

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICABILIDADE  
BIOTECNOLÓGICA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERMELHA *GRACILARIA ORNATA* (SCHNETER)

YÁSKARA F. M. MARQUES LEITE

FORTALEZA - CE

2003

N. Cham.: T 574.192 L556p

Autor: Leite, Yáskara Fabíola de M

Título: Purificação, caracterização e



13827509

Ac. 64635

BCT CAT

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICABILIDADE  
BIOTECNOLÓGICA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERMELHA *GRACILARIA ORNATA* (SCHNETER)**

**YÁSKARA F. M. MARQUES LEITE**

**FORTALEZA-CE**

**2003**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICABILIDADE  
BIOTECNOLÓGICA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERMELHA *GRACILARIA ORNATA* (SCHNETER)**

**YÁSKARA F.M.MARQUES LEITE**

---

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA, COMO PREREQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA-CE**

**2003**

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)

---

- L556p Leite, Yáskara F. M. Marques.  
Purificação, caracterização e aplicabilidade biotecnológica da lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* (Schneter) / Yáskara F. M. Marques Leite. – 2003.  
127 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2003.  
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

---

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

YÁSKARA F. M. MARQUES LEITE

TESE APROVADA EM: 27/02/2003

---

Dra. Norma Maria Barros Benevides  
Orientadora da tese  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr. Fernando Monteiro de Paula  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr. Thalles Barbosa Granjeiro  
Departamento de Biologia  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Tereza Neuma de Castro Dantas  
Departamento de Química  
Universidade Federal do Rio Grande  
Norte do

---

Edda Lisboa Leite  
Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande  
Norte do

*À Deus,  
Minha filha Marcela,  
Meu marido Marcílio,  
meus pais Tota e Geraldinha e  
minhas irmãs Carla e Socorrinha*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Norma Maria Barros Benevides, por toda sua compreensão, apoio, incentivo, amizade e confiança. Agradeço toda a sua ajuda durante esses quatro anos que passei em seu laboratório, sempre mostrando-se disposta em ensinar e orientar, me proporcionando um crescimento científico bastante valioso.

Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro de Paula, pelo apoio e incentivo à minha pessoa desde à minha chegada no Departamento, sempre se mostrando além de um excelente professor, um grande amigo.

Aos Professores Drs. Maurício Pereira de Sales e Edda Lisboa Leite do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela possibilidade proporcionada de terem posto à disposição a estrutura dos seus laboratórios para o desenvolvimento de parte do meu trabalho, bem como pelos ensinamentos e sugestões no desenvolvimento do mesmo. Agradeço também às novas amigas Carla, Valquíria e Luciana pela colaboração na execução da análise da identificação de carboidratos realizada nesta instituição.

Aos professores Drs. Thalles Barbosa Granjeiro, Edda Lisboa Leite, Fernando de Paula Monteiro e Tereza Neuma de Castro Dantas por terem aceitado fazer parte da banca julgadora desta Tese e pelas suas sugestões valiosas, além da atenção prestada.

Aos amigos Éder e Daniel pela colaboração na realização dos experimentos da avaliação da atividade inseticida das frações protéicas de *G. ornata* e à Érico pelo acompanhamento na execução da eletroforese bidimensional da lectina de *G. ornata*.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial os professores Drs. Renato de Azevedo Moreira e Ilka Maria Vasconcelos que contribuíram para minha formação profissional e me possibilitaram trânsito livre em todos os laboratório.

Aos amigos Micheline, Raimundo, Rômulo Júnior, Rodrigo, Noélia, Edna Nascimento, Edna Pereira, Cris, Vandinha, Maria, Marjorie, Fábio, Elis, Dany, Lucinha, Jane, Cláudio, Verônica, Luiziete, Sâmia, Rúbia, Bartolomeu e Fabrício.

Em especial às amigas Lídia, Luana e mesmo apesar da distância à Everlane, pelo companheirismo e fidelidade, sempre procurando me ajudar em todos os momentos. Agradeço por ter tido a sorte de contar com amigas tão maravilhosas.

Expresso com muita satisfação o quanto é fundamental para a minha formação profissional compor o quadro docente da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN). Agradeço especialmente aos professores Pe. Sátiro de Cavalcante Dantas, José Walter da Fonseca, Lúcio Ney de Sousa e Maria das Neves Gurgel de Oliveira Castro que confiaram no meu desempenho profissional.

À minha amiga Joana D'Arck, pelo apoio em várias etapas do meu trabalho desde o início até a sua conclusão. Sua ajuda me ajudou em muito na realização deste trabalho no prazo correto.

A Deus, aos meus pais Tota e Geraldinha, aos quais devo a minha vida, a conclusão deste trabalho e o meu progresso, esperando estar lhes retribuindo o carinho e amizade sinceros.

Às minha irmãs Carla e Socorrinha, que sempre estiveram presentes na minha trajetória.

E de modo **MUITO ESPECIAL** à Marcelinha minha filha e à Marcílio meu marido pela compreensão nos anos em que fomos privados do convívio diário.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	x
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	xii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u> .....	xiii
<u>RESUMO</u> .....	xiv
<u>ABSTRACT</u> .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Lectinas .....	1
1.1.1. Considerações Gerais .....	1
1.2. Lectinas Vegetais .....	4
1.2.1. Características Químicas e Físico-Químicas.....	4
1.2.2. Papel Fisiológico.....	6
1.2.3. Propriedades Biológicas .....	8
1.2.4. Propriedades Físico-Químicas.....	12
1.3.5. Potencial Biotecnológico.....	17
1.3. Lectinas de Algas.....	15
1.3.1. Ocorrência de Lectinas em Algas Marinhas.....	19
1.3.2. Isolamento e Purificação.....	25
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. Gerais .....	27
2.2. Específicos .....	27
3. MATERIAIS .....	28
3.1. Algas Marinhas .....	28
3.2. Animais de Experimentação.....	28

3.3. Hemácias .....	28
3.4. Reagentes Químicos .....	28
4. MÉTODOS .....	30
4.1. Análise Elementar .....	30
4.1.1. Determinação de Cinzas .....	30
4.1.2. Determinação de Umidade .....	30
4.1.3. Determinação de Nitrogênio Total .....	31
4.1.4. Determinação de Lipídio Total .....	31
4.1.5. Determinação de Fibra Bruta .....	32
4.1.6. Determinação de Vitamina C .....	33
4.1.7. Determinação de Cálcio .....	33
4.1.8. Determinação de Fósforo .....	34
4.1.9. Determinação de Ferro .....	35
4.1.10. Determinação de Magnésio .....	35
4.1.11. Determinação de Valor Calórico Total .....	36
4.2. Extração de Proteínas da Alga <i>G.ornata</i> .....	36
4.2.1. Preparação do Extrato Total .....	36
4.2.2. Dosagem de Proteínas Solúveis .....	36
4.3. Detecção e Quantificação de Componentes Bioativos .....	37
4.3.1. Determinação da Atividade Hemaglutinante .....	37
4.3.2. Inibidor de Tripsina .....	37
4.3.3. Urease .....	38
4.3.4. Atividade Tóxica da Lectina .....	38
4.4. Purificação da Lectina de <i>G.ornata</i> .....	39
4.4.1. Precipitação das Proteínas do Extrato Total com Sulfato de Amônio .....	39
4.4.2. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose .....	39
4.4.3. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose-4B-Mucina.....	41
4.5. Caracterização da Lectina de <i>G. ornata</i> .....	42
4.5.1. Termoestabilidade da Atividade Hemaglutinante .....	42
4.5.2. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante .....	43

4.5.3. Efeitos de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante .....	43
4.5.4. Espectro de Absorção .....	44
4.5.5. Composição de Aminoácidos .....	44
4.5.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e $\beta$ - mercaptoetanol.....	45
4.5.7. Dosagem de Carboidratos Solúveis .....	45
4.5.8. Análise da Identificação de Carboidratos em Sistema Descendente de Papel .	46
4.5.9. Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 .....	46
4.5.10. Eletroforese Bidimensional da lectina de <i>G. ornata</i> .....	46
4.6. Avaliação Histológica dos Efeitos da Lectina nos Órgãos de Camundongos .....	47
4.7. Avaliação da Atividade Inseticida .....	48
4.7.1. Avaliação da Atividade Inseticida do Extrato Bruto, F0/70 e PII-DEAE, da alga <i>G.ornata</i> .....	48
4.8. Análise Estatística .....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	51
5.1. Caracterização da Alga Marinha <i>G.ornata</i> .....	51
5.2. Composição Química .....	51
5.3. Atividade Hemaglutinante .....	54
5.4. Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante .....	54
5.5. Termoestabilidade da Atividade Hemaglutinante .....	56
5.6. Purificação da Lectina .....	56
5.6.1 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose.....	56
5.6.2. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B-Mucina.....	59
5.7. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante.....	59
5.8. Caracterização Físico-Química da Lectina .....	62
5.8.1. Espectro de Absorção no ultra violeta da Lectina de <i>G.ornata</i> .....	62
5.8.2. Massa Molecular por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ - mercaptoetanol .....	62

5.8.3. Determinação da Massa Molecular da Lectina por Cromatografia em Gel em Coluna de Sephadex G-100 .....	66
5.8.4. Composição de Aminoácidos da Lectina de <i>G.ornata</i> .....	66
5.8.5. Ponto Isoelétrico por Eletroforese Bidimensional .....	66
5.8.6. Teor de Carboidratos .....	70
5.8.7. Análise de Carboidratos por Cromatografia em Sistema Descendente de Papel .....	70
5.9. Inibidor de Tripsina .....	73
5.10. Urease .....	73
5.11. Avaliação Histopatológica da Toxicidade da Lectina de <i>G.ornata</i> .....	73
5.12. Avaliação da Atividade Inseticida das Frações (Extrato Bruto, F0/70 e PII-DEAE) da Alga Marinha <i>G.ornata</i> .....	74
6. CONCLUSÕES .....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
8. ANEXOS .....	110

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
01- Esquema de extração e purificação da lectina presente na alga marinha <i>G. ornata</i> .	40
02- Avaliação da Atividade inseticida das frações (extrato bruto, F0/70, PII-DEAE) para <i>C. maculatus</i> (gorgulho) .....	50
03- Alga marinha vermelha <i>G.ornata</i> Schneter .....	52
04- Termoestabilidade da atividade hemaglutinante da alga <i>G.ornata</i> .....	57
05- Cromatografia de troca iônica da F0/70 em coluna de DEAE - Celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5 .....	58
06- Purificação da lectina de <i>G.ornata</i> por cromatografia de afinidade em coluna de Sephrose 4B-Mucina .....	60
07- Espectro de Absorção do PII-Mucina( lectina) de <i>G.ornata</i> .....	64
08- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol.....	65
09- Massa molecular da lectina de <i>G.ornata</i> por filtração em gel de Sephadex G-100 .	67
10- Eletroforese Bidimensional da lectina de <i>G.ornata</i> .....	71
11- Cromatografia em sistema descendente de papel .....	72
12- Fotomicrografia de corte histológico do estômago de camundongo.....	75
13- Fotomicrografia de corte histológico do intestino de camundongo.....	76
14- Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongo.....	77
15- Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongo.....	78
16- Efeito das frações (Extrato bruto, F0/70 e PII – DEAE ) obtidos da alga <i>G.</i> <i>ornata</i> sobre a emergência de larvas de <i>C. maculatus</i> .....	80
17- Efeito das frações (Extrato bruto, F0/70 e PII – DEAE ) obtidos da alga <i>G. ornata</i> sobre a sobrevivência larval de <i>C. maculatus</i> .....	81
18- Efeito das frações (Extrato bruto, F0/70 e PII – DEAE ) obtidos da alga <i>G. ornata</i> sobre o peso médio dos insetos adultos de <i>C. maculatus</i> .....	82
19- Efeito das frações (Extrato bruto, F0/70 e PII – DEAE ) obtidos da alga <i>G. ornata</i> sobre o tempo médio de desenvolvimento das larvas de <i>C. maculatus</i> . .....	83

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
01- Análise elementar da alga marinha <i>G. ornata</i> .....	53
02- Atividade hemaglutinante da F0/70 de <i>G. ornata</i> por diferentes eritrócitos tratados enzimaticamente com tripsina e bromelaína.....	55
03- Inibição da atividade hemaglutinante presente na lectina de <i>G. ornata</i> por açúcares simples e glicoproteínas.....	63
04- Composição em aminoácidos da lectina de <i>G. ornata</i> .....	68
05- Composição em aminoácidos da lectina de <i>G. ornata</i> , <i>G. caudata</i> <i>Caulerpa cupressoides</i> .....	69

## ABREVIACÕES E DEFINIÇÕES

BAPNA-  $\alpha$ -N-Benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida

BSA- Albumina sérica bovina.

DEAE- Dietil-aminoetil.

DL<sub>50</sub>- Quantidade da substância tóxica (proteína - g / Kg de peso corpóreo) capaz de causar convulsão e morte em 50% dos animais testados

DTT- Ditionitroetil

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético.

HE- Hematoxilina - Eosina

IPG- Gel de poliacrilamida com gradiente de pH

iv.-Intravenosa

KDa- Quilo -Daltons (unidade de medição de massa molecular).

MW - Massa molecular.

PAGE-SDS- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio.

pI- Ponto isoelétrico

SBTi- Inibidor de tripsina tipo Kunitz de soja

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio.

Tris- Tris(Hidroximetil)-aminometano.

TB - Tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5 .

UH/mL- Unidade de hemaglutinação por mL. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%.

F0/70 - Fração protéica obtida por precipitação com sulfato de amônio na concentração de 70%.

PII-DEAE – 2º pico protéico obtido na cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose.

## RESUMO

A lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* foi purificada e caracterizada a partir do extrato bruto em tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5. Dentre os eritrócitos testados (humanos do sistema ABO, coelho e galinha), ela aglutinou preferencialmente os de coelho tratados com tripsina. A atividade hemaglutinante revelou que a lectina não é dependente de cátions divalentes e foi inibida pelas glicoproteínas mucina de porco, asialofetúina, apotransferina, tiroglobulina de porco e de boi. O procedimento de purificação foi conduzido por precipitação protéica do extrato bruto com sulfato de amônio até 70% de saturação (F0/70), seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE - Celulose e de afinidade em coluna de Sepharose 4B- mucina. A lectina de *G. ornata* é uma glicoproteína que apresenta em sua estrutura 2,97% do carboidrato glucose, sendo sua massa molecular aparente de 17,36 KDa obtida por filtração em gel de Sephadex G-100. No procedimento de eletroforese realizado em condições desnaturantes (PAGE-SDS) na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, revelou que a lectina é monomérica, com massa molecular de 17,00 KDa. A eletroforese bidimensional revelou a presença de uma única banda protéica na faixa de pH com valor de pI de 5,4. A análise da composição de aminoácidos da lectina purificada mostrou uma predominância dos aminoácidos Glx, Asx, Ser, Gly, Ala e Cys, sendo a alta percentagem obtida para o aminoácido cisteína uma característica não usual para lectinas de algas marinhas e de vegetais superiores. A avaliação histopatológica dos tecidos de camundongos após a aplicação da lectina por via iv., revelou alterações microscópicas no intestino, fígado, estômago e coração. A análise da atividade inseticida das frações protéicas (extrato bruto, F0/70 e PII-DEAE), mostrou que a emergência das larvas de *C. maculatus* foi inibida por todas as frações avaliadas. Entretanto, as frações EB (2,5%) e F0/70 (1%) inibiram consideravelmente a sobrevivência larval.

## ABSTRACT

The lectin obtained from the marine alga *Gracilaria ornata* was purified and characterized by extraction of soluble proteins (crude extract) in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Among the analysed erythrocytes (human of ABO system, rabbit and chicken) it was shown that the lectin preferentially agglutinated rabbit treated with trypsin enzyme. The haemagglutinating activity revealed that the lectin wasn't dependent on divalent cation  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  and was shown to be inhibited by the glycoprotein porcine stomach mucin, asialofetuin, apotransferrin, porcine and bovine tiroglobulin. The purification procedure was realized by precipitation of the crude extract with 70% saturation ammonium sulfate (F0/70) followed by ion-exchange chromatography on DEAE-Celulose and affinity chromatography on Mucin-4B-Sepharose. The carbohydrate content of 2.97% of glucose carbohydrate suggest that the lectin under study is a glycoprotein. It was shown an apparent molecular mass of 17.36 KDa by gel filtration on Sephadex G-100 column. Electrophoresis procedures observed under denaturant conditions (SDS-PAGE) with  $\beta$ -mercaptoethanol, the lectin exhibited a single proteic band. The isoelectric focusing revealed the presence of a simple acidic protein band with pI of 5.4. The analysis of the amino acid composition of the purified lectin showed a predominance of amino acids Asx, Glx, Ser, Glu, Ala e Cys, being the high percent obtained to amino acid cistein, a non usual characteristic to lectins of sea algae and superior plants. The histopathologic evaluation of mice tissues after application of the lectin for via iv., revealed microscopic alterations in the intestine, liver, heart and stomach. The analysis of the insecticide activity of the proteic fractions (crude extract, F0/70 and PII-DEAE), it showed that the energy of the larvae of *C. maculatus* was inhibited by all the appraised fractions. Meantime, the fractions EB(2.5%) and F0/70(15) inhibited the larval survival considerably.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Lectinas

### 1.1.1. Considerações Gerais

As lectinas foram descobertas em 1888 por Hermann Stillmark, trabalhando na Universidade Tartu, na Estônia. Stillmark observou que extratos tóxicos de mamona (*Ricinus communis*) aglutinavam eritrócitos. Além disso, observou-se que o extrato, que ele chamou ricina, reagiu diferentemente com eritrócitos de diferentes animais, evidenciando assim a capacidade desses extratos de expressar seletividade ou especificidade (Rogers, 1994).

Posteriormente, verificou-se que extratos de plantas não tóxicas, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a ervilha (*Pisum sativum*) e a lentilha (*Lens culinaris*), também causavam aglutinação de eritrócitos (Landsteiner & Raubitschek, 1907).

Sumner & Howell (1936) mostraram que a hemaglutinação produzida pela Concanavalina A (Con A) da jaca *Canavalia ensiformis* poderia ser bloqueada ou inibida pelo açúcar da cana (sacarose). Este estudo mostrou-se de fundamental importância no estudo de lectinas, pois os autores sugeriram que a aglutinação observada para a Con A seria devido a uma interação entre a lectina e os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, identificando pela primeira vez a principal característica das lectinas, ou seja a afinidade por açúcares.

Até 1935, acreditava-se que lectinas não apresentavam especificidade para hemácias humanas e que o mesmo grau de aglutinação seria observado para os diferentes grupos sanguíneos (do sistema ABO). Entretanto, observou-se que a aglutinina da enguia japonesa, *Asnguilla japonica*, aglutinava preferencialmente eritrócitos do grupo O e que extratos de sementes de *Vicia cracca*, mostraram seletividade para hemácias do grupo sanguíneo A (Renkonen, 1948).

Boyd & Reguera (1949) observaram especificidade para o grupo sanguíneo A em lectinas do feijão lima, *Phaseolus limensis* e, mais tarde, Boyd & Shapleigh (1954) utilizaram pela primeira vez o termo lectina, para descrever a atividade de aglutininas.

Goldstein *et al.* (1980), definiu as lectinas como proteínas de origem não imune, capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos e de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoconjugados.

Mais recentemente, as lectinas foram definidas como proteínas que possuem, pelo menos, um domínio não catalítico que se liga de maneira reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1995).

Cummings (1997), seguindo a mesma idéia empregada por Peumans & Van Damme (1995), inseriu um caráter restritivo, ao mencionar que anticorpos ou proteínas com atividade enzimática voltada a carboidratos não podem ser considerados como lectinas.

Dessa forma, as lectinas (do latim, *legere*, selecionar ou escolher) são proteínas que ligam mono ou oligossacarídeos específica e reversivelmente, mas são destituídas de atividade catalítica e, diferentemente dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (Sharon & Lis, 2001).

As lectinas foram agrupadas em três grupos por Peumans & Van Damme (1995), onde: **Merolectinas** são proteínas de pequeno tamanho e que possuem um único domínio ligante a carboidrato sendo, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.; **Hololectinas** consistem de, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar. As hololectinas são usualmente designadas como moléculas di ou multivalentes, capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados e, atualmente, representam um dos grupos mais estudados de lectinas; **Quimerolectinas** são moléculas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos, associado(s) a outro domínio distinto, bem definido e que possui atividade enzimática ou outra biológica qualquer e sua ação independe do domínio ligante a carboidrato. Como exemplos desse grupo, podemos citar as quitinases pertencentes à classe I e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2.

Posteriormente, Van Damme *et al.* (1998) sugeriram a existência de um quarto grupo, o das superlectinas, que seriam proteínas de natureza quimérica que consistem de, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, que são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos. Um exemplo da ocorrência de superlectina pode ser

Yáskara F.M.Marques Leite

observado na lectina isolada do bulbo de tulipa, que consiste de uma molécula que apresenta um domínio ligante a manose e um domínio ligante a N-acetilgalactosamina.

Do ponto de vista estrutural, as lectinas formam um grupo de proteínas heterogêneo, pois variam quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular, entretanto, apresentam em comum a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados (Sharon & Lis, 1998). As estratégias usadas pelas lectinas para gerar sua especificidade por carboidratos incluem a formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água, modificações pós-traducionais e oligomerizações (Vijayan & Chandra, 1999).

Atualmente, lectinas são o alvo de muitos estudos, por atribuir-se a elas, devido às suas propriedades de reconhecimento, ação determinante em diversos processos biológicos. Estes incluem a liberação de glicoproteínas do sistema circulatório, o controle do tráfego intracelular de glicoproteínas, a adesão de agentes infecciosos em células hospedeiras, o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios, bem como as interações celulares no sistema imune, em malignidades e metástases (Sharon & Lis, 2001).

Embora tenham sido inicialmente detectadas em plantas, as lectinas são encontradas em muitos organismos, desde vírus e bactérias até animais vertebrados e invertebrados (Lis & Sharon, 1998).

Peumans & Van Damme (1998) estudaram os relatos de ocorrência de lectinas em plantas superiores e observaram que estas proteínas já haviam sido detectadas em cerca de 500 espécies. Muitas das lectinas vegetais são encontradas nas sementes, embora sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetativos, como casca, folhas, caule, frutos e raízes. As lectinas de sementes de leguminosas representam o grupo destas proteínas vegetais mais bem estudado, com mais de 100 representantes isolados e caracterizados (Sharon & Lis, 2001).

Em bactérias, protozoários e vírus, a ocorrência de lectinas parece desempenhar o papel de auxiliar e/ou promover a adesão destes microorganismos às estruturas celulares onde são encontrados (Sharon & Lis, 1998). Em trabalho desenvolvido por Glick *et al.* (1991) na infecção causada pelo vírus influenza, foi constatado que o processo de adesão viral à célula alvo é mediado por uma lectina que se liga a resíduos de ácido siálico presentes na face externa da superfície celular.

As lectinas de animais, geralmente de vertebrados, variam marcadamente em sua estrutura. Sua atividade de reconhecimento a carboidratos reside freqüentemente em um segmento polipeptídico limitado, denominado de domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) (Sharon & Lis, 2001).

