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 627p. 1995.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v.27, p. 139-145, 2004.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. Berlin: Springer-Verlag. 243 p. 1997.

WOOF, J.M.; BURTON, D.R. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. **Nat. Rev. Immunol.** 4:89–99. 2004.

WU, CATHY H.; APWEILER, ROLF; BAIROCH, AMOS; NATALE, DARREN A.; BARKER, WINONA C.; BOECKMANN, BRIGITTE; FERRO, SERENELLA; GASTEIGER, ELISABETH; HUANG, HONGZHAN; LOPEZ, RODRIGO; MAGRANE, MICHELE; MARTIN, MARIA J.; MAZUMDER, RAJA; O'DONOVAN, CLAIRE; REDASCHI, NICOLE; SUZEK, BARIS. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information. **Nucleic Acids Res.** 1; 34 (Database issue): D187–D191. Published by Oxford University Press. 2006.

YARMUSH, MARTIN L.; JAYARAMAN, ARUL. Advances in proteomic technologies. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 4:349–73 - doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153443. 2002.

ZHU, HENG; BILGIN, METIN; SNYDER, MICHAEL. Proteomics. **Annual Review of Biochemistry**. 72:783–812. doi: 10.1146. 2003.