Ainda nos vertebrados distinguem-se duas categorias de lectinas: as solúveis, que são extraídas dos tecidos e as lectinas de membrana, que requerem o uso de detergentes para sua solubilização, embora algumas possam permanecer solúveis na ausência dos mesmos (Liener *et al.*, 1986). Destacam-se as lectinas dos tecidos do coração e pulmão de bezerro (De Waard *et al.*, 1976), do cordão umbilical humano (Kaneko *et al.*, 1990), do veneno de cobras (Gartner & Ogilvie, 1984), de ovos de peixes teleósteos (Krajhanzl *et al.*, 1985) e do fígado de alguns outros animais como rato, galinha e coelho.

Nos invertebrados, foram detectadas lectinas em várias classes e subclasses examinadas, como caranguejos (Ravidranath & Cooper, 1984), moluscos (Hammarstrom, 1972) e esponjas (Bretting *et al.*, 1990).

## 1.2. Lectinas Vegetais

### 1.2.1. Características Químicas e Físico-Químicas

A maioria das lectinas vegetais já estudadas é de natureza glicoprotéica, sendo que algumas delas podem apresentar, em sua constituição, até 50% de açúcar, como é o caso da lectina da batata *Solanum tuberosum* (Allen *et al.*, 1978) e da aglutinina isolada do feijão de inhame *Sphenostyles stenocarpa*, que é uma glicoproteína tetramérica (Machuka *et al.*, 1999).

Entretanto, a lectina do gérmen do trigo, (WGA), a Concanavalina A (Con A) e a lectina da ervilha *Pisum sativum* (PSA), são exemplos de aglutininas que não possuem carboidratos em suas estruturas (Lis & Sharon, 1998).

As características físico-químicas das lectinas são bastante heterogêneas, se avaliadas com relação às suas propriedades moleculares. Suas massas moleculares podem variar desde 3,5 KDa para a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (Ainouz *et al.*, 1995), até 480 KDa para a lectina de rizomas de *Aegopodium podagraria* (Peumans

& Van Damme, 1995). Suas subunidades também variam em número, geralmente de duas a quatro, mas podendo chegar a valores muito maiores, como no caso da lectina de *Limulus polyphenus* que possui 20 subunidades (Sharon & Lis, 1987). A lectina do feijão de inhame *Sphenostyles stenocarpa* possui uma massa molecular em torno de 122 KDa e é composta de quatro subunidades com massas moleculares de aproximadamente 27, 29, 32 e 34 KDa, respectivamente (Machuka *et al.*, 1999).

De acordo com as diferentes especificidades por açúcares apresentadas pelas lectinas, foi sugerido por Makela (1957) que elas fossem classificadas em quatro grupos, conforme a configuração relativa dos átomos de carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> no anel piranosídico do açúcar responsável pela ligação específica. Assim, ao grupo I pertencem as lectinas específicas por L-fucose; ao grupo II aquelas que se ligam especificamente a D-galactose e N-acetilgalactosamina; ao grupo III incluem-se as específicas por D-glicose e D-manose e ao grupo IV aquelas capazes de se ligar a D-idose, D-gulose, L-glicose e L-xilose.

O descobrimento de lectinas que eram fortemente inibidas pelos açúcares N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilneuramínico levou ao surgimento de dois novos grupos, complementando a classificação proposta por Makela (WU *et al.*, 1988; Moreira *et al.* 1991).

A maioria das lectinas, em especial as de vegetais, requer a presença de íons metálicos divalentes (Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup>) para exercerem suas atividades biológicas. Segundo Doyle *et al.* (1976) estes íons interagem em sítios específicos da estrutura protéica, conferindo um alto grau de estabilidade estrutural e protegendo-a contra a inativação pelo calor. Blumberg & Tal (1976) citam ainda estes íons como os responsáveis pela grande resistência das lectinas à hidrólise enzimática. Os sítios de ligação a metais e a carboidratos estão intimamente relacionados. O sítio de ligação a carboidratos da Con A, um por cada subunidade, está localizado em uma depressão na superfície da proteína e distante 10 a 14 ângstrons do íon Mn<sup>+2</sup> (Loris *et al.*, 1998).

Além dos sítios para metais e carboidratos, as lectinas apresentam ainda uma cavidade hidrofóbica formada por aminoácidos hidrofóbicos. Esta região deve conferir a lectina a capacidade de interagir com um grande número de moléculas diferentes dos carboidratos, permitindo a estas desempenhar outro papel, ainda desconhecido. Os sítios hidrofóbicos têm sido mais freqüentemente estudados em lectinas de leguminosas. Este sítio parece

Yáskara F.M.Marques Leite

exercer enorme influência na manutenção da estrutura nativa da maioria das lectinas (Barondes, 1988) e amplia a natureza dos ligantes com os quais as lectinas podem interagir. Durante o processo evolutivo estes sítios parecem ter sofrido poucas alterações, como no caso da Con A e das lectinas de *Ulex europeus* (UEA I e II), onde as sequências dos aminoácidos do sítio hidrofóbico diferem apenas no aminoácido Val<sup>179</sup> que é substituído por Ile em *U. europeus*. Tal conservação também foi observada nas demais lectinas já sequenciadas (Konami *et al.*, 1991), com exceção das lectinas de WGA (lectina de germe de trigo) e RCA (aglutinina de *Ricinus comunis*).

Em sua composição de aminoácidos, as lectinas de plantas, de modo geral, apresentam grande heterogeneidade, sendo geralmente ricas em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos, perfazendo até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres em aminoácidos sulfurados (Lis & Sharon, 1981). As lectinas da família das leguminosas possuem elevados teores de aminoácidos básicos e hidroxilados, teores reduzidos ou são completamente ausentes de aminoácidos sulfurados (Moreira, 1998). As lectinas de Gramíneas possuem um alto conteúdo de glicina (23%) e cisteína (12%), estando os resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfeto (Stinissen & Peumans, 1985). As lectinas de Solanáceas são ricas em hidroxiprolina, serina, glicina e cisteína (Showalter, 1993).

### 1.2.2. Papel Fisiológico

Embora sejam largamente estudadas com relação às suas potencialidades biológicas, o papel fisiológico das lectinas é ainda uma incógnita para a ciência. Essas proteínas partilham suas características com muitas outras macromoléculas, as quais já estão completamente caracterizadas porém suas funções fisiológicas não estão bem esclarecidas (Rüdiger, 1998).

Uma vez que em algumas sementes de plantas as lectinas representam a principal fração de proteínas solúveis, tem sido sugerido que essas moléculas poderiam funcionar como substâncias de reserva (Van Damme *et al.* 1996; Van Damme *et al.*, 1998; Peumans & Van Damme, 1995). Obviamente, as lectinas são degradadas durante a germinação, contribuindo assim para o “pool” nutricional. Por outro lado, tem sido observado que a

degradação das lectinas não segue o padrão geral das proteínas de reserva típicas e que elas persistem por um período bem maior durante a germinação das sementes do que outras proteínas (Moreira & Cavada, 1984; Boisseau *et al.*, 1985).

Moreira *et al.* (1993) estudaram a evolução da lectina de *Canavalia brasiliensis* durante a maturação da semente e constataram que essa proteína apareceu alguns dias depois da maioria das proteínas de massa molecular elevada. Um precursor da lectina, que se liga a povidextrans foi detectado e este precursor possuía várias propriedades da lectina, porém com uma atividade hemaglutinante extremamente baixa.

Oliveira *et al.* (1998) estudaram a mobilização das proteínas e da lectina de *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* durante a germinação da semente e crescimento da plântula no escuro e verificaram que há um retardamento na mobilização da aglutinina em comparação com a de outras proteínas da semente, sugerindo que a hemaglutinina observada não é uma mera proteína de reserva e deve desempenhar um papel crucial durante a germinação e estabelecimento da planta.

A função biológica de lectinas vinha sendo proposta há algum tempo em proporcionar a proteção da planta ou de suas sementes de ataques por microorganismos, insetos e/ou predadores (Rüdiger, 1998). Vários estudos têm sido voltados a este ponto, em particular aqueles tendo em vista a aplicação de lectinas como ferramentas de diagnóstico em microbiologia ou como protetoras expressadas em plantas transgênicas (Chrispeels & Raikhel, 1991; Gatehouse *et al.*, 1998; Slifkin, 1994).

Lectinas que são tóxicas para insetos em experimentos nutricionais têm sido prosperamente usadas para construir plantas transgênicas hábeis em prejudicar a reprodução e o desenvolvimento de insetos que se alimentam delas. O foco dos estudos tem sido direcionado para lectinas que reconhecem manose ou N-acetilglucosamina, como é o caso da lectina de *Galanthus nivalis* e da aglutinina do germen do trigo (WGA), respectivamente (Rüdiger, 1998).

A WGA está localizada na raiz, porção da planta que interage intimamente com o solo (Raikhel & Lerner, 1992). Embora uma inibição direta do crescimento do fungo pela WGA não aconteça, um processo de reconhecimento que precede a infecção pode ocorrer. Além disso, como os níveis da lectina na planta são aumentados em decorrência de estresses fúngico e/ou osmótico (Cammue *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1996), WGA pode ser

considerada como uma resposta a várias formas de estresse. Um outro papel para a lectina pode ser a proteção contra predadores animais, visto que a WGA inibe o desenvolvimento de insetos (Murdock *et al.*, 1990). Uma proteína que reage em associação com WGA é induzida após a infecção das raízes da aveia por nematóides (Oka *et al.*, 1997). Esta proteína assemelha-se a quitinases de plantas em sua seqüência de aminoácidos e acredita-se que esteja envolvida na tradução do sinal após a invasão da planta pelo patógeno (Rüdiger, 1998).

Durante muitos anos, a interação entre lectinas de plantas e bactérias tem atraído muita atenção. Isso se deve, principalmente, devido a possível participação dessas proteínas nas relações simbióticas entre plantas e bactérias. Inicialmente, esta idéia surgiu devido ao fato das leguminosas geralmente serem ricas em lectinas de sementes e, por outro lado, a mesma família é conhecida por realizar simbiose com um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio, o *Rhizobia* (Rüdiger, 1998).

Até o presente, não está claro se o inter-relacionamento entre lectinas e fatores de nodulação é direto ou indireto. De qualquer forma, observou-se que a introdução do gene para a lectina da ervilha em raízes de leguminosas trevo habilitou a planta hospedeira a reconhecer o fator de nodulação do *Rhizobium leguminosarum*, específico para ervilha sem necessidade de contato direto com a bactéria (Diaz *et al.*, 1995).

O papel biológico destas proteínas tem sido alvo de estudos já há muitas décadas. Esta situação é totalmente compreensível devido a enorme quantidade de interações nas quais as lectinas podem engajar-se. É muito improvável que um papel fisiológico geral para todas as lectinas possa ser encontrado. Mesmo lectinas que são muito similares em suas estruturas primárias e conformações podem servir a diferentes propósitos. Provavelmente, as lectinas são empregadas pela natureza em várias funções, dependentes de sua localização, especificidade e do momento de sua síntese pela planta.

### 1.2.3. Propriedades Biológicas

Estudos realizados entre os anos de 1960 e 1970 revelaram que as lectinas exibiam propriedades outras, além da capacidade de aglutinar eritrócitos. A capacidade das lectinas de interagir especificamente com células justifica o emprego destas para determinação dos

Yáskara F.M.Marques Leite

grupos sanguíneos humanos (ABO) e no estudo de receptores químicos estruturais presentes nas hemácias destes grupos.

Lectinas de plantas superiores foram utilizadas na tipagem de grupos sanguíneos como a de sementes de *Dolichos biflorus*, que distingue eritrócitos A<sub>1</sub> de A<sub>2</sub> e A<sub>1</sub>B de A<sub>2</sub>B (Bird, 1951), de sementes de *Ulex europeus*, que aglutina células do grupo O (Horejsi & Kocourek, 1974) e a de sementes de *Crotalaria striata*, que também distingue hemácias A<sub>1</sub> de A<sub>2</sub> (Oliveira *et al.*, 1989). As lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*, ambas específicas por fucose, são utilizadas na identificação de células sanguíneas do tipo O e de secretores de substâncias desse grupo (Sharon & Lis, 2001).

Estudos de inibição por haptenos com as lectinas de *Phaesolus limensis* e *Vicia craca* (específicas para o grupo A) e de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla* (específicas para o grupo O), forneceram indicações de que N-acetil-galactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O, respectivamente (Lis & Sharon, 1998). A aglutinina do amendoim é empregada na detecção de poliaglutinação (ou poliaglutinabilidade), uma condição que acompanha certas infecções bacterianas e virais, onde os eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis pelos anticorpos normalmente presentes nos soros de indivíduos adultos (Sharon & Lis, 2001).

Contribuições importantes das lectinas também têm sido relatadas no que diz respeito ao estudo de membranas celulares e subcelulares de animais, de plantas e de microorganismos, onde lectinas marcadas radioativamente ou com fluoresceína têm sido empregadas (Nicholson, 1974; Rapin & Burger, 1974; Lis & Sharon, 1991).

Trabalhos empregando lectinas na identificação de grupos de açúcares presentes em tecidos da região pré-cornea de ratos foram realizados no intuito de permitir a liberação local e prolongada de drogas no tratamento de uma série de patologias oculares (Nicholls *et al.*, 1994).

Um número crescente de lectinas vem sendo usado em estudos de caracterização de glicoconjugados presentes nas superfícies celulares. A identificação destes tornaria possível a produção de vacinas específicas que atingiriam células alvo, impedindo a penetração de agentes infecciosos nas mesmas. Cerca de 27 lectinas de plantas foram usadas na identificação da expressão de glicoconjugados em algumas células específicas de ratos e do intestino humano (Sharma *et al.*, 1996). Sete diferentes lectinas de plantas conjugadas a

ferritina foram usadas para examinar a distribuição de glicoconjugados sobre as membranas externas de células do fotorreceptor da luz (Ishikawa *et al.*, 1996).

Nowell (1960) reportou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* tinha propriedades mitogênicas para linfócitos humanos. Já as lectinas de *Homarus americanus* (Campbell *et al.*, 1982) e de *Dictyostelium purpureum* (Lipsick *et al.*, 1980) são estimuladoras de linfócitos B, mas não de linfócitos T, enquanto a lectina de *Phytolacca americana* é um mitógeno de linfócitos T e B. Estudos *in vitro* da aplicação de lectinas na estimulação de linfócitos têm possibilitado diagnosticar imunodeficiências congênitas ou adquiridas, bem como monitorar o efeito de drogas imunoterapêuticas (Lis & Sharon, 1981). A Concanavalina A (Con A), a fitohemaglutinina (PHA) e a *Canavalia brasiliensis* (Con Br) podem ser usadas como padrão de referência imunológica na indução da proliferação de linfócitos do sangue periférico humano. (Sharon & Lis, 2001). Barral-Netto *et al.* (1992) observaram que as lectinas purificadas de oito sementes de leguminosas da tribo *Diocleae*, eram fortemente mitogênicas e indutoras da produção de interferon por linfócitos humanos.

As lectinas podem também funcionar como agentes diferenciadores e específicos para algumas espécies de microrganismos. A WGA aglutina especificamente a espécie *Neisseria gonorrhoeae*, podendo diferenciá-la de outras espécies de *Neisseria* (Schaefer *et al.*, 1979). Lectinas de *Glycine max*, *Abrus precatorius* e *Griffonia simplicifolia* aglutinam apenas *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoidis* entre vários bacilos (Cole *et al.*, 1984).

A modificação de estruturas glicoprotéicas da membrana celular, durante a divisão celular, pode estar relacionada com transformações malignas. Assim, lectinas têm se mostrado como ferramentas poderosas durante variações nos diferentes estágios precisos da doença, sendo úteis no diagnóstico e prognóstico da doença (Dall' Olio, 1996). Estudos mostraram que algumas lectinas são hábeis em aglutinar células cancerosas, mas não reconheciam células saudáveis do mesmo tipo (Inbar & Sachs, 1969).

As lectinas de *Ricinus comunis* e outras lectinas citotóxicas de plantas vêm sendo usadas na terapia do câncer como, por exemplo, no tratamento de pacientes leucêmicos, como as vítimas do acidente de Chernobyl (Sharon & Lis, 1987). Matsumoto *et al.* (1992) usaram a lectina de *Dolichos biflorus* (DBA) no prognóstico do câncer de pulmão, onde estes observaram uma correlação existente entre os dados clínicos da doença e os dados histoquímicos com lectina. A internalização de lectinas como a de *Griffonia simplicifolia*

em células tumorais de murina, desencadeia um processo chamado de apoptose - morte programada de células (Kim *et al.*, 1993). De maneira semelhante, a lectina de *Canavalia ensiformis*, desenvolve sua função tóxica sobre células normais e transformadas (Kulkarni & McCulloch, 1995). A ricina e a abrina são conjugadas a anticorpos monoclonais e usadas como imunotoxinas na terapia do câncer (Slifkin & Doyle, 1994).

A lectina do bulbo do alho (*Allium sativum*) reduziu fortemente o crescimento e a síntese de DNA de células tumorais humanas. Além disso, essa proteína induziu a apoptose nas células a uma baixa concentração (Karasaki *et al.*, 2001). Janzen *et al.* (1976) foram os primeiros a sugerir que a lectina de *Phaseolus vulgaris* era tóxica para o bruquídeo do caupi, *Callosobruchus maculatus*. Huesing *et al.* (1991) verificaram que a lectina de *Oryza sativa* e *Urtica dioica* apresentavam atividade inseticida contra larvas de *Callosobruchus maculatus*. A lectina da salsa (*Ipomoea esarifolia*) exibiu uma ação inseticida contra larvas de *Callosobruchus maculatus*, que ataca o caupi ou feijão-de-corda, particularmente quando armazenado (Santos, 2001). A WGA inibiu o crescimento e o desenvolvimento de duas espécies de fungos fitopatogênicos, *Fusarium graminearum* e *F. oxysporum*.

Lectinas podem ser também usadas como inibidoras da proliferação viral, uma vez que estas proteínas podem ligar-se especificamente a glicoproteínas da capa viral, as quais parecem ser as responsáveis principais no mecanismo de adsorção do vírus à célula. Uma vez bloqueados os sítios ligantes destas glicoproteínas por lectinas, o vírus não será capaz de proliferar.

Favero (1994) relatou que algumas lectinas foram empregadas na caracterização de glicoproteínas do envelope viral (glicoproteína 120). Esta caracterização poderia permitir a prevenção da ligação do vírus às células hospedeiras, uma vez que as lectinas específicas se ligariam à cápsula viral, bloqueando o seu sítio de ligação às células.

Cinco lectinas com especificidade para oligossacarídeos N- e O- ligantes foram examinadas com relação à capacidade de inibição da infectividade *in vitro* do vírus da AIDS (HIV) e do herpes tipo 1 (HSV1). As lectinas específicas para oligossacarídeos N- ligantes bloquearam a infecção pelo HIV em concentrações de nano a micro moles, enquanto que a infecção por HSV1 foi inibida pelas lectinas N- e O- ligantes (Hansen *et al.*, 1991).

As lectinas específicas para  $\alpha$ -(1-3)-D-manose e  $\alpha$ -(1-6)-D-manose de *Galanthus nivalis*, *Hippeastrum hybrid*, *Narcissus pseudonarcissus* e *Listera ovata* inibiram a infecção de células MT-4 pelos vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV1 e HIV2) e pelo vírus da imunodeficiência em símios em concentrações comparáveis com as concentrações em que dextrana sulfato inibe estes vírus (50% da concentração efetiva, 0,2 a 0,6  $\mu$ g/mL) (Balzarini *et al.*, 1991).

Uma série de 11 lectinas foram estudadas com relação a sua atividade inibitória contra os vírus do herpes simples tipo 1, da raiva e da rubéola. A adsorção do vírus do herpes foi inibida pelas lectinas de *Limulus polyphemus* (LPA), *Canavalia ensiformis* (Con A) e gérmen de trigo (WGA), enquanto as lectinas de *Bauhinia purpurea* (BPA) e da soja foram mais efetivas se presentes durante a replicação viral; a ligação do vírus da raiva a células susceptíveis foi prevenida pelas lectinas LPA e de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), enquanto WGA e BPA foram inibitórias do passo seguinte; a multiplicação do vírus da rubéola foi afetada apenas após a ligação por NPA, Con A e WGA (Marchetti, *et al.*, 1995).

A lectina da soja é utilizada na purificação da medula óssea humana para transplantes pela aglutinação seletiva das células T maduras presentes na medula. Estas células são responsáveis pela rejeição que ocorre quando há histo-incompatibilidade (Sharon & Lis, 2001).

#### 1.2.4. Propriedades Físico-Químicas

As lectinas de algas marinhas diferem daquelas de vegetais superiores em várias propriedades. Em geral, elas apresentam pequena massa molecular e não reconhecem açúcares simples, sendo mais específicas para oligossacarídeos complexos, em especial glicoproteínas. Além disso, muitas das lectinas de algas marinhas não requerem cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (Rogers & Hori 1993). Estas proteínas ocorrem principalmente na forma monomérica e têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos, com ponto isoelétrico entre quatro e seis (Shiomi *et al.*, 1981, Hori *et al.*, 1990).

O maior número de lectinas de algas estudadas até o presente, diz respeito àquelas provenientes da classe Rhodophyta (algas vermelhas), dentre as quais encontram-se as lectinas de *Ptilota plumosa*, as primeiras aglutininas de alga marinha a serem purificadas e

caracterizadas. Essa lectinas, denominadas de PPI e PPII, apresentaram massas moleculares de 65 KDa e 170 KDa, respectivamente. Ambas as proteínas eram fortemente inibidas por  $\rho$ -Nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo e requeriam a presença de cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ , para exercerem suas atividades biológicas (Rogers *et al.*, 1977; Rogers & Blunden, 1980).

A lectina monomérica e glicoprotéica, obtida da alga vermelha *Gracilaria bursa-pastoris*, apresentou em sua estrutura cerca de 20% de açúcar. Essa proteína apresentou-se rica em aminoácidos como glicina, ácido aspártico e ácido glutâmico, com pI em torno de 4,7. Sua massa molecular aparente foi estimada por filtração em gel em 15,5 KDa e por PAGE-SDS em 30 KDa (Okamoto *et al.*, 1990).

Uma lectina com massa molecular em torno de 15 KDa obtida por filtração em gel e estimada em 29,7 KDa por PAGE-SDS, foi isolada da alga marinha vermelha *Gracilaria tikvahiae*. Essa lectina aglutinou fortemente eritrócitos de coelho e foi inibida na presença de ácido N-acetil-neuramínico, de lactoferrina, do inibidor de tripsina e de fetuína (Chiles & Bird, 1990 e Dalton *et al.*, 1995).

Ainouz *et al.* (1995) purificaram as lectinas presentes nas algas *Bryothamnion seaforthii* e *B. truiquetrum*. A atividade hemaglutinante de ambas as lectinas não se mostrou dependente de cátions divalentes e nem inibida por açúcares simples. As massas moleculares das lectinas de *B. seaforthii* e *B. truiquetrum*, estimadas por filtração em gel, foram de 4,5 KDa e 3,5 KDa, respectivamente.

Benevides *et al.* (1996), isolaram uma lectina monomérica da alga *Solieria filiformis*, com 1,5 % de sua composição em açúcar. Essa proteína foi inibida pelas glicoproteínas manana de levedura, avidina, egg white e ovalbumina. Quando analisada por cromatografia de filtração em gel de Superose 12-R (FPLC), a lectina exibiu uma massa de 21,9 KDa, aproximando-se do estimado por PAGE-SDS, com 29 KDa.

A lectina trimérica de *Ptilota filicina*, foi inibida por galactose e seus derivados, onde os mais potentes inibidores foram:  $\rho$ -Nitrofenil-N-acetil- $\alpha$ -D-galactosídeo e  $\rho$ -Nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosídeo, sendo encontrada uma massa molecular de 56,9 KDa por filtração em gel e 19,32 KDa por PAGE-SDS. O estudo de sua composição em aminoácidos mostrou ser a lectina rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados (Sampaio *et al.*, 1998a).

Benevides *et al.* (1998b) isolaram uma aglutinina presente na alga marinha vermelha *Enantiocladia duperreyi*. A lectina aglutinou preferencialmente eritrócitos humanos do

grupo O, sua atividade hemaglutinante apresentou dependência por cátions divalentes e foi inibida na presença dos açúcares simples D-fucose, D-galactose e alguns de seus derivados e da glicoproteína mucina de porco. A lectina apresentando uma massa molecular aparente de 24,7 KDa por filtração em gel e de 16,07 KDa por PAGE-SDS.

Costa *et al.* (1999), estudando a alga marinha vermelha *Amansia multifida*, observou que a lectina presente nesta alga continha 2,9% em açúcar neutro e era inibida pelas glicoproteínas avidina, fetuína, ovalbumina e manana. A massa molecular dessa proteína foi estimada em 26,9 KDa por filtração em gel e em 24,5 por PAGE-SDS. A focalização isoeletrica detectou a presença de cinco isolectinas com pI ácido variando entre 5,4 e 6,2. A análise de aminoácidos mostrou ser esta lectina rica em prolina, glicina e ácido aspártico e pobre em histidina e fenilalanina.

A lectina da alga *Vidalia obtusiloba* aglutinou preferencialmente eritrócitos humanos do grupo O, tratados enzimaticamente com bromelaína. A lectina mostrou-se dependente de  $Ca^{+2}$  e foi inibida pelos açúcares simples N-acetilgalactosamina, D-galactosamina, D-galactose,  $\alpha$ -lactose e pela glicoproteína mucina. Essa proteína apresentou uma estrutura glicoprotéica, sendo sua massa molecular aparente de 79 KDa, obtida por filtração em gel de Sephadex G-100. O procedimento de eletroforese realizado em condições nativas (PAGE), exibiu uma única banda protéica. Quando realizado sob condições desnaturantes (PAGE-SDS) a lectina também se mostrou como uma única banda protéica com massa molecular de 59,63 KDa. Entretanto, sua redução em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol revelou a presença de duas diferentes subunidades protéicas com massas moleculares de 59,63 e 15,17 KDa. A focalização isoeletrica revelou a presença de uma única banda protéica na faixa de pH compreendido entre 4 e 5 (Melo, 2000).

A primeira lectina de alga a ter sua estrutura primária definida através de uma combinação dos métodos de degradação de Edman e espectrometria de massa, pertence à espécie de alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (Calvete *et al.*, 2000). Sua estrutura, composta de 91 resíduos de aminoácidos, não se mostrou similar a nenhuma outra lectina de planta ou animal. Os resíduos de aminoácidos mais abundantes foram os de glicina e serina.

Paralelamente, Hori *et al.* (2000) determinaram a estrutura primária de duas lectinas, denominadas hypninas A-1 e A-2, isoladas da alga marinha vermelha *Hypnea japonica*, por

degradação de Edman. Ambas as aglutininas eram polipeptídeos de cadeia única, compostas de 90 resíduos de aminoácidos, incluindo quatro meia-cisteínas envolvidas em duas ligações dissulfeto intracadeias. A estrutura primária das lectinas diferia com relação à posição de três resíduos apenas: Pro<sup>19</sup>, Arg<sup>31</sup> e Phe<sup>52</sup>.

De acordo com Rogers & Hori (1993), as lectinas de algas marinhas vermelhas podem ser distribuídas em três tipos: 1 - moléculas de baixo peso molecular que reconhecem glicoproteínas, mas não monossacarídeos e não requerem cátions divalentes; 2 - moléculas que se ligam a monossacarídeos e derivados e que também não possuem dependência por cátions divalentes; e 3 - grandes moléculas (PM > 64 KDa) que se ligam a monossacarídeos na presença de cátions divalentes.

O crescente número de lectinas de algas marinhas verdes (Chlorophyta) detectadas ao longo das últimas décadas, tornou essas espécies importantes fontes de pesquisa para o isolamento e caracterização de novas moléculas. As lectinas de algas verdes, seguem as mesmas propriedades atribuídas às lectinas de algas vermelhas, divergindo apenas na capacidade de inibição por açúcares simples, demonstrada principalmente frente a N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina. Vale ressaltar, que a maior parte das lectinas isoladas de algas marinhas verdes pertencem as espécies do gênero *Codium*.

As lectinas de duas subespécies de *Codium fragile* foram as primeiras lectinas de algas verdes a serem isoladas e caracterizadas. As lectinas tetraméricas das duas subespécies *atlanticum* e *tomentosoides* apresentaram massas moleculares em torno de 60 KDa e pontos isoelétricos de 3,8 e 3,9, respectivamente, concordando com a composição de aminoácidos que apresentam elevado percentual de aminoácidos ácidos (Loveless & Rogers, 1985).

Fábregas *et al.* (1988a), estudando também o gênero *Codium*, isolaram da espécie *Codium tomentosum* duas lectinas com massas moleculares aparentes de 15 KDa e 16 KDa. No entanto, a eletrofocalização evidenciou nove pontos isoelétricos, relativos a nove isolectinas.

Rogers & Fanglu (1991) isolaram duas novas lectinas pertencentes a duas outras espécies do gênero *Codium*, sendo estas *C. vermilara* e *C. bursa*. Ambas as lectinas foram inibidas por N-acetilgalactosamina e apresentaram massas moleculares de 18,4 KDa para *C. bursa* e 15,1 KDa para *C. vermilara*. Os autores evidenciaram a presença de três isolectinas

para *C. vermilara*, com pontos isoelétricos de 3,4; 4,1 e 4,15 e apenas uma única forma para *C. bursa* com ponto isoelétrico de 3,5.

A lectina da alga *Enteromorpha linza* foi inibida por D-manose-6-fosfato, dentre os açúcares simples testados (Hori *et al.*, 1986), enquanto a lectina da espécie *E. clathrata* apresentou-se inibida pela glicoproteína fetuína (Dalton *et al.*, 1995).

As lectinas de *Codium adherens*, *C. effusum*, *C. capitatum* e *C. platylobium*, foram purificadas e os dados obtidos por eletroforese em PAGE-SDS revelaram que todas as quatro lectinas apresentam massas aparentes entre 11 e 13 KDa. Estas proteínas não apresentaram dependência por cátions (Rogers *et al.*, 1994).

Sampaio *et al.* (1998a) isolou da alga *Ulva lactuca* uma lectina de massa molecular aparente de 17 KDa. Da mesma forma das lectinas isoladas de algas vermelhas, esta lectina também se mostrou rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobre em aminoácidos básicos.

Benevides *et al.* (2001) purificaram e caracterizaram parcialmente, a primeira lectina do gênero *Caulerpa*. Esta lectina pertence a espécie *C. cupressoides*, é dimérica, com 11,05% de carboidrato em sua composição, mostrou-se inibida por lactose e alguns de seus derivados e foi inibida pela glicoproteína mucina do estômago do porco. Sua massa molecular determinada por filtração em gel, foi de 44,7 KDa, enquanto que por PAGE-SDS na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, foi de 23,16 KDa. A determinação de sua composição em resíduos de aminoácidos demonstrou uma predominância de glicina, Glx (ácido glutâmico e glutamina), Asx (ácido aspártico e asparagina) e serina.

A primeira lectina isolada de alga marinha parda foi a de *Fucus vesiculosus*. Esta lectina apresentou-se como um mucopolissacarídeo com 90% de carboidrato e peso molecular de 2000 KDa. Seu ponto isoelétrico é de 3,2 e sua estrutura não é formada por subunidades (Ferreiros & Criado, 1983).

Chiles & Bird (1990), observaram em extratos concentrados da alga parda *Dictyota dichotoma*, aglutinação frente a eritrócitos de coelho e de humano dos grupos A e B, com especificidade de ligação demonstrada para lactoferrina, dentre uma série de açúcares simples e glicoproteínas testados.

Teixeira (1997), ao estudar algas marinhas coletadas no continente Antártico, descobriu ser a espécie *Adenocystis untricularis*, possuidora de uma lectina que,

preferencialmente, aglutinava eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente com papaína. Frações da aglutinina purificada, quando submetidas à eletroforese em PAGE-SDS, evidenciaram a presença de uma única banda protéica com massa molecular relativa estimada em 14,4 KDa.

### 1.2.5. Potencial Biotecnológico

Os estudos envolvendo lectinas de algas marinhas têm se intensificado ao longo dos últimos anos e padrões de características começam a aparecer (Rogers & Hori, 1993).

Sabe-se que as características de reconhecimento de estruturas de açúcares e glicoconjugados dessas proteínas fazem delas importantes ferramentas para o reconhecimento e isolamento desses tipos moleculares, sejam eles dissolvidos em soluções ou presentes em membranas biológicas. A lectina da alga marinha verde *Codium tomentosus* foi usada para diagnosticar poliformismo de glicoproteínas do soro humano, após a focalização isoelétrica (Fábregas *et al.*, 1988b).

A lectina de *Codium fragile* tem sido usada para estudar o conteúdo de carboidratos presentes nos polissacarídeos da parede celular de *Streptococcus* (Cisar *et al.*, 1995). Estudos conduzidos por Wu *et al.* (1995) demonstraram que esta lectina é capaz de reconhecer e fracionar glicoproteínas contendo N-acetilgalactosamina  $\alpha$ -1 em sua estrutura.

Em testes de tipagem sanguínea, a lectina de *Ptilota plumosa* é capaz de reconhecer e aglutinar apenas eritrócitos de humanos com antígeno B (B, A<sub>1</sub>B e A<sub>2</sub>B) geneticamente determinado, diferenciando-os dos tipos A e O (Rogers, *et al.*, 1977, Rogers, *et al.*, 1979 e Rogers & Fish, 1991).

As lectinas das algas verdes *Codium fragile* subespécie *atlanticum* e *tomentosoides* (Loveless & Rogers, 1985, Rogers *et al.*, 1986), *C. adherens*, *C. effusum* e *C. capitatum* (Rogers *et al.*, 1994) podem ser empregadas para distinguir eritrócitos humanos do grupo A e seus subgrupos.

A aglutinina da alga verde *Ulva lactuca* aglutina, preferencialmente, eritrócitos do grupo O, distinguindo também os grupos A<sub>2</sub> e A<sub>2</sub>B dos grupos A<sub>1</sub> e A<sub>1</sub>B por intensidade de aglutinação (Gilboa-Gaber *et al.*, 1988).

Lectinas de algas podem também ser usadas como importantes ferramentas quimiotaxonômicas. As espécies do gênero *Chondria* (*tenuissima* e *coerulescens*) podem ser distinguidas pelos títulos de aglutinação contra eritrócitos de coelho, 4096 UH/ml para *C. tenuissima* e 8 UH/ml para *C. coerulescens*. As lectinas das espécies *Calliblepharis ciliata* e *C. jubata* também aglutinam diferentemente eritrócitos de coelho, com títulos de 512 UH/ml e 32 UH/ml, respectivamente (Fábregas *et al.*, 1985).

Do ponto de vista imunológico, algumas lectinas de algas apresentam-se como estimuladoras do crescimento celular, tendo também a capacidade de induzir o recrutamento de neutrófilos durante a inflamação.

Estudos realizados com a lectina de *Fucus vesiculosus* mostraram que esta apresenta efeito imunomodulatório em ratos e induz a blastogênese linfocitária *in vitro*, apesar de não aglutinar linfócitos (Criado & Ferreiros 1983).

Bird *et al.* (1993) verificaram que as lectinas das algas *Gracilaria tikvahiae*, *Ulva rígida* e *Gracilaria verrucosa* estimularam mitogênese em esplenócitos de camundongo, enquanto a aglutinina de *Gracilaria tikvahiae* estimulou mitogênese em linfócitos humanos.

Dalton *et al.* (1995) observaram que as lectinas das algas marinhas *Chondria dasyphylla*, *Rhodymenia pseudopalmata* e *Gracilaria* sp., estimularam a mitogênese em esplenócitos murinos, enquanto as lectinas de *Chondria dasyphylla*, *Codium decorticans*, *Gracilaria* sp., *Gracilaria tikvahiae* e *Gelidium pusillum* estimularam mitogênese em linfócitos humanos.

Lima *et al.* (1998), estudaram a indução da transformação de linfócitos humanos pela lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. A curva dose-dependente para células mononucleares periféricas do sangue humano (PBMC) foi estimulada pela lectina em concentrações relativamente baixas. Em valores elevados, observou-se uma redução gradual da capacidade mitogênica, com o concomitante aumento na concentração da lectina. O decréscimo na proliferação de linfócitos foi bloqueado por avidina, mas não por outra lectina (Com Br) a concentrações estimulatórias.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *Amansia multifida*, *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum* e *Gracilaria caudata* induziram a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. O influxo máximo de neutrófilos foi determinado pela lectina de *B. triquetrum* em

ratos e pela lectina de *A. multifida* em camundongos. Máxima quimiotaxia de neutrófilos humanos foi obtida com a lectina de *G. caudata*. Estas atividades não foram inibidas pelas glicoproteínas previamente identificadas como sendo reconhecidas por estas lectinas. D-manose foi um forte inibidor, especialmente da atividade da lectina de *B. triquetrum* *in vivo* e *in vitro* (Neves *et al.*, 2001).

A aplicação de lectinas de algas marinhas em testes histoquímicos foi relatada pela primeira vez para a alga *Codium fragile* por Griffin *et al.* (1995). Os autores sugeriram como sistema modelo, o uso do conjugado lectina-ouro coloidal ligado a membranas de eritrócitos humanos A<sub>1</sub> e prontamente detectados por microscopia eletrônica de transmissão. As pequenas moléculas de lectinas de *C. fragile* utilizadas neste teste apresentaram um fácil acesso em diferentes pontos da superfície das células de vários tecidos.

Matsubara *et al.* (1996) mostraram que as lectinas isoladas das algas marinhas *Hypnea japonica*, *Boodlea coacta*, *Solieria robusta* e *Carpopeltis flabellata*, são capazes de inibir a agregação plaquetária humana. Os autores sugerem o uso destas lectinas na análise de glicoconjugados das membranas plaquetárias e como modelo de novos inibidores da agregação de plaquetas.

Viana *et al.* (2002) reportaram uma atividade antinociceptiva, determinada pelos ensaios com formalina em camundongos, presente nos extratos protéicos das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*, precipitados com sulfato de amônio até 60% de saturação (F0/60). Não somente as F0/60, mas também as lectinas de ambas as espécies inibiram significativamente as contrações abdominais induzidas por ácido acético após administrações ip. e oral. No teste com formalina, as lectinas (1 e 5 mg/kg, ip., e 5 a 20 mg/kg, oral) inibiram a primeira e segunda fases (5 e 20 minutos, respectivamente) mas o efeito ocorreu predominantemente na segunda fase. Os efeitos das lectinas foram total ou parcialmente revertidos com naloxone (2 mg/kg, sc.) na primeira e segunda fases, respectivamente. Experimentos conduzidos com as lectinas na ausência e presença de avidina (1 mg/kg, ip.) e D-manose (1 mg/kg, ip.), mostraram que a avidina não interfere no efeito da lectina de *B. seaforthii*, mas parcialmente reverteu o efeito da lectina de *B. triquetrum*, enquanto D-manose reverteu completamente os efeitos de ambas as lectinas.

Hori *et al.* (1986), sugeriram que as lectinas de algas podem ser usadas como importantes ferramentas para pesquisas do câncer. Alguns estudos conduzidos pelo autor provaram que extratos de *Boodlea coacta*, *Codium fragile*, *Carpopeltis flebelata*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Solieria robusta* foram capazes de aglutinar fortemente células do tipo FM3A do tumor de rato.

Lectinas de algas isoladas das espécies *Cystoclonium purpureum*, *Palmaria palmata*, *Monospora* sp. e *Agardhiella tenera*, foram capazes de reagir com células leucêmicas de rato do tipo L5178Y, mas não reconheceram o tipo L1210 (Shiomi *et al.*, 1979, Kamiya 1982a e 1982b).

A aglutinação de alguns tipos de células bacterianas foi observada por Hori *et al.* (1988), com o emprego de algumas lectinas de algas marinhas. *Esherichia coli* que foi aglutinada pelas lectinas de *Ulva pertusa*, *Codium fragile* e *Boodlea coacta*; *Pseudomonas putida* reagiu com as lectinas de *Ulva pertusa* e *Codium fragile* e *Flavobacterium* sp. foi reconhecida pela lectina de *Codium fragile*.

As propriedades biológicas das lectinas de algas marinhas constituem uma área de estudos ainda pouco explorada, onde muito conhecimento deverá ser investido para que se possa entender a todo o potencial dessas moléculas.

### 1.3. Lectinas de Algas

#### 1.3.1. Ocorrência de Lectinas em Algas Marinhas

As algas são um grupo de plantas inferiores, talófitas (plantas desprovidas de raízes e folhas) que não apresentam sistema vascular, tendo clorofila como principal pigmento fotossintético, e a ausência de uma cobertura de células estéreis ao redor das células reprodutivas. As algas apresentam uma ampla distribuição na natureza, ocupando ambientes terrestres e aquáticos tanto de água doce quanto marinhos (Lee, 1989).

Inicialmente, a ênfase no estudo de algas marinhas e plantas aquáticas estava relacionada com a produção de alimentos, mas as investigações acabaram por tornar-se multidisciplinares, surgindo um interesse em descobrir compostos farmacologicamente ativos.

O primeiro relato da ocorrência de lectinas em algas marinhas foi feito por Boyd *et al.* (1966), que estudaram 24 espécies de algas tropicais. O extrato de *Spyridia filamentosa* aglutinou especificamente células do grupo sanguíneo A, enquanto seis espécies de algas pardas (*Dictyota bartayresii*, *D. cervicornis*, *D. divarticata*, *D. delicatula*, *Sargassum rigidulum* e *Padina vickersiae*) e uma espécie de alga azul (*Lynbya majuscula*) aglutinaram eritrócitos dos grupos A e O. Extratos da alga verde *Codium isthmocladum* e das algas pardas *Turbinaria turbinata* e *Sargassum natans* foram inespecíficos, aglutinando eritrócitos dos grupos A, B e O.

A ocorrência de lectinas em algas marinhas teve seqüência com estudos realizados a partir de extratos salinos, de 105 diferentes espécies de algas marinhas, oriundas da costa da Inglaterra. Dentre as espécies analisadas, as quais pertenciam às classes Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta, 19 exibiram atividade hemaglutinante não específica contra hemácias humanas do sistema ABO. Entretanto, a alga vermelha *Ptilota plumosa* continha uma lectina que reconhecia especificamente o antígeno B. Os resultados indicaram que as aglutininas, com fraca atividade contra eritrócitos humanos nativos (não tratados enzimaticamente), estavam presentes em um limitado número de espécies. Os autores verificaram ainda que nenhuma diferença na atividade hemaglutinante foi encontrada quando diferentes partes anatômicas foram examinadas (Blunden *et al.*, 1978; Blunden *et al.*, 1972).

Estudos posteriores mostraram a presença de lectinas em 96 espécies de algas marinhas britânicas. Os extratos dessas algas exibiram atividade hemaglutinante contra suspensões de eritrócitos humanos tratados previamente com a enzima papaína ou em meios contendo albumina sérica bovina (BSA) (Rogers *et al.*, 1977). Dessa forma, muitas das espécies de algas marinhas britânicas examinadas anteriormente foram reavaliadas e, das 65 espécies que exibiram atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos, 39 falharam em aglutinar células não tratadas com enzimas proteolíticas e/ou na ausência de BSA (Blunden *et al.*, 1978; Rogers *et al.*, 1980).

Hori *et al.* (1981) observaram a presença de atividade hemaglutinante em 14 extratos de algas marinhas, dentre as 53 espécies estudadas. As lectinas aglutinaram eritrócitos de coelho, de cavalo, de ovelha, de pato, de galinha e humanos do sistema humano ABO.

Estudos conduzidos com algas pertencentes às classes Chlorophyta e Rhodophyta revelaram que 100% dos extratos testados foram capazes de aglutinar células sanguíneas vermelhas de coelho. Os autores constataram ainda que, algumas das espécies de algas estudadas perdiam sua capacidade de hemaglutinação depois de estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período superior a seis meses (Fábregas *et al.*, 1984; Fábregas *et al.*, 1985 e Muñoz *et al.*, 1985).

Rogers & Loveless (1985) e Fábregas *et al.* (1986), ao estudarem a atividade hemaglutinante usando extratos de algas pardas da costa espanhola, verificaram que a aglutinação era, quase sempre, devido à presença de polifenóis. Os autores verificaram que a incorporação, a esses extratos, de porções de uma resina removedora de polifenóis em solução ocasionava uma diminuição ou ausência total da atividade hemaglutinante.

Blunden *et al.* (1986) reexaminaram muitas das espécies de algas britânicas anteriormente relatadas como possuidoras de hemaglutininas e constataram, através de testes utilizando substâncias removedoras de polifenóis adicionadas aos extratos, que as algas verdes e vermelhas não apresentavam diferenças nos títulos de hemaglutinação quando submetidas a esse tipo de tratamento.

Anderson *et al.* (1986) estudando os extratos de cinco algas pardas e duas algas vermelhas, coletadas no Norte da Suécia, encontraram atividade hemaglutinante para todas as espécies testadas frente a eritrócitos do sistema humano ABO, de rato, de cavalo e de ovelha.

Ao estudarem a presença de lectinas em 31 espécies de algas marinhas, Hori *et al.* (1988) observaram que quatro algas pardas, quatro algas verdes e 19 algas vermelhas foram capazes de aglutinar, pelo menos, um tipo de eritrócito, concluindo que aglutininas são largamente distribuídas em algas marinhas. Os autores observaram ainda que tais proteínas são mais sensíveis a eritrócitos de coelho e carneiro, e que a aglutinação poderia ser incrementada com um pré-tratamento dos eritrócitos com as enzimas pronase ou tripsina.

Chiles & Bird (1989), constataram através de observações realizadas em trabalhos de detecção de atividade hemaglutinante em algas marinhas, que muitos dos extratos brutos utilizados apresentavam quantidades de metabólitos solúveis (monossacarídeos e polifenóis), que poderiam ser responsáveis por variações e erros nos resultados de hemaglutinação obtidos. Em estudos conduzidos pelos autores com o emprego de 15

---

espécies de algas marinhas dos Estados Unidos, utilizando as proteínas solúveis dos extratos, parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônio (20-70%), foi observado que todas as espécies testadas (sete algas vermelhas, quatro algas pardas e quatro algas verdes) exibiram hemaglutinação contra eritrócitos de coelho e somente três delas não aglutinaram eritrócitos de carneiro, sendo que nenhuma espécie mostrou especificidade para eritrócitos humanos do sistema ABO.

Ainouz & Sampaio (1991) estudaram a ocorrência de lectinas em algas marinhas do Nordeste do Brasil e verificaram que 65% das espécies testadas foram capazes de aglutinar, pelo menos, um tipo de eritrócito testado. Os autores utilizaram eritrócitos tripsinizados de carneiro, de coelho, de galinha, de cabra, de boi e de humanos do sistema ABO, sendo que os de coelho e galinha foram os mais susceptíveis à aglutinação, enquanto que os eritrócitos de cabra não foram reconhecidos por nenhuma das lectinas.

Hori *et al.* (1993), relataram a presença de um novo grupo de lectinas em algas marinhas, com estrutura semelhante à dos peptídeoglicanos, que foram extraídas quando a enzima pronase foi adicionada ao tampão de extração. Os autores observaram que os extratos convencionais não foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho ou de carneiro, tratados com tripsina e pronase, respectivamente. Entretanto, quando a pronase foi adicionada ao tampão de extração, na concentração de 0,5%, todos os extratos exibiram alta atividade hemaglutinante.

Freitas *et al.* (1997) estudaram a ocorrência de lectinas nos extratos de 30 espécies de algas marinhas do Nordeste brasileiro, utilizando eritrócitos, nativos e tratados enzimaticamente, de coelho, de galinha, de carneiro e de humanos do sistema ABO. Os autores observaram que a maioria dos extratos aglutinou pelo menos um dos eritrócitos testados e que as células sanguíneas vermelhas de carneiro e de coelho foram as mais susceptíveis à aglutinação pelas lectinas estudadas

Ao analisar os dados publicados sobre a ocorrência de lectinas em algas marinhas, Sampaio (1997), constatou que cerca de 700 espécies foram examinadas e que em mais de 57% delas constatou-se a presença de atividade hemaglutinante. Levando-se em consideração que na natureza existem muitos milhares de espécies de algas, este número representa apenas uma pequena parcela de contribuição das algas marinhas para os estudos de detecção e isolamento de lectinas.

O gênero *Gracilaria*, representa atualmente o mais explorado e com maior número de trabalhos de isolamento de lectinas dentre as algas vermelhas. Algumas espécies desse gênero, são reconhecidamente de difícil identificação taxonômica e alguns trabalhos realizados, mencionam apenas o gênero *Gracilaria* (sp.) para designar a espécie. Dalton *et al.* (1995), detectaram a presença de lectina em duas espécies de *Gracilaria*, onde uma delas diferia da outra por apresentar inibição pela glicoproteína e/ou inibidor de tripsina.

Trabalhos conduzidos com o emprego da espécie *Gracilaria verrucosa* por alguns autores, levaram a obtenção de diferentes características físico-químicas para as lectinas isoladas desta espécie. Nos estudos de Shiomi *et al.* (1981), foi relatada a presença de uma lectina tetramérica, capaz de aglutinar eritrócitos de vários animais, com ponto isoelétrico de 4,8 e massa molecular aparente de 41 KDa por filtração em gel e subunidade de 10,50 e 12 KDa quando investigada por eletroforese em PAGE-SDS. Takashashi & Katagiri (1987) após estudos de variação sazonal conduzidos com a mesma espécie de alga, relataram a presença de três diferentes lectinas, sendo a menor delas uma proteína com massa de 45 KDa, estimada por filtração em gel, ponto isoelétrico de 4,7 e permaneceu presente ao longo de todos os meses de coleta. Esta lectina foi mencionada como sendo idêntica àquela isolada por Shiomi *et al.* (1981), enquanto que as duas outras com massas de 100 e 300 a 400 KDa e pontos isoelétricos idênticos (4,2), foram encontrados apenas nos meses de dezembro, fevereiro e março, sendo suas ocorrências sugeridas como diretamente relacionadas à fase de vida da alga. Alguns anos depois, Kanoh *et al.* (1992), isolaram da mesma alga uma lectina com 92% de carboidratos em sua estrutura, caracterizada como uma proteoglicana sulfatada. A aglutinina isolada apresentou massa molecular aparente de 49 KDa por filtração em gel, relacionada a duas subunidades de 27 ou 23 KDa por PAGE-SDS. Procedimentos de focalização isoelétrica revelaram um valor de pI de 3,9.

A lectina monomérica glicoprotéica da alga *Gracilaria bursa-pastoris*, isolada por Okamoto *et al.* (1990), contém em sua estrutura 20% de açúcar e é rica em aminoácidos como glicina, ácido aspártico e ácido glutâmico, com pI de 4,7. Sua massa molecular aparente foi estimada por filtração em gel em 15,50 KDa e por PAGE-SDS em 30 KDa. Outra lectina de massa molecular maior (150 KDa por filtração em gel e 29,70 e 24,90 KDa por PAGE-SDS), foi isolada também de uma espécie do gênero *Gracilaria* conhecida como *G. Tikvahiae*. Essa lectina mostrou-se capaz de aglutinar fortemente eritrócitos de

coelho, sendo inibida em presença de ácido N-acetil-neuramínico, lacto ferrino e fetuína (Chiles & Bird, 1990 e Dalton *et al.*, 1995). Em estudos mais recentes, Neves (1999), isolou de *G. Caudata*, uma lectina com massa molecular de 10KDa, determinada por exclusão molecular em coluna de Superose 12 R.

Estudos de variação sazonal da atividade hemaglutinante frente a diferentes eritrócitos (coelho, galinha e humano do sistema ABO) presente nos extratos das algas marinhas vermelhas *Gracilaria domigensis* e *Gelidium pusillum* revelaram que a lectina de *G. domigensis* somente foi detectada no mês de junho, enquanto a lectina de *G. pusillum* foi observada durante o período de fevereiro até junho (Benevides *et al.*, 1999).

### 1.3.2. Isolamento e Purificação

O progresso das técnicas bioquímicas e de biologia molecular tem permitido a purificação e caracterização de muitas lectinas e muito tem sido esclarecido sobre sua distribuição, biossíntese e propriedades moleculares (Rogers, 1994).

O isolamento de lectinas de algas marinhas inicia-se, geralmente, pela extração de proteínas solúveis do material biológico, com o uso de soluções salinas tamponantes. Após a obtenção destes extratos protéicos, essas proteínas solúveis passam por uma série de etapas que podem se estender desde precipitações salinas das mesmas, até o emprego de varias colunas cromatográficas, sejam elas de troca iônica, de filtração, ou de afinidade.

As cromatografias de troca iônica têm se mostrado de grande utilidade em procedimentos de purificação de lectinas de algas, sendo geralmente utilizada de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos.

Ainouz *et al.* (1995) purificaram as lectinas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum* com a utilização de procedimentos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-celulose.

A lectina da alga marinha vermelha *Ptilota serrata* foi purificada pela combinação de processos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Bio Gel P-100 (Rogers *et al.*, 1990). Benevides *et al.* (1996) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose, seguida do procedimento cromatográfico de afinidade em coluna de Manana-

Sepharose CL-4B. Kakita *et al.* (1997) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria verrucosa* pela combinação dos procedimentos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-toyopearl 650M e filtração em gel em coluna de G3000PWx1.

Recentemente, tem havido uma acentuada tendência no uso das cromatografias de afinidade para a purificação de lectinas de algas marinhas, tendo em vista a maior praticidade por estas dispensadas, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato destas apresentarem uma maior segurança na pureza do material obtido. Lectinas de algas têm sido purificadas pelo uso de cromatografias de afinidade usando o carboidrato ao qual a lectina se liga mais fortemente, acoplado a uma matriz insolúvel, como a Sepharose 6B (Rogers *et al.*, 1986).

A lectina presente na alga marinha vermelha *Gracilaria bursa-pastoris* foi isolada por cromatografia de afinidade em gel preparado pelo acoplamento de manana de levedura ao "Formyl-Celulofine" (Okamoto *et al.*, 1990). Sampaio *et al.* (1998b) utilizaram a galactose presente na goma de guar no processo de isolamento da lectina da alga marinha vermelha *Ptilota filicina*. Benevides *et al.* (1998b) usaram a  $\alpha$ -lactose e Costa *et al.* (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento de lectinas presentes nas algas marinhas vermelhas *Enantiocladia duperreyi* e *Amansia multifida*, respectivamente. A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi purificada por cromatografia de afinidade em gel de  $\alpha$ -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100 (Benevides *et al.*, 2001). A aglutinina presente na alga marinha vermelha *Ptilota serrata* foi purificada através de um novo procedimento, usando como único passo, a cromatografia de afinidade em gel de goma de guar (Sampaio *et al.*, 1997). Oliveira *et al.* (2002) isolaram a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* através do procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Gerais:

Purificar e caracterizar parcialmente a lectina da alga marinha *Gracilaria ornata* e avaliar seus aspectos bioquímicos, estruturais e funcionais, tendo em vista o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas desta proteína.

### 2.2. Específicos

- Caracterizar quimicamente a lectina da alga vermelha *G. ornata* através da determinação da composição centesimal e de aminoácidos.
- Detectar e quantificar componentes bioativos (urease, inibidor de tripsina e lectina) em extratos obtidos da alga vermelha *G. ornata*.
- Purificar e caracterizar a lectina da alga vermelha *G. ornata*.
- Avaliar a atividade inseticida em diferentes frações protéicas como um possível potencial de aplicações biotecnológicas.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1. Algas Marinhas

A alga marinha da espécie *G. ornata*, foi coletada em ocasião de maré de sizígia (-0,2 a 2,0) , presas às rochas da praia do Mucuripe, município de Fortaleza, estado do Ceará. Após coletada, a alga foi limpa de suas epífitas, lavada, armazenada em sacos plásticos e congelada à -20° C até a preparação dos extratos.

#### 3.2. Animais de Experimentação

Camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) foram fornecidos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Gorgulhos (*Callosobruchos maculatus*) foram obtidos de colônias desenvolvidas no laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.3. Hemácias

- Eritrócitos humanos do sistema ABO, obtidos de doadores sadios, foram fornecidos pelo Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) da Universidade Federal do Ceará

Eritrócitos de coelhos albinos, obtidos de animais adultos e sadios, através do biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

- Eritrócitos de galinha, obtidos de animais sadios, criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.4. Reagentes Químicos

Acrilamida, N, N-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz, tripsina, marcadores de massa molecular, Coomassie Brilliant

Blue R-250, mucina de porco, apotransferina, asialofetúina, tiroglobulina bovina, tiroglobulina de porco, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

DEAE-Celulose, Dodecil Sulfato de Sódio, Nitrato de Prata e  $\beta$ -mercaptoetanol foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os reagentes utilizados para análise automática dos aminoácidos e Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foram adquiridos da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Análise Elementar

#### 4.1.1. Determinação de Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada segundo a metodologia de A. O. A. C.(1975). Foram pesados aproximadamente 2g da alga seca em cadinhos de porcelana, previamente tarados, e submetida à incineração em mufla a 550° C por 6 horas. As amostras foram deixadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até obtenção do peso constante das amostras incineradas. O teor de cinzas foi calculado por diferença entre os pesos inicial e residual e expresso em porcentagem. Às cinzas obtidas foram adicionados 3 mL de uma solução de ácido clorídrico 6 M, filtradas em papel de filtro (filtração média) e transferidas para um balão volumétrico, completando o volume para 100 mL com água destilada. A solução clorídrica foi reservada para as determinações posteriores de cálcio, magnésio fósforo e ferro.

#### 4.1.2. Determinação de Umidade

A metodologia foi realizada de acordo com A. O. A. C.( 1975). Aproximadamente 1g da amostra foi colocada em pesa-filtros previamente tarados e, depois, colocada para secar em estufa na temperatura de 105° C durante 12 horas. Quando retirada da estufa foi colocada no dessecador e pesada. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até a obtenção de peso constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em porcentagem.

#### 4.1.3. Determinação de Nitrogênio Total

O Nitrogênio total presente na alga marinha *G. ornata* foi determinado pelo método de Kjeldahl (Hiler *et al.*, 1948).

Para mineralização foram utilizados 1,5 g da amostra previamente seca, à qual foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 g da mistura catalítica (0,5 g de sulfato de cobre e 9,5 g de sulfato de sódio). Após mineralização, a amostra foi diluída com água destilada para um volume de 200 mL.

A amostra mineralizada e diluída foi destilada após a adição de 100 mL de NaOH 40% e 1g de zinco em pó. A amônia liberada no decorrer da destilação foi coletada em 50 mL de ácido sulfúrico 0,1 M contendo 3 gotas do indicador vermelho de metila. O excesso de ácido sulfúrico 0,1 M foi titulado com uma solução de NaOH 0,1 M.

Os cálculos para determinação do teor de proteína bruta (PB) foram realizados usando-se a fórmula:

$$\% \text{ PB} = \frac{\text{V. } 0,14 \cdot 6,25}{\text{PA}}$$

Onde:

V=Volume de NaOH 0,1M gasto na titulação

PA=Peso da amostra usada na digestão

#### 4.1.4. Determinação de Lipídio Total

Os lipídios totais foram determinados conforme a técnica descrita por Triebold (1946), usando-se como solvente n-hexana.

Cartuchos de papel de filtro contendo cerca de 1 g de farinha foram colocados em contato com n-hexana por 8 h, em extratores de Soxhlet acoplados a balões previamente desengordurados, secos e tarados. Em seguida, o solvente foi evaporado e os balões foram levados para uma estufa regulada a 105° C, por 1 h, sendo resfriados até atingir a

Yáskara F.M.Marques Leite

temperatura ambiente e pesados. Este procedimento foi repetido até obtenção de pesos constantes. Os lipídios totais foram determinados pela diferença dos pesos inicial e final dos balões, sendo este valor expresso em percentagem dos pesos secos das amostras.

#### 4.1.5. Determinação de Fibra Bruta

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida pela A. O. A. C. (1975) e constituiu na pesagem de aproximadamente 1 g da farinha de alga marinha previamente delipidada à frio com hexano. O resíduo obtido foi transferido diretamente para um erlenmeyer de 500 mL com auxílio de 200 mL de ácido sulfúrico (1,25%) previamente aquecido. Esse material foi fervido em refluxo por 30 minutos, efetuando-se após este tempo uma filtração em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi lavado com água quente, até não haver mais reação ácida (testando com papel indicador de pH). O resíduo contido no papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer de 500 mL, com auxílio de 200 mL de hidróxido de sódio (1,25%) quente, o qual foi submetido a refluxo por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma segunda filtração em papel de filtro quantitativo (faixa preta), previamente aquecido em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. A seguir, o material foi lavado com água quente até não haver reação básica (testando com o papel de pH), e lavado por três vezes com álcool etílico e duas vezes com éter etílico. O solvente foi deixado evaporar e o papel contendo o resíduo levado para a estufa a 105°C para secagem total, até obtenção de peso constante. O papel contendo o resíduo foi colocado em um cadinho de porcelana, previamente tarado, em mufla a 550°C, queimado em bico de Bunsen e incinerado em mufla a 550 °C, efetuando-se pesagens até a obtenção de peso constante. O teor de fibras foi determinado pela fórmula:

$$\% \text{Fibra} = \frac{F \cdot 100}{PA}$$

Onde:

$$F = \{(P+F+C) - P\} - C$$

P=peso do papel

F=fibra

C=cinza, conforme determinado no item 4.1.1

PA=peso da amostra

#### 4.1.6. Determinação de Vitamina C

Para determinação da vitamina C, o método utilizado foi o de Ribeau-Gayon & Peynaud (1971). O procedimento foi realizado tomando-se uma quantidade conhecida da farinha da alga, onde foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 2 M, 1 mL de iodeto de potássio (KI) 10%, 1 mL de amido 1% e 50 mL de água destilada. A titulação foi feita com iodato de potássio ( $KIO_3$ ) 0,1 M. Os cálculos para determinação do teor de vitamina C na amostra foram realizados usando-se a fórmula:

$$\text{Vit. C (mg/100)} = \frac{V \cdot 8,8 \cdot 100}{PA}$$

Onde:

V = volume de  $KIO_3$  0,1 M gasto na titulação

8,8 = mg de ácido ascórbico que reage com 1mL  $KIO_3$  0,1 M

PA = peso da amostra utilizada na determinação

#### 4.1.7. Determinação de Cálcio

A determinação de cálcio, foi obtida usando a metodologia segundo A. O. A. C. (1975). Foram pipetados 25 mL da solução clorídrica (item 4.1.1) em um erlenmeyer e a esta foi adicionado 20 mL da solução de molibdato de amônio 6% e 5 mL de ácido clorídrico 10%. Em seguida, a mistura foi levada para uma chapa aquecedora a 60° C, deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa

Yáskara F.M.Marques Leite

R 13827509

azul. Ao filtrado recolhido em erlenmeyer, adicionou-se 20 mL de solução tampão pH 10,0 para elevar o pH da solução que passou de uma coloração levemente amarela para incolor. Acrescentou-se 20 mL de NaOH 4 M, 5 mL de KCN 0,1 M e 5 mL de trietanolamina 20%. O volume da solução foi elevado até aproximadamente 300 mL com água destilada e, em seguida, foi adicionado pequena porção de indicador Calcon, sendo a titulação realizada com EDTA 0,02 M até a passagem da cor vermelha para azul intenso. O cálculo para a determinação em equivalente grama do cálcio, foi realizado usando-se a fórmula:

$$\%Ca = \frac{V \cdot F \cdot M \cdot 100}{P \cdot 100}$$

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V = volume de EDTA gasto na titulação

P = peso referente à alíquota

M = 0,02

#### 4.1.8. Determinação de Fósforo

A metodologia utilizada foi de acordo com A. O. A. C. (1975), que consiste na transferência para um balão volumétrico (50 mL) ou mais (dependendo da amostra) da solução clorídrica (item 4.1.1). À esta solução foram adicionados 1 mL de hidróxido de amônio (1:1, p/v), 2 mL de ácido nítrico (1:2) e 20 mL de solução de molibdato de vanadato de amônio (molibdato de amônio 2% e vanadato de amônio 0,1%). Para a solução de referência foram adicionados os reagentes, mencionados acima, com exceção da amostra. A leitura foi feita após 30 minutos em espectrofotômetro (Femto 432) a 470 nm e os resultados comparados a uma curva padrão obtida a partir de soluções padrões de fósforo.

*Yáskara F.M.Marques Leite*

#### 4.1.9. Determinação de Ferro

O método utilizado foi de acordo com A. O. A. C. (1975). A determinação foi feita tomando-se 10 mL da solução clorídrica (descrita no item 4.1.1) para um balão volumétrico de 50 mL, sendo adicionados 1 mL de HCl concentrado, 1 mL de cloridrato de hidroxilamina 10%, 5 mL de acetato de amônio 3M e 2 mL da solução de fenantrolina 0,1%. O volume foi completado com água destilada para 50 mL e a leitura de absorbância feita em espectrofotômetro a 510 nm (Femto 432), sendo o resultado comparado a uma curva padrão obtida a partir da solução padrão de ferro.

#### 4.1.10. Determinação de Magnésio

Para a determinação de magnésio foi utilizado o método de acordo com A. O. A. C. (1975), foram pipetados 20 mL da solução clorídrica (item 4.1.1) e a esta foram adicionados 20 mL da solução de molibdato de amônio 6%, 5 mL de ácido clorídrico 10%, sendo a mistura levada para uma chapa aquecedora a 60° C . Em seguida, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado foram adicionados 20 mL de uma solução tampão constituída de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 11,4 M e cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) 1,2 M, pH 10, para elevar o pH da solução, cuja coloração passou de levemente amarela para incolor. Foram, então, adicionados 5 mL de KCN 0,1 M, 5 mL de trietanolamina 20% e 5 gotas de eriocromo negro T como indicador. A titulação foi realizada com EDTA 0,02 M até viragem de cor vermelha para azul.

$$\%Mg = \frac{(V'-V) \cdot F \cdot M. 24. 100}{P. 100}$$

P. 100

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V' = volume de EDTA gasto na titulação

V = volume de EDTA gasto na titulação de cálcio

P = peso referente à alíquota

M = 0,02

#### 4.1.11. Determinação do Valor Calórico Total

Os valores obtidos de carboidrato (C), proteínas (P) e lipídios (L) para a alga marinha *G. ornata* foram utilizados para determinação do valor calórico total, utilizando-se a fórmula descrita abaixo (Fae, 1985):

$$(C \times 4) + (P \times 4) + (L \times 9) = \text{VALOR CALÓRICO TOTAL}$$

#### 4.2. Extração de Proteínas da Alga *G. ornata*

##### 4.2.1. Preparação do Extrato Total

A farinha da alga *G. ornata* obtida por maceração em Nitrogênio líquido foi submetida à extração em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), durante 4 horas sob agitação constante. Após o tempo de contato, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon em seguida centrifugado a 6000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido após centrifugação do extrato total, foi usado para obtenção da F0/70, determinação dos teores de proteínas e da atividade hemaglutinante.

##### 4.2.2. Dosagem de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis foi determinado seguindo o método descrito por Bradford (1976). As absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec III. A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão

---

obtida com albumina sérica bovina. A medida de absorbância a 280 nm foi utilizada para determinação do teor de proteínas nos eluados das colunas cromatográficas.

#### 4.3. Detecção e Quantificação de Componentes Bioativos

##### 4.3.1. Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante no extrato total e nas frações obtidas durante o processo de purificação da lectina de *G. ornata*, foi determinada através de diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8,...) das amostras em tubos de ensaio contendo suspensão dos eritrócitos a 2% testados (tratados com tripsina ou bromelaina na proporção de 0,1 mg /10 mL da suspensão de eritrócitos) e a reação foi mantida a 37°C por 30 minutos, seguida de repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) como descrito por Ainouz *et al.* (1992). O material foi então submetido à centrifugação a 2.000 x g, por 30 segundos. A hemaglutinação foi observada macroscopicamente e expressa em unidade de hemaglutinação por mL (UH/mL).

##### 4.3.2. Inibidor de Tripsina

Para a determinação do inibidor de tripsina foi utilizada a técnica originalmente descrita por Kakade com algumas modificações (Hamerstrand *et al.*, 1981). A farinha da alga *G. ornata* foi suspensa em 1 mL de NaOH 0,01 N, deixada sob agitação constante por 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, em repouso por 30 minutos. Após esse tempo, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes, que foram misturadas com 0,5 mL de NaOH 0,01 N. As soluções resultantes foram centrifugadas a 14.000 x g, por 5 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 0,1 mL dessas soluções foram retiradas e incubadas a 37° C em um meio de reação que consistia de 1,6 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM, 0,1 mL de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 mL de HCl 0,001 N) e o substrato  $\alpha$ -N-Benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). A reação foi interrompida com 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os

---

resultados foram calculados considerando a curva obtida com inibidor de tripsina tipo Kunitz de soja padrão (SBTi) e expressos como a quantidade em mg de tripsina inibida (UI) por g de farinha.

Para dissolução de 10 mg do BAPNA foram usados, primeiramente, 0,5 mL de dimetilsulfóxido que, por sua vez, foi agitado em vortex até a completa dissolução do substrato. Em seguida, o volume foi completado para 1 mL com água milli-Q, sendo esta solução novamente agitada e usada imediatamente.

#### 4.3.3. Urease

A determinação da atividade ureásica foi feita como descrito por Kaplan (1969), com algumas modificações (Vasconcelos *et al.*, 1997). Alíquota de 0,1 mL de uma solução de uréia 500mM foi misturada com 0,7mL de EDTA 2% tamponado com tampão fosfato de sódio 20mM, pH6,5. Após adição de 0,2mL do extrato bruto (preparado com tampão TB, usando o mesmo protocolo previamente descrito), a mistura foi incubada a 37°C, por 15min. A seguir, foram adicionados à mistura 1mL da solução A (62g de fenol + 0,25g de nitroprussiato de sódio/L) e 1mL da solução B (43mL de hipoclorito de sódio 5,25% + 20g de hidróxido de sódio/L), sendo, então, deixada a 37°C por mais 5min. Passado esse tempo, foram adicionados 7mL de água deionizada aos tubos, sendo estes cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva obtida com urease comercial (Sigma 41H7008-870.000 U/g).

#### 4.3.4. Atividade Tóxica da Lectina

A avaliação da toxicidade foi feita em camundongos swiss fêmeas pesando entre 18 e 20 g, através da via intravenosa. Neste ensaio foram usadas 6 doses, sendo que uma delas correspondia à menor quantidade de proteína ainda capaz de causar 100% de letalidade e uma outra que continha a maior quantidade de proteína incapaz de induzir toxicidade aguda. As outras quatro doses intermediárias encerravam teores que causavam a letalidade

dos animais no intervalo de 0 a 100%. Para cada dose, foram usados, no mínimo, 6 animais relacionando a dose com o peso (Litchfield & Wilcoxon, 1949). A existência de atividade tóxica foi considerada quando se observou mortalidade em camundongo no período de até 30 minutos, após injeção intravenosa, da amostra testada. Uma unidade DL<sub>50</sub> (Vasconcelos *et al.*, 1994) foi definida como a quantidade de proteína (em g / kg de peso corpóreo) capaz de causar convulsão e morte em 50% dos animais testados.

#### 4.4. Purificação da Lectina de *G.ornata*

##### 4.4.1. Precipitação das Proteínas do Extrato Total com Sulfato de Amônio

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio até 70% de saturação deu-se a partir do extrato total, obtido de acordo com o item 4.2.1. O material foi deixado em contato por um período de 4 horas e, em seguida, centrifugado a 6.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspense em tampão TB e dialisado exaustivamente contra água. Após a diálise o material (F0/70) foi empregado para dar continuidade aos procedimentos de purificação da lectina. O esquema geral de isolamento está representado na Figura 1.

##### 4.4.2. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE - Celulose

A F0/70 da alga *G. ornata* obtida por precipitação com sulfato de amônio, foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose. A coluna medindo 13,5 x 1,6 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB). A F0/70, previamente dialisada contra tampão de equilíbrio, foi aplicada à coluna e, após a eluição da fração não adsorvida à matriz (PI-DEAE), uma segunda fração (PII-DEAE) foi eluída através da aplicação de tampão TB contendo NaCl 0,5 M. Durante a cromatografia, foi mantido um fluxo constante de 30 mL/hora, coletadas frações de 3 mL/tubo e as absorvâncias medidas a

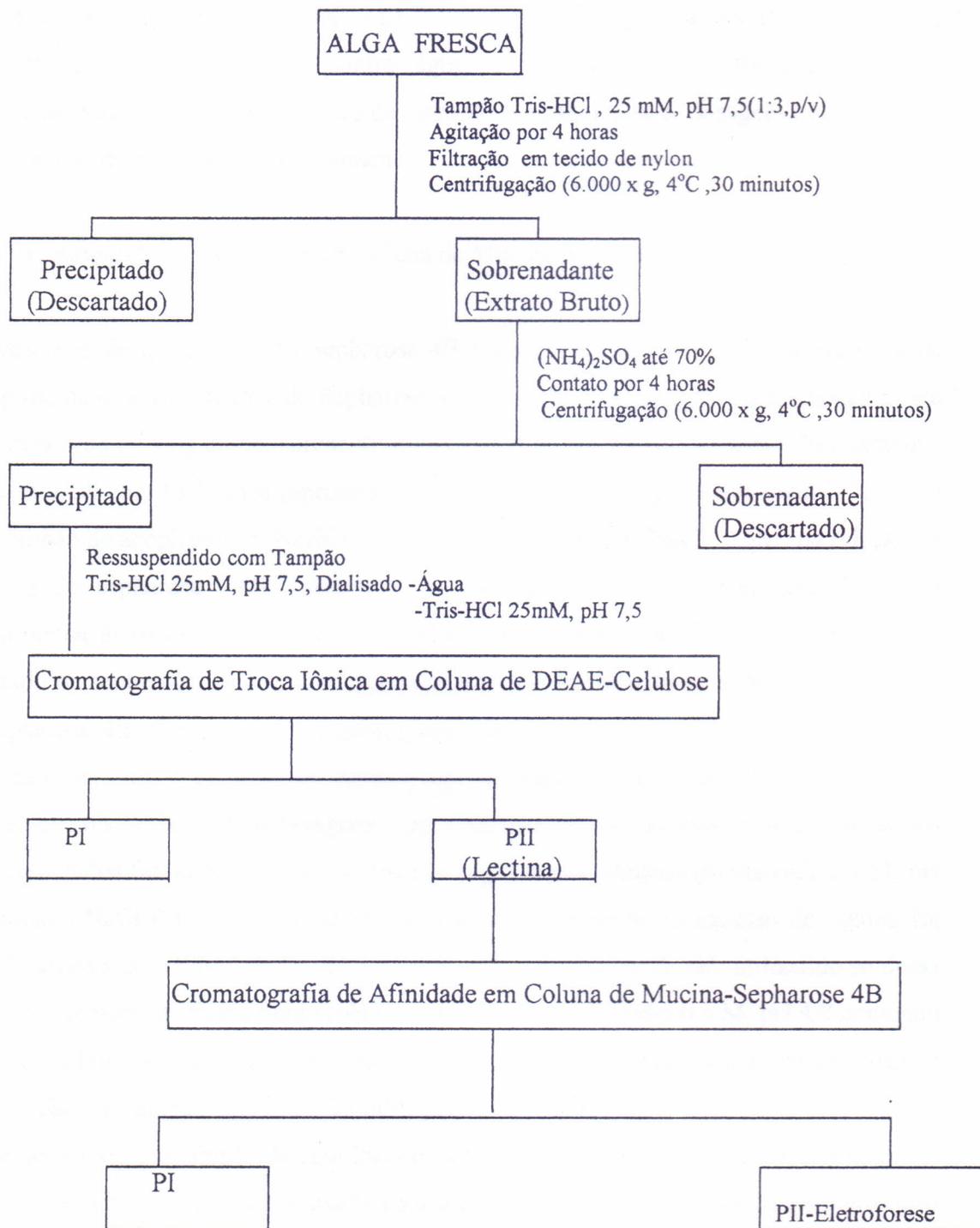


Figura 01-Esquema de extração e purificação da lectina presente na alga marinha *G.ornata*.

280 nm (espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec III). As frações ativas obtidas (PI e PII–DEAE) foram dialisadas contra água, concentradas por liofilização parcial e novamente dialisadas contra o tampão de extração e usadas para a dosagem de proteínas e determinação da atividade hemaglutinante.

#### 4.4.3. Cromatografia de Afinidade em coluna de Mucina-Sepharose 4B

A preparação do gel de mucina-Sepharose 4B foi realizada fazendo-se o acoplamento da glicoproteína mucina à matriz de Sepharose 4B ativada com Brometo de Cianogênio, em uma proporção de 1,0g da Sepharose 4B ativada para 2,0mg da glicoproteína. Inicialmente, lavou-se o gel com HCl 1mM (aproximadamente 200 mL/ g de gel) e em seguida lavou-se com tampão de acoplamento (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 8,3, contendo NaCl 0,5M) na relação de 1:5 ( g de sepharose 4B seca /mL de tampão). Posteriormente, adicionou-se a glicoproteína dissolvida no tampão de acoplamento na proporção 1:2, v/v (1 mL do gel hidratado de sepharose 4B/2 mL do ligante dissolvido em tampão de acoplamento) ao gel de Sepharose 4B. O material permaneceu em contato por 16 horas no misturador a 4°C. Após este período, o excesso de mucina, não acoplado à matriz de Sepharose 4B, foi retirado através de sucessivas lavagens com o tampão de acoplamento e os grupos ativos não preenchidos foram bloqueados lavando-se o gel com o tampão glicina-HCl 0,2 M, pH 8, contendo NaCl 0,15 M por 2 horas à temperatura ambiente. O excesso de ligante foi retirado através do tratamento do gel com três ciclos alternados de pH, utilizando-se dessa forma, os tampões de acoplamento (pH básico) e o acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0 contendo NaCl 0,15 M (ácido). A coluna foi montada através da sedimentação do gel por gravidade e equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M. A F0/70 após diálise com o mesmo tampão de equilíbrio foi aplicada à coluna a um fluxo constante de 36 mL/h (3 mL/tubo). A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio para eluição da fração não retida. O material retido foi eluído com uréia 4 M. As frações protéicas foram lidas a 280 nm (espectrofotômetro LKB - Ultraspec III) e os picos obtidos dialisados exaustivamente contra água e concentrados parcialmente por liofilização. Os picos após concentração por liofilização foram novamente dialisados (Tris-HCl) e usados para

dosagem de proteínas e determinação da U.H e da atividade tóxica por via intravenosa (iv.) em camundongos.

#### 4.5. Caracterização da Lectina de *G. ornata*

##### 4.5.1. Termoestabilidade da Atividade Hemaglutinante

A estabilidade térmica da atividade hemaglutinante da lectina purificada de *G. ornata* foi determinada pela incubação de alíquotas da amostra em banho-maria às temperaturas de 50, 70 e 90° C. Nos intervalos de 10, 20 e 30 minutos, alíquotas de 3 mL foram retiradas, centrifugadas e submetidas à dosagem de proteínas e de atividade hemaglutinante.

Na determinação do  $\Delta G'$  de ativação do processo de desnaturação foi calculada, inicialmente, a constante de velocidade da reação ( $K_1$ ), determinada através da inclinação da reta obtida de acordo com a expressão:

$$K_1 \times T = -\ln A / A_0$$

Sendo:

A – atividade hemaglutinante residual,

$A_0$  – atividade hemaglutinante inicial,

T – tempo em segundos.

A constante de velocidade da reação está relacionada com a energia livre padrão do estado ativado pela fórmula (Dawes, 1979):

$$\Delta G' = RT \times \ln kT / k_1 h$$

Onde:

R – constante dos gases (1,9869 atm . °K . mol<sup>-1</sup>),

T – temperatura absoluta (°K),

$k$  – constante de Boltzmann ( $1,37 \times 10^{-16}$  ergs .  $^{\circ}\text{K}^{-1}$ )

$k_1$  – velocidade da reação,

$h$  – constante de Planck ( $6,25 \times 10^{-27}$  ergs . Seg $^{-1}$ )

#### 4.5.2. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Para os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do PII da Mucina (lectina) foram pipetadas em tubos de ensaio contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8,...) a partir de soluções estoques de açúcares simples na concentração de 0,1 M e glicoproteínas encerrando 5 mg/mL. Os tubos permaneceram 60 minutos à temperatura ambiente e após este período foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de eritrócitos de coelho tratados com tripsina e diluídos a 2%, deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e, finalmente centrifugados a 2000 x g por 30 segundos. A especificidade da lectina foi determinada observando-se os açúcares ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar inibição.

A técnica para o tratamento enzimático dos eritrócitos foi estabelecida por Lis & Sharon (1972). Primeiramente, amostras de 1 mL de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 150 mM e, em seguida, adicionada tripsina na relação de 0,1 mg de enzima para 10 mL da suspensão de eritrócitos. A suspensão foi deixada em repouso por 1 hora, 4°C, sob agitação ocasional, e centrifugada a 3000 x g, por 5 minutos. Os eritrócitos foram novamente lavados (6 vezes) com NaCl 150 mM e o “pellet” de células resultante suspenso em um volume de NaCl 150 mM para obtenção de hemácias a 2%.

#### 4.5.3. Efeitos de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante

Amostras do extrato total foram submetidas a desmetalização através de diálise contra EDTA 5mM, por 18 horas a 4°C. Alíquotas do extrato dialisado foram utilizadas em ensaios de hemaglutinação, na ausência e presença de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  ambos a 5 mM. Os

resultados foram comparados com um controle, onde o extrato bruto não havia sido dialisado contra EDTA.

#### 4.5.4. Espectro de Absorção

O espectro de absorção no infravermelho da lectina foi realizado na faixa de comprimento de onda entre 200 a 400 nm em intervalos de 20 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec III de duplo feixe. A solução de lectina empregada (PII-Mucina) encerrava uma concentração de 1 mg de proteína/mL de água destilada. Durante o processo de leitura das absorbâncias o espectrofotômetro foi zerado a cada mudança no comprimento de onda, utilizando como referência a água.

#### 4.5.5. Composição de Aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da lectina de *G. ornata*, foi determinada com o auxílio de um analisador de aminoácidos do tipo Biocrom 20 Pharmacia LKB. Após hidrólise da amostra em ampola selada sob atmosfera de Nitrogênio em presença de HCl 6 M contendo 1% de fenol (m:v) a 110° C por 24 horas. A ampola foi aberta e o HCl e fenóis eliminados sob pressão reduzida em presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, seguido de lavagens sucessivas com água Mille Q. A amostra após secagem foi redissolvida em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtrada em membrana de 45µm (millepore) e submetida à análise de aminoácidos. Os aminoácidos foram determinados pelo método Spackman et al. (1958), modificado e adaptado para o uso do sistema Biochron 20 da Pharmacia LKB. O triptofano foi determinado segundo a metodologia descrita por Goodwin e Morton (1964), modificado por Beaven e Holiday e descrito por Moreira & Perrone (1977). Após a incorporação de NaOH 0,1 M na amostra, suas absorbâncias foram determinadas nos comprimentos de onda de 280 e 294 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec. O teor de triptofano foi determinado pela equação abaixo, utilizando-se o valor de tirosina obtido pela cromatografia de aminoácidos no sistema Biochrom 20.

$$M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}} = (0,592 \times A_{294} - 0,263 \times A_{280}) / (0,263 \times A_{280} - 0,170 \times A_{294})$$

#### 4.5.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol

O PII da Mucina foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol, segundo o método descrito por Laemmli (1970) adaptado para o uso em sistema Multiphor Eletrophoresis II Pharmacia LKB 2117.

Para a montagem das placas, foi usado um gel de concentração (3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl  $3 \times 10^3$  mM, pH 8,8) e um gel de separação (acrilamida 12,5% dissolvida em tampão Tris-HCl  $3 \times 10^3$  mM, pH 8,8). As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 10mM, pH8,8, contendo glicerol a 26%, SDS 1%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol. Em seguida, a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos. Aliquotas de 20  $\mu$ L foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de concentração. A corrida eletroforética conduzida a uma corrente constante de 40 mA por um período de aproximadamente 180 minutos. As bandas protéicas obtidas, foram reveladas mediante coramento com solução Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% em metanol, ácido acético e água (4:0,7:5,3,v/v/v) por um período de 18 horas. O descoramento foi realizado em uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1:8,0, v/v/v). Proteínas de massas moleculares conhecidas: albumina sérica bovina (67,0 KDa), ovalbumina (45,0 KDa), gliceraldeído-3-P-desidrogenase (36,0 KDa), anidrase carbônica (29,0 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 KDa), foram usadas como marcadores de massa molecular.

#### 4.5.7. Dosagem de Carboidratos Solúveis

A técnica descrita por Dubois *et al.* (1956) foi empregada para determinação de carboidratos na lectina purificada de *G. ornata*. As absorbâncias foram lidas a 490 nm em espectrofotômetro Pharmacia LKB – Ultrospec III. A concentração de carboidratos solúveis foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com glicose.

#### 4.5.8. Análise da Identificação de Carboidratos em Sistema Descendente de Papel

A análise da identificação de carboidratos estruturais na lectina de *G. ornata* por cromatografia em sistema descendente de papel foi realizada segundo a metodologia descrita por Trevelyan *et al.* (1950). A glicoproteína [lectina] (3 mg / 300 µL de H<sub>2</sub>O), foi submetida à hidrólise ácida por 2 h. Em seguida o resíduo resultante da hidrólise foi lavado com água destilada e colocado para secagem em dessecador contendo pastilhas de NaOH. A cromatografia do hidrolisado foi realizada em papel Whatman N° 1 utilizando o sistema de solvente: Butanol:piridina:água (5:3:1,v/v/v) e em seguida submetido à revelação com Nitrato de prata.

#### 4.5.9. Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100

O PII da Mucina foi submetido à determinação da massa molecular da proteína na forma nativa por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100. A coluna medindo 64,5 x 1,3 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão TB contendo NaCl 0,15 M. Para aplicação da amostra (PII-Mucina) na matriz cromatográfica, fez-se uso de 1,5 mg de proteína ressuspensa e eluída no mesmo tampão de equilíbrio da coluna. Durante todo o processo manteve-se um fluxo constante de 24 mL por hora, sendo coletadas frações de 2 mL que tiveram suas absorbâncias monitoradas a 280 nm. Na calibração prévia da coluna foram utilizados os seguintes padrões protéicos: ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (29 KDa) e ribonuclease (13,70 KDa).

#### 4.5.10. Eletroforese Bidimensional da Lectina de *G. ornata*

A lectina purificada de *G. ornata* foi submetida à eletroforese bidimensional, seguindo a metodologia descrita por Sousa (1999) para determinação do seu ponto isoelétrico. A focalização isoelétrica da lectina (1ª dimensão-horizontal), foi realizada

utilizando-se uma tira de gel de poliacrilamida (IPG) contendo um gradiente de pH imobilizado (pH variando de 3 a 10) e de comprimento 110,0 x 3,0 x 0,5 mm (Pharmacia). No experimento de eletroforese (2ª dimensão-vertical) foi utilizado um gel de separação contendo 15% do monômero de poliacrilamida. Para a focalização isoeletrica foi realizada a reidratação prévia da tira de IPG através da adição da solução de reidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, Triton X-100 1%, Pharmalyt 3-10 0,5%, traços de Azul de Bromofenol). Em seguida 200 µL da solução de lectina (1mg/250 µL da solução de reidratação) foram colocados em contato com o gel da tira de IPG na cuba do sistema de Reswelling Tray (Pharmacia) que foi posteriormente coberto com 500µL de óleo mineral a fim de evitar a cristalização da uréia e incubado "over night". Passado este período, a tira de IPG foi removida da cuba e lavada com água milli-Q para eliminar o excesso do óleo mineral. A focalização isoeletrica da lectina (corrida em 1ª dimensão - horizontal) foi então realizada no gel de IPG utilizando-se o sistema Multiphor II (Pharmacia) onde, foi inicialmente aplicada uma voltagem de 300V/2mA por 1 minuto, seguida de uma voltagem de 3500V/2mA por 4 horas. Após a corrida de focalização isoeletrica a tira de IPG foi removida do sistema, equilibrada com uma solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30% uréia 6M, SDS 2% e traços de azul de bromofenol) contendo DTT (19,2 mg/mL), por 15 minutos para a manutenção da lectina focalizada na forma desnaturada. A tira de IPG foi então colocada sobre o gel de poliacrilamida a 15% para a transferência da lectina focalizada e corrida eletroforética em 2ª dimensão(vertical) que foi iniciada a uma voltagem de 500V/10mA durante 15 minutos e seguida de uma voltagem de 500V/20mA por mais 4,30 horas. Após a corrida eletroforética o gel foi removido da placa e a lectina revelada mediante o tratamento com Coomassie R-250.

#### 4.6. Avaliação Histológica dos Efeitos da Lectina nos Órgãos de Camundongos

A avaliação histológica dos efeitos da lectina quando injetada por via intravenosa (iv.) em camundongos foi realizada segundo a metodologia de Junqueira & Junqueira (1983) cujas etapas são descrita a seguir.

Os fragmentos de cada órgão (fígado, rins, coração, estômago, baço e intestino) foram cortados em cubos de 1 cm e logo após foram imersos em formol tamponado a 10%. Os blocos produzidos foram seccionados numa espessura de 5 µm e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas confeccionadas foram examinadas ao microscópio ótico para observação dos parâmetros histológicos, em objetiva de X100 e X400.

#### 4.7. Avaliação da Atividade Inseticida

##### 4.7.1. Avaliação da Atividade Inseticida do Extrato Bruto, F0/70 e PII-DEAE, da Alga *G. ornata*

Os experimentos para a avaliação da atividade inseticida da alga *G. ornata* contra gorgulho (*C. maculatus*) foram conduzidos com o extrato bruto, a F0/70 e o PII da DEAE, usando-se o seguinte procedimento experimental.

##### 1ª ETAPA: Obtenção e produção dos insetos

Os insetos foram obtidos da variedade comercial de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp ] adquiridas em Fortaleza - CE, sendo classificado como *C. maculatus*. No laboratório, os insetos foram mantidos em sementes de feijão-de-corda, dentro de recipientes de vidro vedados com um tecido poroso, acondicionados em câmara de crescimento do tipo BOD, a 27° C ± 1° C, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e umidade relativa do ar em torno de 80% (Figura 2).

##### 2ª ETAPA: Preparação da farinha

Sementes de feijão-de-corda (EPACE-10) foram selecionadas de modo que apresentassem tegumentos íntegros, livres de injúria física ou mecânica e ausentes de vestígios visíveis de contato com insetos ou microorganismos (ovos, orifícios ou outros

Yáskara F.M.Marques Leite

sinais típicos). Para obtenção da farinha, as sementes, livres de tegumentos, foram trituradas em um processador e pulverizadas com auxílio de um pistilo.

### 3ª ETAPA : Ensaio biológico

Para o ensaio de avaliação da atividade inseticida (toxicidade), sementes artificiais foram preparadas contendo farinha de feijão-de-corda (dieta padrão); farinha de feijão de corda contendo extrato bruto, F0/70 e PII-DEAE da alga liofilizados (dietas experimentais). As amostras testes homogeneizadas com a farinha de feijão de corda foram usadas nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 , 1,0 e 2,5%(p/p). No grupo controle, assim como nos grupos experimentais, foram utilizadas 3 repetições, cada uma constituída de 10 sementes artificiais. Após pesagem, as sementes foram mantidas em recipientes de plástico com tampas perfuradas e acondicionadas em câmara de crescimento (Figura 2). As condições de ensaio (fotoperíodo, temperatura e umidade relativa do ar) foram as mesmas descritas anteriormente.

Dois a três dias após a emergência dos insetos, as fêmeas foram separadas dos machos por um período de 24 horas e postas para infestar as sementes artificiais (2 fêmeas para cada grupo de 10 sementes). Em todos os tratamentos foram comparados os seguintes parâmetros: percentagem de emergência das larvas; sobrevivência larval; peso médio dos adultos recém-emergidos e tempo médio do ciclo (ovo a adulto). As larvas que eclodiram das sementes foram contadas e pesadas diariamente.

#### 4.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey, usando o programa MSTATC.

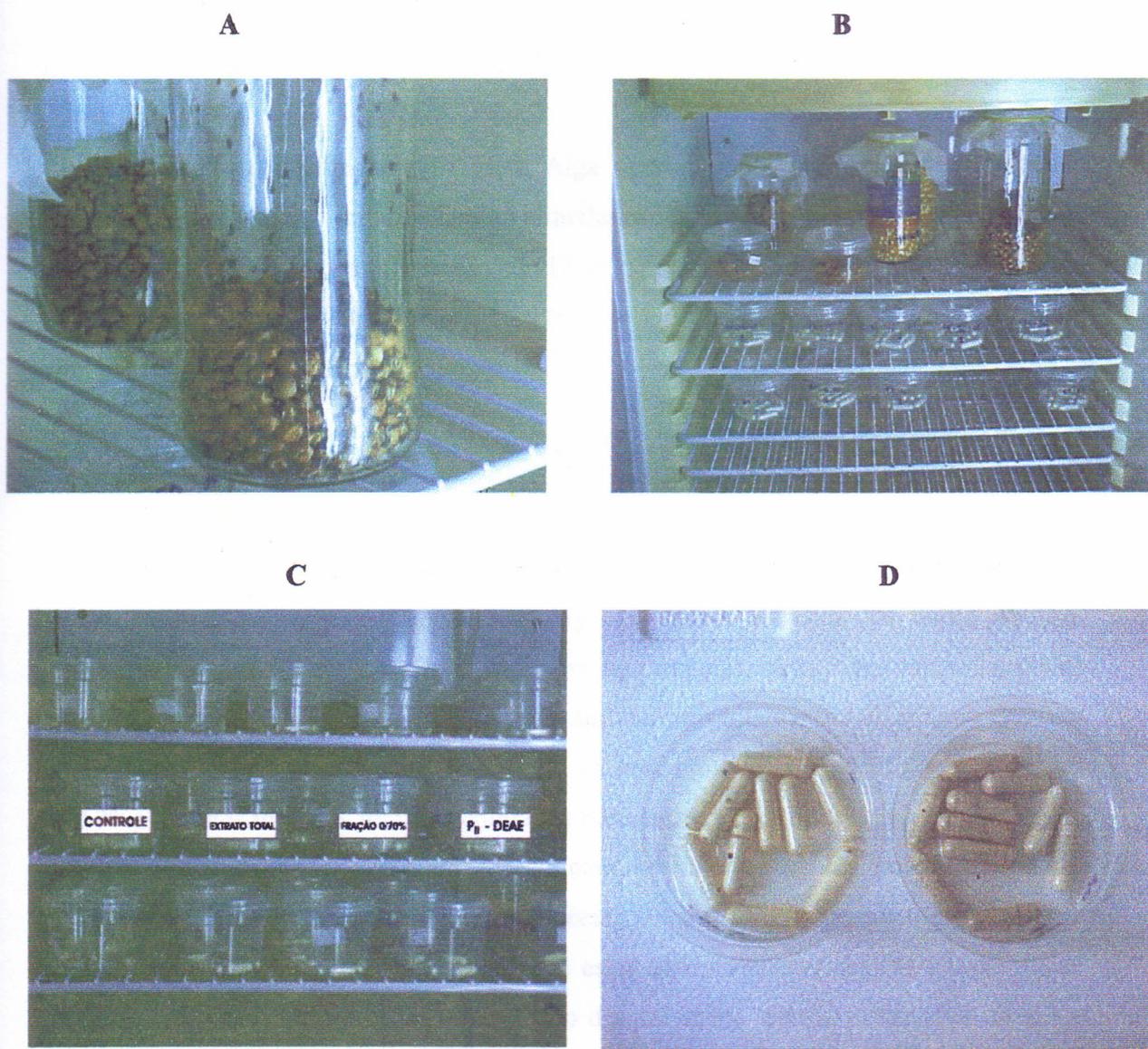


Figura 02 – Avaliação da atividade inseticida das frações ( Extrato bruto, F0/70 e PII – DEAE) para *Callosobruchus maculatus* (gorgulho). (A) Manutenção dos insetos em sementes de feijão-de-corda; (B) Acondicionamento das sementes e insetos; (C) Infestação das sementes artificiais com gorgulho e (D) Sementes artificiais contendo as amostras testadas e ovoposição .

Yáskara F.M.Marques Leite

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Caracterização da Alga Marinha *G. ornata*.

De acordo com Schnetter (1979), a Alga marinha *G. ornata*, pertence à divisão Rhodophyta, ordem Gracilariales, família Gracilariaceae e gênero *Gracilaria*. Esta espécie apresenta-se com um tamanho médio de 12 cm, fixada ao substrato rochoso por um pequeno gancho discoidal. Sua coloração tem forte tendência a cor púrpura e sua forma é composta por várias ramificações (Figura 3).

### 5.2. Composição Química

A Tabela 1 mostra a análise da composição química elementar (cinzas, proteínas, lipídio, carboidratos, fibra e minerais) da alga *G. ornata*. Através dos dados obtidos, verifica-se que houve uma variação significativa nos teores de cada constituinte. Dentre os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos totais e fibras, pode-se destacar os elevados teores de umidade (63,40%), carboidratos totais (45,61%) e proteínas (17,50%). Valores menores foram encontrados para cinzas (3,50%), fibra (2,50%) e lipídio (0,89%). Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por Benevides *et al.*(1998a), quando analisaram diferentes espécies de algas marinhas no litoral cearense pertencentes a divisão Rodophyta, sendo que estes componentes químicos podem sofrer alterações nas suas concentrações dependendo das variações sazonais ocorridas no meio. Benevides *et al.*(1999), observaram que os níveis de cinzas, carboidratos, lipídio e proteínas solúveis apresentaram variações específicas ao longo do ano para as espécies estudadas *G. domigensis* e *Gelidium pusillum* e Zavodnick (1987) observou este mesmo comportamento para as espécies *Ulva rígida* e *Porphyra leucosticta*. Dentre os minerais analisados a partir das cinzas, o cálcio e o magnésio apresentaram-se em maiores proporções (0,82% e 0,15% respectivamente). Esses teores são concordantes com os obtidos por Pereira (2000) para a alga verde *Ulva fasciata*. Com relação ao teor de vitamina C foi obtida uma concentração de 17,40 mg/100g concentração é considerada baixa

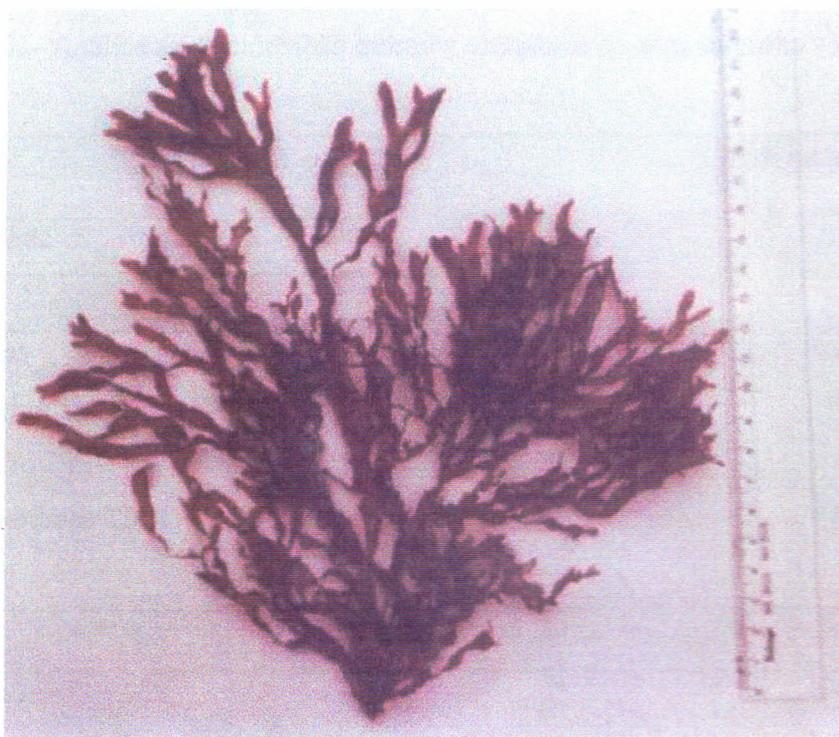


Figura 03: Alga marinha vermelha *G. ornata* (Schnetter)

Tabela 01- Análise da composição química elementar da alga marinha *Gracilaria ornata*

Constituinte	Teor na amostra %
Umidade	63,40
Base Seca	
Cinzas	3,50
* Proteína Total	17,50
Lipídio	0,89
** Carboidrato Total	45,61
Fibra	2,50
Minerais nas cinzas	
Cálcio	0,82
Magnésio	0,15
Fósforo	0,11
Ferro (mg/100g da amostra)	24,80
Vitamina C (mg / 100g de amostra)	17,40
Valor Calórico total (Kcal / 100g)	380,45

\* Nitrogênio total x 6,25

\*\* Obtido por diferença

---

quando comparada com a obtida por Pereira (2000) para a alga que *U. fasciata* que foi considerada uma rica fonte de vitamina C (166 mg / 100g de alga).

### 5.3. Atividade Hemaglutinante

O extrato bruto da alga *G. ornata* foi submetido à determinação da atividade hemaglutinante usando-se eritrócitos a 2% (humano sistema ABO, coelho e galinha) nativos e tratados enzimaticamente com as enzimas tripsina e bromelaína. Os eritrócitos de galinha e coelhos tratados com tripsina foram os que apresentaram maior sensibilidade à aglutinação e com a mesma intensidade (64 UH/mL), os eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente com tripsina passaram a ser utilizados nos ensaios posteriores de atividade hemaglutinante (Tabela 2). Em se tratando de lectinas de algas marinhas em geral, estas são mais sensíveis à aglutinação por eritrócitos de coelho, principalmente quando tratados com enzimas proteolíticas (Ainouz *et al.*, 1992; Silveira, 2001). Entretanto, várias espécies de algas marinhas aglutinaram preferencialmente eritrócitos humanos do grupo "O", como a lectina da alga marinha verde *Ulva fasciata* (Pereira, 2000) e as lectinas das algas marinhas vermelhas, *Enantiocladia duperreyi* (Benevides *et al.*, 1998b) e *Vidalia obtusiloba* (Melo, 2000).

### 5.4. Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante:

A atividade hemaglutinante presente na F0/70 da alga marinha *G. ornata* não mostrou dependência pelos íons metálicos testados  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , quando submetida a desmetalização com o agente quelante EDTA. A dependência de cátions divalentes foi observada para algumas lectinas, principalmente lectinas de plantas superiores. Porém, para lectinas de algas marinhas esta é uma característica rara, considerando o fato de que a maioria das lectinas de algas não requerem a presença destes íons para exercerem as suas atividades biológicas (Rogers & Hori, 1993).

Tabela 02- Atividade hemaglutinante da F0/70 de *G. ornata* para diferentes eritrócitos tratados enzimaticamente com tripsina e bromelaína

ERITRÓCITOS	Atividade Hemaglutinante (UH/mL)	
	Tripsina	Bromelaína
Galinha	64	-
Coelho	64	-
A	-	-
B	-	-
O	-	-

(-) Ausência de atividade hemaglutinante

---

### 5.5. Termoestabilidade da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante presente na F0/70 de *G. ornata*, quando testada após o tratamento térmico nas temperaturas de 50, 70, 90 e 75 90% da atividade quando aquecida a 100°C por 10 minutos e sendo completamente inativada a 100°C durante 30 minutos (Figura 4). O  $\Delta G'$  de ativação do processo de desnaturação da lectina de *G. ornata* foi de 27,35Kcal/mol a 100°C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para as lectinas das algas Rodophytas *Enantiocladia duperreyi* (Benevides *et al.*, 1998b) e *Pterocladia capillacea* (Oliveira *et al.*, 2002) e para a alga verde *Ulva fasciata* (Pereira, 2000).

### 5.6. Purificação da Lectina

#### 5.6.1. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE – Celulose

A purificação da lectina da alga *G. ornata* foi obtida por aplicação da fração protéica F0/70 em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE–Celulose (Figura 05). O perfil cromatográfico obtido, mostrou a existência de dois picos pigmentados. O primeiro pico (PI) de coloração púrpura intensa, não retido na coluna e desprovido de atividade hemaglutinante, foi eluído com tampão TB e um segundo pico (PII), retido na coluna com coloração rosada, eluído com tampão TB contendo NaCl 0,5M, encerrando toda atividade hemaglutinante. Este passo foi importante para remover grande quantidade de pigmentos presentes na F0/70, clarificando o material para uma posterior aplicação em cromatografia de afinidade. O emprego de cromatografias em matrizes trocadoras de íons, representa um passo importante em muitos protocolos de purificação de lectinas de algas marinhas. Grandes quantidades de pigmentos e outros tipos moleculares presentes tanto no extrato bruto quanto na fração salina (sulfato de amônio), são parcial ou totalmente removidos pelo uso desta técnica, facilitando etapas posteriores. Esse tipo de cromatografia, quando utilizado por Ainouz *et al.*, (1995), constituiu-se no passo final de

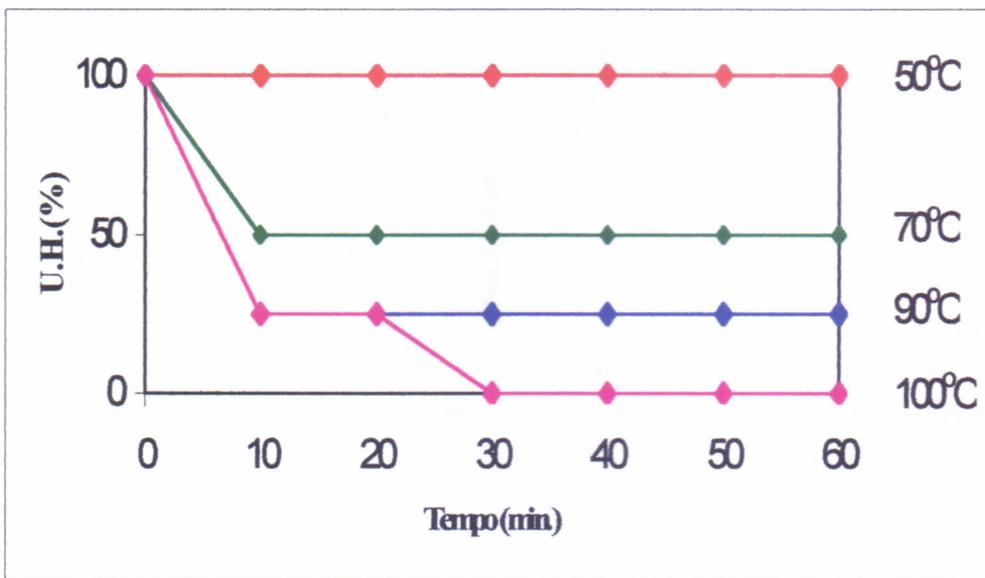


Figura 04– Termoestabilidade da atividade hemaglutinante na F0/70 da alga *G. ornata*

◆ 50°C , ◆ 70°C , ◆ 90°C , ◆ 100°C.

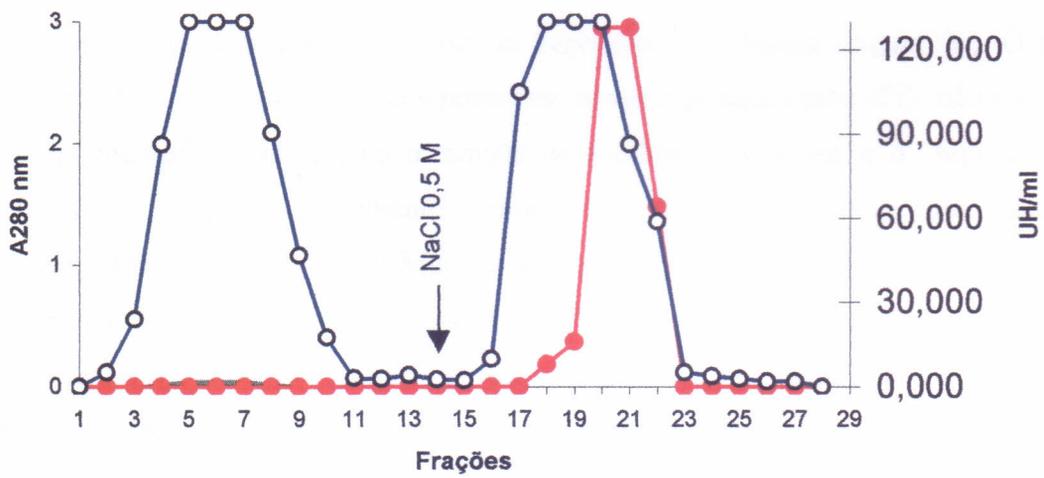


Figura 05- Cromatografia de troca iônica da F0/70 em coluna de DEAE-Celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5. O primeiro pico (PI-DEAE) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII-DEAE) eluído com tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M. ( ○—○ ) A<sub>280nm</sub>; ( ●—● ) UH/mL.

---

isolamento da lectina presente nas algas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*. Outras lectinas de algas marinhas obtidas das espécies *G. verrucosa* (Shiomi *et al.*, 1981), e *Ulva lactevirens* (Sampaio, 1996), também foram isoladas empregando essa técnica como um dos passos do processo de purificação.

#### 5.6.2. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B- Mucina

A fração protéica contendo toda atividade hemaglutinante (PII-DEAE) foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-Mucina (Figura 06). O perfil cromatográfico apresentou dois picos protéicos, sendo o primeiro pico (PI) não retido na coluna, pigmentado e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna e o segundo pico protéico (PII), ausente de pigmento, retido na coluna e encerrando toda atividade hemaglutinante (Figura 6). O PII-Mucina apresentou uma atividade específica de 28,6 UH/mgP e uma purificação de 7,3 vezes em relação ao extrato total (Tabela 3). O PII ativo oriundo da DEAE-Celulose quando aplicado a coluna de afinidade, mostrou uma forte interação da lectina com a glicoproteína mucina, visto que essa interação (lectina-glicoproteína) só foi rompida por eluição com um agente desnaturante forte (uréia-4M), confirmando assim a inibição obtida nos ensaios de especificidade da lectina. As forças envolvidas na ligação da lectina à matriz de afinidade incluem as eletrostáticas, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Esta forte interação de lectinas de algas marinhas por resinas de afinidade foi reportado por Okamoto *et al.* (1990) no extrato aquoso de *G. bursa-pastoris*, bem como por Neves (2001), durante o isolamento da lectina de *G. caudata* por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-mucina.

#### 5.7. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante:

A atividade hemaglutinante do PII (lectina) obtido por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-Mucina de *G. ornata*, não foi inibida pelos açúcares simples testados a uma concentração de 50 mM, mas foi inibida pelas glicoproteínas mucina de porco, apotransferina, asialofetuína e tiroglobulinas de boi e de porco em

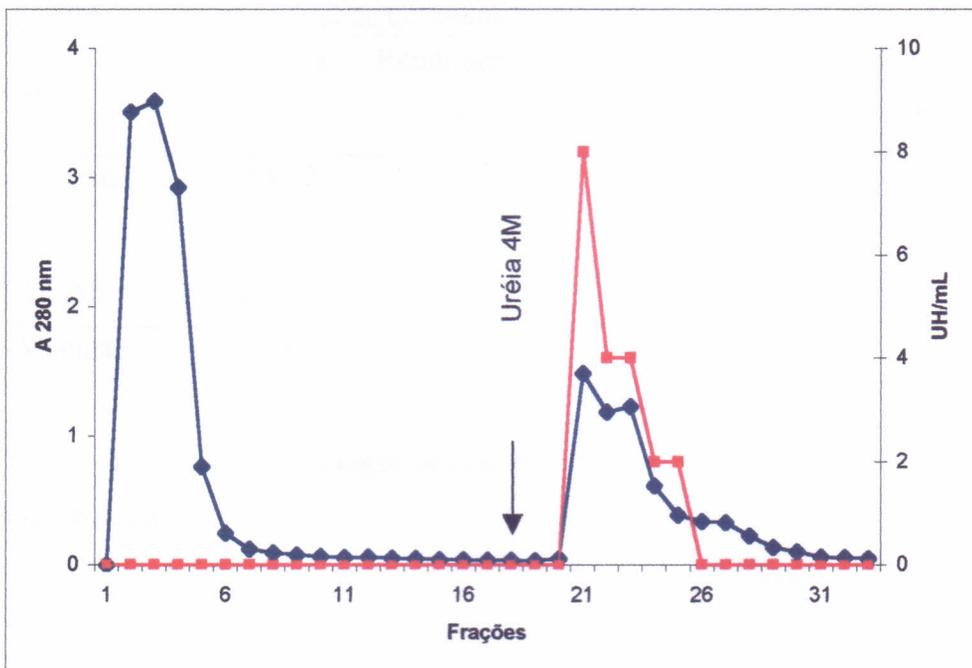


Figura 06- Purificação da lectina de *G. ornata* por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-Mucina. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. O pico retido foi eluído com uréia 4M. Coluna: 8,0 x 0,8 cm. Frações : 3,0 mL/tubo ( ●—● ) A<sub>280nm</sub>; ( ●—● ) UH/mL.

Tabela 03– Purificação da lectina de *G. ornata*

Frações	Proteína (mg)	Rendimento %	Atividade Hemaglutinante		Purificação (x)
			UH Total *	Específica**	
Extrato Bruto	2683,2	100	10400,0	3,9	1,0
F <sub>070</sub>	1318,2	49,1	7104,0	5,4	1,4
PII-DEAE	231,0	8,6	1527,4	6,6	1,7
PII-Mucina	3,06	0,1	88,7	28,6	7,3

\* U.H. Total – Unidades de Hemaglutinação Total

\*\* UH/mg de proteína

---

diferentes concentrações, tendo as glicoproteínas asialofetuína e tiroglobulina de porco apresentado maiores intensidades de inibição (Tabela 04). Estudos de especificidade por açúcares simples e glicoproteínas de lectinas de algas marinhas, têm revelado que a grande maioria delas não apresentam afinidade por monossacarídeos, como a maioria das lectinas isoladas de plantas terrestres. As lectinas de algas são, em geral, mais específicas para oligossacarídeos complexos e muitas vezes por glicoproteínas (Rogers & Hori,1993). A lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* (Costa,1999) mostrou especificidade somente por estruturas glicoprotéicas complexas, tais como: avidina, manana de levedura e fetuína.

## 5.8.Caracterização Físico-Química da Lectina

### 5.8.1. Espectro de absorção no ultra violeta da Lectina de *G. ornata*

O espectro de absorção no ultra violeta de uma solução da lectina de *G. ornata* na concentração de 1 mg/mL, apresentou uma absorção máxima a 280 nm, sendo o cálculo obtido para o coeficiente de absorção  $1_{cm} E^{1\%}$  a 280 nm de 7,26 (Figura 7). O valor encontrado foi semelhante aos obtidos para as algas marinhas *Amansia multifida* (Costa,1999) e *Meristiella echinocarpa* (Farias,1995), *Enantiocladia duperreyi* (Benevides et al., 1998b) e *Pterocladia capillacea* (Oliveira et al., 2002).

### 5.8.2. Massa Molecular por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol:

A lectina de *G. ornata* purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4 B-Mucina, quando submetida a eletroforese em condições desnaturantes por PAGE-SDS em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, revelou a presença de uma única banda, com massa molecular de 17 KDa, estimada por regressão linear tendo por base padrões protéicos de massas moleculares conhecidas (Figura 8). O resultado da massa molecular obtido confirma a tendência das lectinas de algas geralmente possuem massas

Tabela 04- Inibição da atividade hemaglutinante presente na lectina de *G. ornata* por açúcares simples e glicoproteínas.

Açúcar / Glicoproteína	Concentração Mínima
<b>Açúcares Simples</b>	<b>(mM)*</b>
L - Fucose	NI
D - Fucose	NI
Rafinose	NI
Lactulose	NI
Lactose	NI
Lactose -D-Melibiose	NI
D- Galactose	NI
D- Galactosamina	NI
2 – nitrofenil –D-galactosídeo	NI
metil-D-galactopiranosídeo	NI
metil-galactosídeo	NI
Ácido glucurônico	NI
4 – nitrofenil-D-galactopiranosídeo	NI
L- Arabinose	NI
D- Rafinose	NI
D- Frutose	NI
N-acetil-galactosamina	NI
<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	<b>(µg/mL)**</b>
Mucina de porco	7,81
Apotransferina	7,81
Asialofetuína	0,097
Tioglobulina bovina	0,195
Tioglobulina de porco	0,097

\* Concentração mínima (mM) do açúcar capaz de inibir a atividade hemaglutinante

\*\* Concentração mínima (µg/mL) da glicoproteína capaz de inibir a atividade hemaglutinante.

(NI) Não inibiu

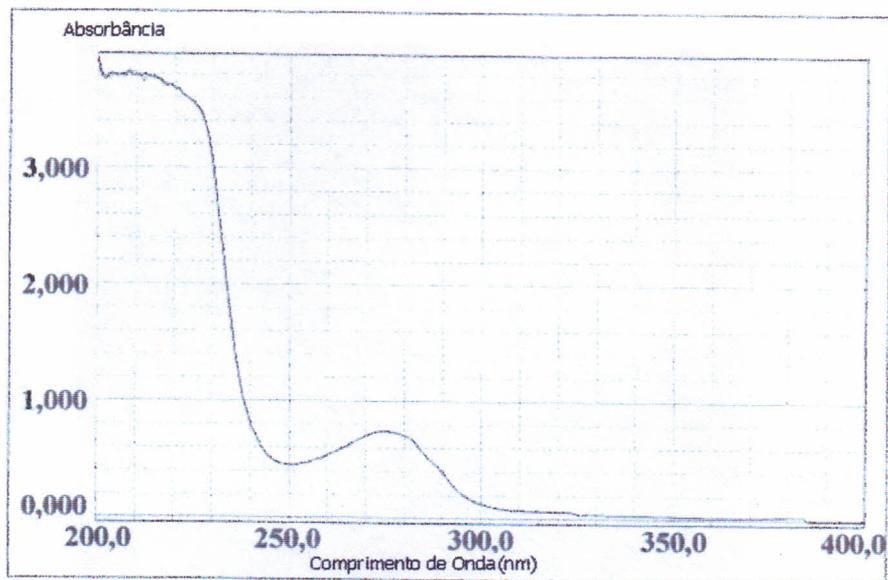


Figura 07- Espectro de Absorção no ultra violeta do PII-Mucina (lectina) de *alga G. ornata*.

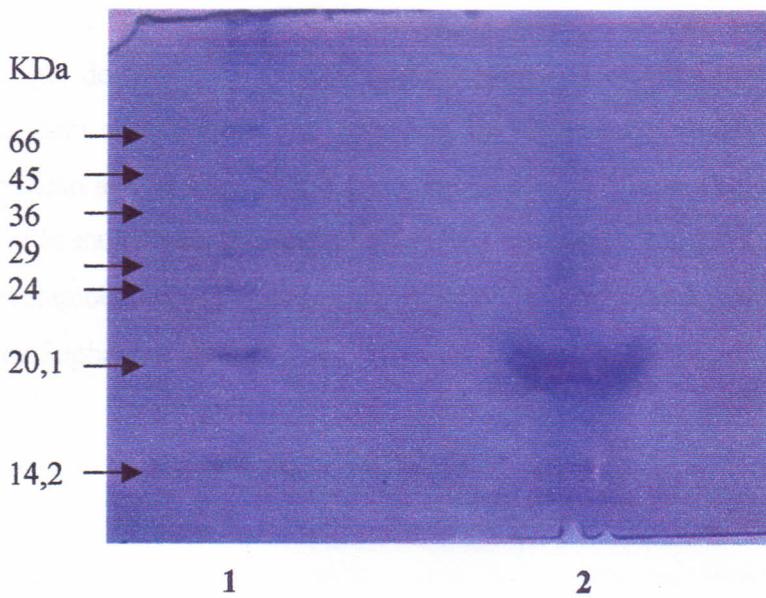


Figura 08- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol. - Marcadores: Albumina Bovina (66KDa); Albumina de ovo (45KDa); Gliceraldeído-3P-Desidrogenase (36KDa); Anidrase carbônica (29KDa); Tripsinogênio (24KDa); Inibidor de tripsina (20,10KDa) e  $\alpha$ -Lactoalbumina (14KDa). 2- Lectina de *G. ornata*.

Yáskara F.M.Marques Leite

---

moleculares baixas, isso porém não necessariamente implica que todas sigam essa regra como constatado para as lectinas das espécies das algas vermelhas *Gracilaria verrucosa* (Kano et al., 1992) e *Vidalia obtusiloba* (Melo, 2000).

#### 5.8.3. Determinação da Massa Molecular da Lectina por Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100

A lectina de *G. ornata* (PII-Mucina), na sua forma nativa, quando submetida à filtração em gel de Sephadex G-100, apresentou um único pico protéico, sendo portanto monomérica com massa molecular estimada em 17,36 KDa, estabelecido por regressão linear em relação aos padrões protéicos de calibração da coluna (Figura 9). Este resultado se assemelha bastante do valor encontrado por eletroforese em gel de poliácridamida com SDS e  $\beta$ -mercaptoctanol (17 KDa), e mostra a pureza da lectina obtida por cromatografia em coluna de Sepharose 4B- Mucina .

#### 5.8.4. Composição de aminoácidos da lectina de *G. ornata*:

A lectina de *G. ornata*, quando analisada na sua composição de aminoácidos, apresentou um alto teor dos aminoácidos glutâmico/glutamínico (13,63%), aspártico/asparagina (9,21%), glicina (20,83%), serina(7,68%) e cisteína (7,79%) e um baixo teor dos aminoácidos básicos lisina(4,44%), arginina (3,44%) e histidina (2,10%), (Tabela 5). Composições semelhantes foram encontrados por Shiomi et al., (1981) para a lectina de *G. verrucosa* , Okamoto et al., (1990) para a *G. bursapastoris* e por Benevides et al., (2001) para a *Caulerpa cupressoides*. Porém, diferentemente de algumas algas marinhas (verdes e vermelhas) analisadas, a *G. ornata* apresentou um elevado teor do aminoácido sulfurado cisteína (7,79%), (Tabela 6).

#### 5.8.5. Ponto Isoelétrico por Eletroforese Bidimensional

O ponto isoelétrico da lectina de *G. ornata*, determinado por eletroforese

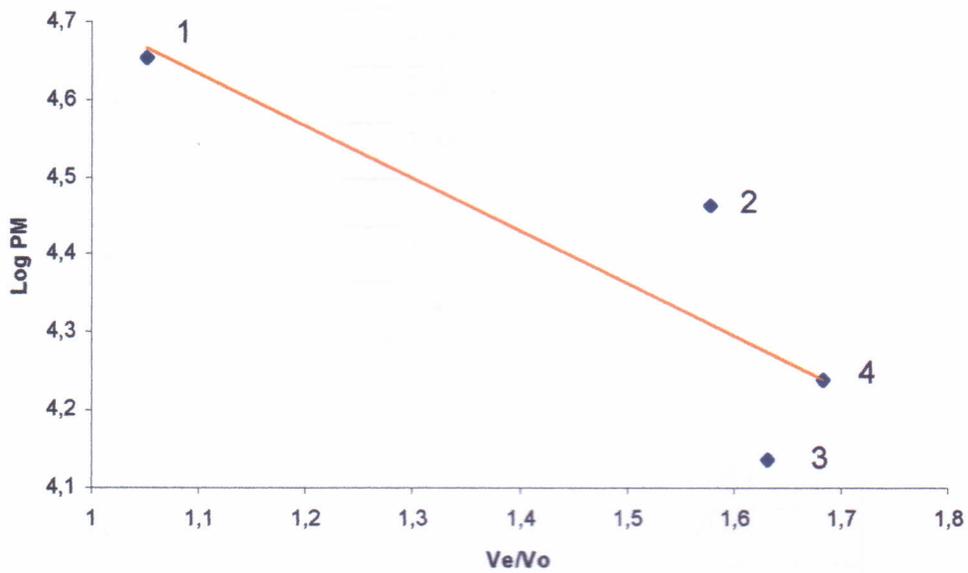


Figura 09- Massa molecular da lectina de *G. ornata* por filtração em gel de Sephadex G-100. (1) Ovalbumina (45 KDa), (2) Anidrase carbônica (29 KDa), (3) Ribonuclease (13,7 KDa) e (4) Lectina de *G.ornata* ( 17,36 KDa)

TABELA 05- Composição em aminoácidos da lectina de *G. ornata*.

AMINOÁCIDO	%/mol	mgP/mL
<b>NÃO ESSENCIAIS</b>		
Asx	9,21	95,85
Glx	13,63	159,17
Ser	7,68	60,51
Gly	20,83	107,47
Ala	8,78	56,40
His	2,10	26,02
Arg	3,44	48,61
Pro	3,89	34,16
<b>ESSENCIAIS</b>		
Thr	3,57	32,67
Val	1,91	17,07
Ile	1,79	18,27
Leu	3,73	38,11
Lys	4,44	51,41
Tyr	4,70	69,41
Phe	2,41	32,07
Met	0,11	1,26
Cys	7,79	72,61
Trp	2,30	40,27
TOTAL	102,30	961,35

TABELA 06 - Composição em aminoácidos das lectinas de *G. ornata*, *G. caudata* e *Caulerpa cupressoides*.

AMINOÁCIDO	<i>G.ornata</i>	<i>G.caudata</i> <sup>(1)</sup>	<i>C.cupressoides</i> <sup>(2)</sup>
<b>NÃO ESSENCIAIS</b>			
Asx	9,21	9,11	11,56
Glx	13,63	11,45	11,63
Ser	7,68	6,24	6,76
Gly	20,83	12,71	8,61
Ala	8,78	11,30	8,37
His	2,10	1,69	1,19
Arg	3,44	3,47	3,24
Pro	3,89	4,83	5,24
<b>ESSENCIAIS</b>			
Thr	3,57	32,67	7,23
Val	1,91	5,97	6,35
Ile	1,79	4,23	5,84
Leu	3,73	6,82	8,26
Lys	4,44	5,63	6,06
Tyr	4,70	3,70	3,77
Phe	2,41	4,07	4,59
Met	0,11	1,92	-
Cys	7,79	0,70	1,27
Trp	2,30	-	-
TOTAL	102,30	99,99	99,97

(1) Neves (1999)

(2) Benevides *et al.*(2001)

---

bidimensional, evidenciou a presença de uma banda protéica com valor de pI localizado na faixa de pH ácido no valor de 5,4 (Figura 10). Esse resultado pode ser justificado pela predominância dos aminoácidos ácidos aspártico, glutâmico e glicina, na estrutura da lectina e está em concordância com o sugerido por Shiomi *et al.*(1981) e Hori *et al* (1990), que afirmam ser as lectinas de algas, moléculas com valores de pI compreendidos entre pH 4,0 e 6,0.

#### 5.8.6. Teor de Carboidratos

A fração ativa obtida por cromatografia de afinidade de Mucina (PII) quando avaliada com relação a seu conteúdo de carboidratos, revelou ser a lectina uma glicoproteína constituída por 2,97% de carboidratos em sua estrutura. A ocorrência de lectinas com diferentes constituições glicídicas em algas marinhas, representa uma considerável parcela entre aquelas já isoladas e caracterizadas. O conteúdo de açúcar apresentado, pode chegar a valores de 92% da constituição total da molécula, como é o caso da espécie *G. verrucosa* (Kano *et al.*, 1992).

#### 5.8.7. Análise de Carboidratos por Cromatografia em Sistema Descendente de Papel

A análise da identificação de carboidratos estruturais do hidrolisado da glicoproteína lectina de *G. ornata* por cromatografia em papel usando-se o sistema solvente butanol: piridina: água na proporção (5:3:1, v/v/v), apresentou somente o monossacarídeo glucose na sua porção glicídica, (Figura 11). Em lectinas glicoprotéicas vegetais, particularmente naquelas de leguminosas (Cavada *et al.*, 1998 ; Sharon & Lis, 1998) , têm sido freqüentemente encontrados os seguintes carboidratos: manose, fucose, N-acetil-glucosamina e xilose. Por outro lado, as lectinas isoladas da família das salonáceas apresentam predominantemente arabinose e galactose como constituinte da porção glicídica (Lis & Sharon, 1991).



Figura 10 –Eletroforese Bidimensional da lectina de *G. ornata*

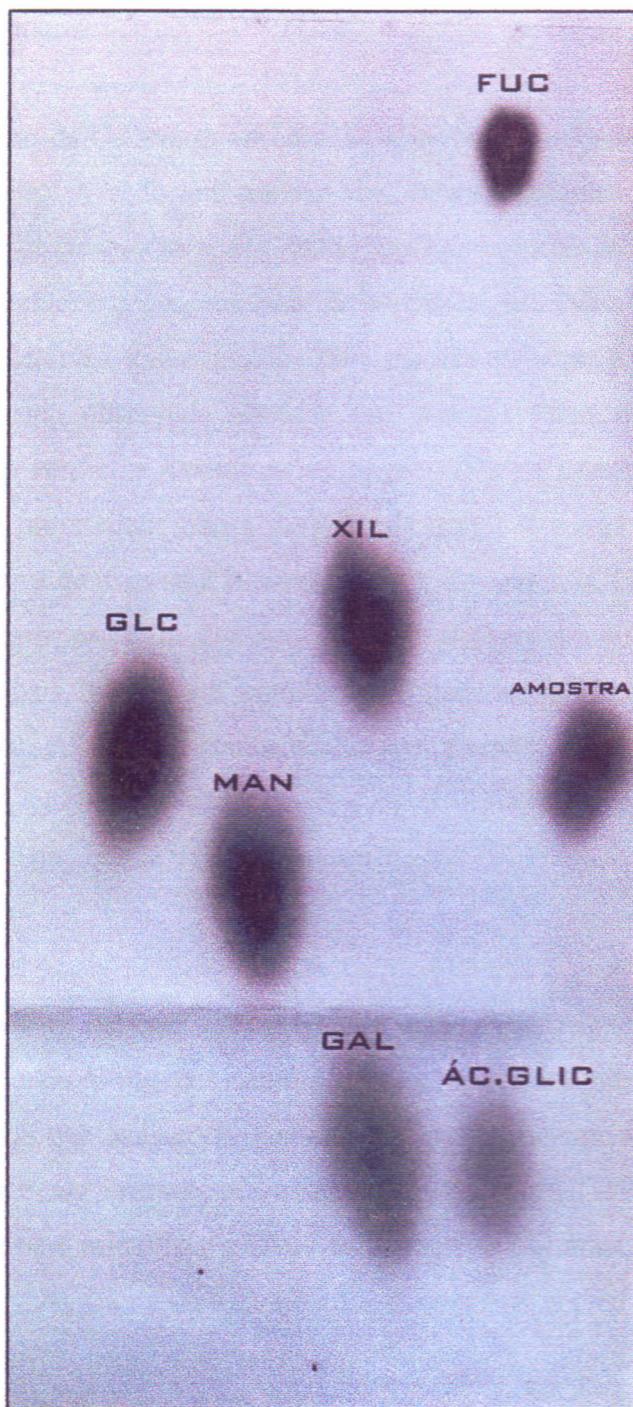


Figura 11- Cromatografia em sistema descendente de papel, usando o sistema solvente Butanol: piridina: água (5:3:1,v/v/v) da porção glicídica da alga marinha vermelha *G. ornata*. Fuc- fucose, Xil- xilose, Glc-Glucose, Man- manose, Gal- galactose , Ác. Glic.-ácido glucurônico.

---

### 5.9. Inibidor de Tripsina

O extrato alcalino da *G. ornata* apresentou uma fraca atividade inibidora de tripsina (0,203 UI/g de farinha). A ação anti-tríptica em extratos alcalinos de algas marinhas já tinha sido analisada por Benevides *et al.* (1998a), em dez espécies de algas vermelhas onde o resultado obtido demonstrou a ausência de atividade em todas as espécies de algas analisadas. A atividade anti-tríptica também foi analisada em vinte e sete espécies de algas venezuelanas tendo sido observada somente nos extratos totais da alga verde *Padina gymnospora* e da alga vermelha *Acanthopora spicifera* (Perez-Lorenzo *et al.*, 1998), o que leva a crer que esta propriedade não é uma característica das algas marinhas. Porém, a ocorrência de inibidores de tripsina é bastante comum em vegetais. Obidairo & Akpochafo (1984), isolaram e caracterizaram dez inibidores de tripsina em tubérculos de *Ipomoea batatas*, dentre os quais, três foram considerados mais ativos, e apresentaram massas moleculares de 12, 10, e 9,3 KDa, determinadas por cromatografia de filtração em gel de Sephadex G-100.

### 5.10. Urease

A farinha da alga mostrou uma atividade ureásica correspondente a 60 UA/g de farinha. O estudo de ureases vegetais como possíveis fatores antinutricionais e/ou tóxicos, vem sendo feito desde que Pollaco & Holland (1993) verificaram haver alta homologia entre estas enzimas e as ureases microbianas. Cussac *et al.*, (1992) sugeriram que as ureases vegetais poderiam mimetizar o efeito de ureases de bactérias, como promotoras de ulcerações gástricas

### 5.11. Avaliação Histopatológica da Toxicidade da Lectina de *G. ornata*

A lectina purificada de *G. ornata* mostrou-se tóxica para camundongos quando injetado por via intravenosa, dentro de um período que não ultrapassou 20 minutos (como era de se esperar, a aplicação por via iv. provocou o aparecimento de respostas rápidas). Os

---

sintomas observados imediatamente após a aplicação foram piloereção, ataxia locomotora, dispnéia, convulsões tônico-clônicas, seguidas da morte dos animais. A  $DL_{50}$  obtida por via iv. para a lectina de *G. ornata* foi 50 mg P/ Kg de peso corpóreo. O exame histopatológico dos tecidos (fígado, rins, coração, estômago, baço, pulmão e intestino) provenientes dos camundongos nos quais foram aplicados por via intravenosa a lectina de *G. ornata*, revelou alterações microscópicas no estômago, intestino, fígado e coração. A nível macroscópico não foi observada nenhuma alteração nos órgãos. Na observação microscópica, dos tecidos provenientes do estômago (Figura 12), do intestino (Figura 13), do fígado (Figura 14) e finalmente do coração (Figura 15), foi observada uma congestão generalizada de forma moderada em todos estes órgãos. A congestão ou hiperemia passiva é um quadro onde os órgãos tomam uma coloração vermelho escuro, devido a alta concentração de hemoglobina desidrogenada. A congestão ocorre nos quadros de insuficiência cardíaca. A dose tóxica letal  $DL_{50}$  para camundongos por via iv., verificada para a lectina de *G. ornata*, foi maior que a encontrada por Santos (2001), que isolou a lectina tóxica para camundongos da folha de salsa *Ipomoea asarifolia*, cuja  $DL_{50}$  foi de 450 mgP/Kg de peso corpóreo quando aplicada intraperitonealmente.

#### 5.12. Avaliação da atividade Inseticida das Frações (Extrato Bruto, F0/70 e PII-DEAE) da alga marinha *G. ornata*

Os resultados da avaliação de toxicidade das frações (extrato bruto, F0/70 e PII-DEAE) da alga *G. ornata* para *C. maculatus* estão mostrados nas figuras 16, 17, 18 e 19. Todas as frações protéicas avaliadas influenciaram negativamente a emergência das larvas de *C. maculatus*, em todas as doses testadas, quando comparadas ao controle. Em todas as concentrações testadas, o extrato bruto ocasionou uma redução em torno de 86% e a F0/70 uma redução em torno de 59%. Entretanto, o PII-DEAE induziu uma redução mais diferenciada para a maior concentração avaliada (1%), mostrando uma redução de 81% e nas demais concentrações, o efeito mostrou-se semelhante com uma redução em torno de 66% (Figura 16).

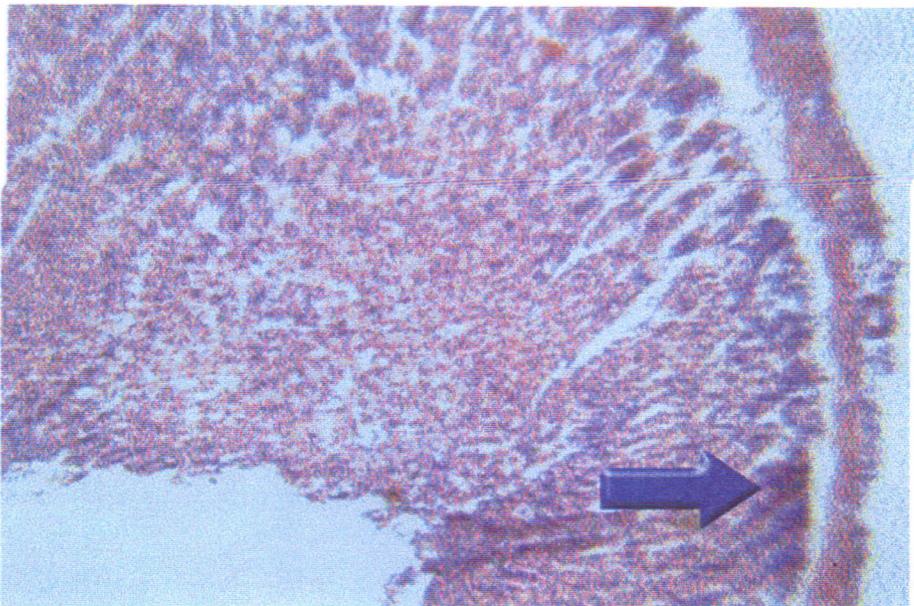


Figura 12- Fotomicrografia de corte histológico do estômago de camundongo injetado com a lectina tóxica da alga *G. ornata*. A seta indica a moderada congestão interlobular e ceptal neste órgão (objetiva 100X).

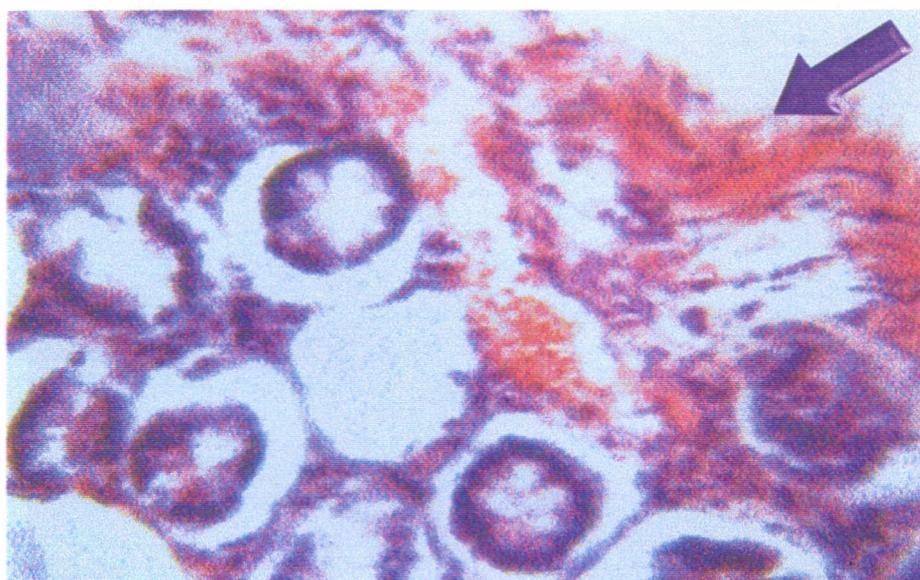


Figura 13- Fotomicrografia de corte histológico do intestino de camundongo injetado com a lectina tóxica da alga *G. ornata*. A seta indica a acentuada congestão interlobular e ceptal neste órgão (objetiva 400X).

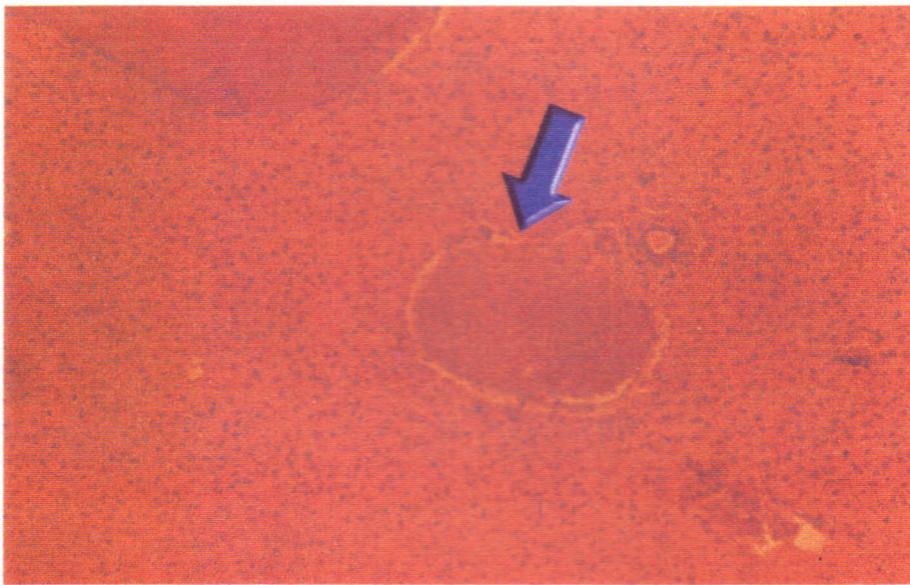


Figura 14- Fotomicrografia de corte histológico do fígado de camundongo injetado com a lectina tóxica da alga *G. ornata*. A seta indica a moderada congestão interlobular e ceptal neste órgão (objetiva 100X).

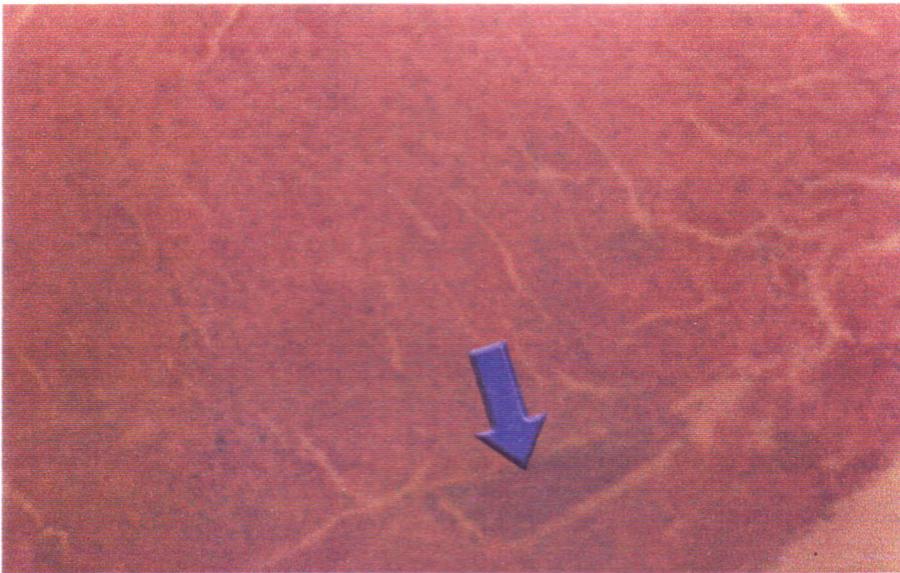


Figura 15- Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongo injetado com a lectina tóxica da alga *G. ornata*. A seta indica a moderada congestão interlobular e ceptal neste órgão (objetiva 400X).

Na avaliação da influência das mesmas frações protéicas sobre a sobrevivência larval, estatisticamente, as únicas frações que obtiveram resultados considerados significativos foram o extrato bruto na concentração de 2,5% e o PII-DEAE a 1%, onde foram observados uma redução no número de insetos que conseguiram atingir a fase adulta na faixa de 68,53% e 65,03% respectivamente (Figura 17).

Com relação ao peso médio dos insetos, não houve diferença significativa entre o controle e as amostras testadas, indicando que o desenvolvimento dos insetos não foi afetado (Figura 18).

Outro parâmetro analisado foi o tempo médio de desenvolvimento dos insetos. Porém, nenhuma amostra testada conseguiu retardar de modo significativo o desenvolvimento dos insetos, quando comparada com o controle (Figura 19).

A ausência do efeito da F0/70 sobre a sobrevivência larval do *C. maculatus*, sugere a presença de um outro componente nesta fração que provavelmente esteja associado à proteína (lectina), antagonizando o efeito observado para o PII-DEAE, visto que por cromatografia em DEAE-celulose foi obtido um outro pico que provavelmente contenha este componente (PI-DEAE) o qual não foi avaliado com relação à atividade inseticida.

Em estudos de avaliação da atividade inseticida, nas frações (EB e F0/30) obtidas de folhas de salsa (*Ipomea asarifolia*), realizados por Santos (2001), em relação aos parâmetros emergência larval, peso médio dos insetos e tempo médio de desenvolvimento dos insetos, foi demonstrado nas diferentes concentrações testadas que a F0/30 mostrou-se mais efetiva que o extrato bruto com relação a redução da emergência das larvas.

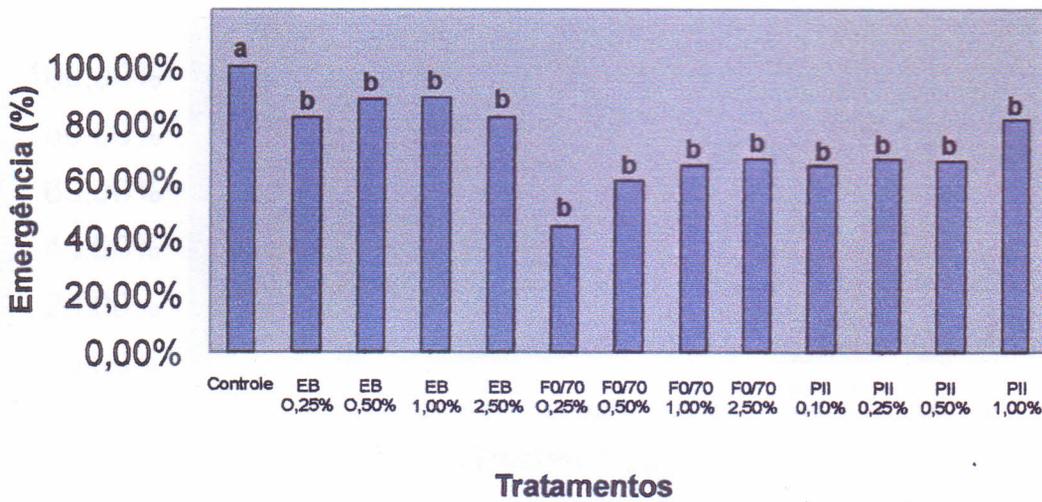


Figura 16- Efeito das frações (Extrato bruto- EB, F0/70 e PII-DEAE ) obtidos da alga *G. ornata* sobre a emergência de larvas de *C. maculatus*.

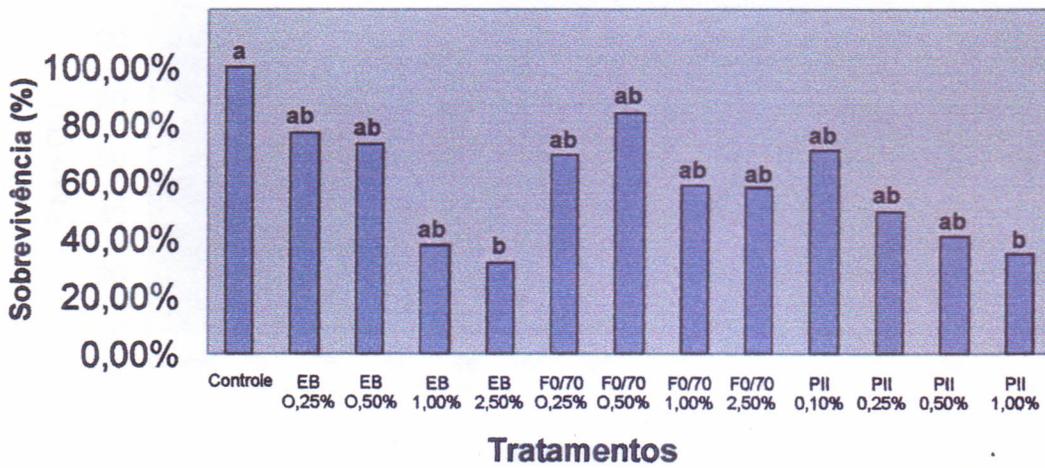


Figura 17- Efeito das frações (Extrato bruto- EB, F0/70 e PII-DEAE ) da alga *G. ornata* sobre a sobrevivência larval de *C. maculatus*

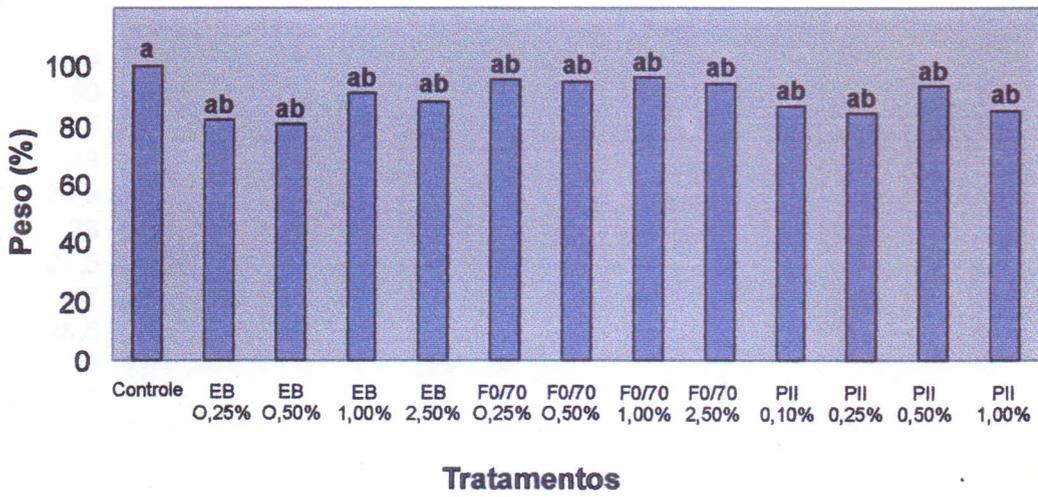


Figura 18- Efeito das frações (Extrato bruto- EB, F0/70 e PII-DEAE ) da alga *G. ornata* sobre o peso médio dos adultos de *C. maculatus*

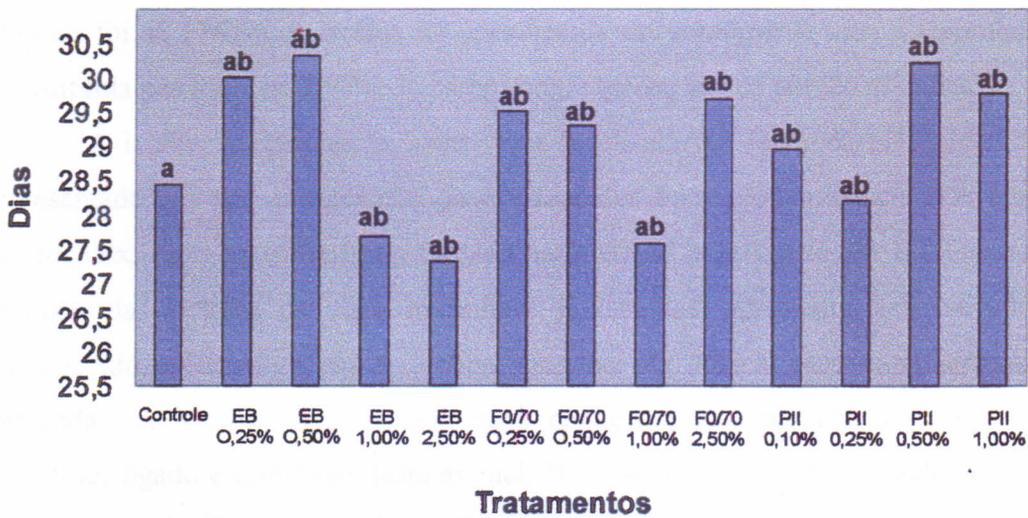


Figura 19- Efeito das frações (Extrato bruto- EB, F0/70 e PII – DEAE ) da alga *G. ornata* sobre o tempo médio de desenvolvimento (de ovo a adulto recém emergido) das larvas de *C. maculatus*.

## 6. CONCLUSÕES

A lectina presente na alga marinha *G. ornata* comportou-se como a maioria das lectinas de algas marinhas já isoladas, ou seja, aglutinou eritrócitos de coelho tratados com tripsina, esta atividade não foi dependente da presença dos cátions divalentes testados  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mn}^{+2}$  e foi inibida quando em presença das glicoproteínas mucina de porco, apotransferina, asialofetuína, tiroglobulina bovina e porcina.

A massa molecular aparente da lectina na sua forma nativa obtida por filtração em gel de Sephadex G-100, e sob forma desnaturada em PAGE-SDS na presença de um agente redutor foi de 17KDa. A lectina foi considerada estruturalmente uma glicoproteína, sendo constituída por somente 2,97% do carboidrato glucose na sua porção glicídica.

A lectina apresentou pI com valor localizado na faixa de pH ácido (5,4) tendo apresentado em sua composição de aminoácidos uma predominância dos aminoácidos ácidos Glx, Asx, do aminoácido Gly, do aminoácido hidroxilado Ser e diferentemente da maioria das lectinas de algas marinhas já isoladas, apresentou um elevado teor do aminoácido sulfurado Cys. A lectina mostrou ser tóxica para camundongos quando aplicada por via iv., ocasionando uma congestão generalizada nos órgãos coração, intestino, fígado e estômago deste animal. Isto leva a crer que a atividade tóxica presente na alga marinha *G. ornata* se deve pelo menos em parte, à presença da lectina. A lectina da *G. ornata* pode ser considerada uma quimerolectina, já que apresenta a capacidade de aglutinar eritrócitos além de possuir atividade biológica.

A avaliação do potencial inseticida das frações (Extrato bruto e PII-DEAE) obtidos da alga *G. ornata*, resultou em um efeito negativo tanto na emergência quanto na sobrevivência larval do *C. maculatus*, sugerindo um potencial biotecnológico para utilização da lectina tóxica obtida desta alga. Porém, apesar da atividade antimetabólica apresentada por estas frações protéicas para *C. maculatus*, devemos inicialmente conhecer profundamente o mecanismo de toxicidade das lectinas sobre insetos para então se obter plantas transgênicas expressando lectinas inseticidas. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos neste trabalho, devemos levar em consideração a evolução e a capacidade de

---

vencer obstáculos, que tem tornado os insetos, verdadeiras barreiras na obtenção de alimentos naturais cultivados pelo homem.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I. L. & SAMPAIO, A . H. Screening of brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina** 34: 211-214, 1991.
- AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A . H., BENEVIDES, N. M. B., FREITAS, A . L. P., COSTA, F. H. F., CARVALHO, M. C. & PINEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica Marina** 35: 475-479, 1992.
- AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A . H., FREITAS, A . L. P., BENEVIDES, N. M. B. & MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryotamnion seafrothii* and *Bryotamnion triquetrum*, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 7(1): 15-19, 1995.
- ALLEN, A. K., DESAI, N. N. & NEUBERGER, A. Properties of potato lectins and the nature of its glycoprotein linkages. **Biochemistry Journal** 171: 665-674, 1978.
- ANDERSON, L., LIDGREN, G., BOHLIN, L, PISA, P., WIGZELL, H. & KIESSLING, R. Studies on Swedish marine organisms. V.A screening for lectin like activity. **Acta Pharmaceutica Suecica** 91-100, 1986.
- A.O.A.C-ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 12<sup>th</sup> Ed. **Washington D.C.**, 1094pp, 1975.
- BALZARINI J., HOSOYA M., SHIGETA S. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino-acid-sequences of the viral envelope glycoproteins. **Antimicrob Agents CH** 35(12):2515-2520, 1991.

- BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **TIBS**, 13: 480-482, 1988.
- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, A., MOREIRA, L. I. M., SANTOS, C. F., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological investigations** 21(4): 297-303, 1992.
- BENEVIDES, N.M.B., LEITE, A. M., FREITAS, A.L.P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 8(2): 117-122, 1996.
- BENEVIDES, N. M. B., SILVA, S. M. S., OLIVEIRA, S. R. M., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P. & VASCONCELOS, I. M. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 10(1): 31-36, 1998a.
- BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P. & SAMPAIO, A. H. Purification and partial characterisation of the lectin from the marine red alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Faalkenberg. **Botanica marina** 41: 521-525, 1998b.
- BENEVIDES, N. M. B., OLIVEIRA, S. R. M., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P. & SAMPAIO, A. H. Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red marine algae *Gracilaria domigensis* and *Gelidium pusillum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11(2): 91-95, 1999.
- BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., MONTEIRO, A. C. O. & FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization

- of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina** 44: 12-22, 2001.
- BIRD, G. W. G. Specific agglutinating activity for human red blood corpuscles in extracts of *Dolichos biflorus*. **Current Science** 20:298-299, 1951.
- BIRD, K. T., CHILES, T. C., LONGLEY, R. E., KENDRICK, A. F. & KINKEMA, M. D. Agglutinins from marine macroalgae of the southeastern United states. **Journal of Applied Phycology** 5: 213-218, 1993.
- BLUNDEN, G. & ROGERS, D. J. Survey of british seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia** 38 (2): 162-168, 1975.
- BLUNDEN, G., ROGERS, D. J., LOVELESS, R. W. & PATEL, A. V. Haemagglutinins in British marine algae and their possible taxonomic value. In: "Modern Approaches to the Taxonomy of Red and Brown Algae". D. E. Irvine and J. H. Price, Eds., London: Academic Press; 21-45, 1986.
- BLUMBERG, S. & TAL, N. **Biochemistry at Biophysica Acta** 453: 357, 1976.
- BLUNDEN, G., FARNHAM, W. F., LIVETT, B., RICHARDSON, G. & ROGERS, D.J. Haemagglutinins and antibiotics in some British seaweeds. **Br. Phycol. J.7**: 279, 1972.
- BLUNDEN, G. & ROGERS, D. J. Survey, of british seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**, 38(2): 162-168, 1978.
- BOISSEAU, C., CAUSSE, H., MOISAND, A., PERE, D., SOUSA-CAVADA, B. & ROUGÉ, P. (1984). Localization and biosynthesis of *Lathyrus ochrus* seeds lectin. In: ARNAUD, P., BIENVENU, J. & LAURENT, P. **Marker Proteins in Inflammation**, Vol. 2, pp. 651-654. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1985.

Yáskara F. M. Marques Leite

- BOYD, W. C., ALMODOVAR, L. R. & BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology** 6: 82-83, 1966.
- BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by test with lectins. In: Plant lectins. Molecular and biological aspects. **Ann. Ver. Plant Physiol.** 36 : 209-234, 1954.
- BOYD, W. C. & REGUERA, R. M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **J. Immunol.**, v.62, p.333-339, 1949.
- BOYD, W.C., ALMODOVAR, L.R. & BOYD, L.G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, 6: 82-83, 1966.
- 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** 72, 248-254, 1976.
- BRETTING, H., JACOBS, G., TICHÁ, M. & KOCOUREK, J. Studies on lectins LXXIII. Lectins of the sponge *Axinella polypoides* and their dissociation constants. In J. Kocourek & D.L.J. Freud, (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Proceeding of the 10th Lectin Meeting. 7, 187-195. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA, 1990.
- CALVETE, J. J., COSTA, F. H. F., SAKER-SAMPAIO, S., MURCIANO, M. P. M., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., BLOCH Jr., C., SILVEIRA, S. B., FREITAS B. P. & SAMPAIO, A. H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences** 57: 343-350, 2000.

- CAMMUE, B. STINISSEN, H. M. & PEUMANS, W. J. A new type of cereal lectin from leaves of couch grass (*Agropyrum repens*). **Biochemistry Journal** 148: 315-322, 1989.
- CAMPBELL, P.A., HARTMAN, A.L. & ABEL, C.A. Stimulation of B cell, but not T cells or thymocytes, by a sialic acid-specific lectin. **Immunology** 45: 155,1982.
- CAVADA, B. S., SANTOS, C.F., GRANJEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P. V. P., RAMOS, L. R., SOUSA, F. A. M. , CRISÓSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v.49, p. 675-680, 1998.
- CHILES, T. C. & BIRD, K. T. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comparative Biochemistry and Physiology** 94 (1): 107-111, 1989.
- CHILES, T. C. & BIRD, K. T. *Gracilaria tikvahiae* agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity. **Carbohydrate Research** 207: 319 - 326, 1990.
- CHRISPEELS, J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. **The Plant Cell**. American Society Plant Physiologists, Vol.3, 1-9 ,1991.
- CISAR, J. O., SANDBERG, A. L., ABEYGUNAWARDANA, C., REDDY, G. P. & BUSH, C. A. Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharide. **Glycobiology** 5: 655 - 662, 1995.
- COLE, H.B. EZZELI, J.W. KELLER, K.F. & DOYLE, R.J. (1984). Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectin. **Journal of Microbiology** 19 (1): 48-53, 1984.

- COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S. A., ROCHA, M. L. A., BENEVIDES, N. M. B. & FREITAS, A. L. P. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants** 5: 53 - 61, 1999.
- CRIADO, M. T. & FERREIROS, C. M. Selective Interaction of a *Fucus vesiculosus* Lectin-like Mucopolysaccharide with Several *Candida* Species. **Annals Microbiology** 134 A: 149-154, 1983.
- CUMMINGS, R. D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. *In: Glyco-science, status and perspectives.* (H. J. Gabius & S. Gabius, eds.). Chapter 10. Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany, 191-199, 1997.
- CUSSAC, V. FERRERO, R. L. LABIGNE, A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grow under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.*, v.174, p.2466-2473, 1992.
- DALL'OLLIO, F. Protein glycosylation in cancer biology: an overview. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology** 49: 126-135, 1996.
- DALTON, S. H.; LONGLEY, R. E.; BIRD, K. T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. **Journal of Marine Biotechnology** 2: 149-155, 1995.
- DAWES, E. A. **Quantitative Problems in Biochemistry.** Churchill, Edinburg, UK, 470pp, 1979.
- DE WAARD, A., HEIKMAN, S. & KORNFIELD, S. J. **Journal of Biological Chemistry** 251: 7581 - 7587, 1976.
- DÍAZ, C.L., LEMS-VAN KAN, P., VAN DER SCHAAL, I.A.M. & KIJNE, J.W.

- Determination of pea (*Pisum sativum* L.) root lectin using an enzyme-linked immunoassay. **Planta**, **161**: 302-307, 1995.
- DOYLE, R. J., THAMASSON, D. L. & NICHOLSON, S. K. Stabilization of Con A by metal ligands. **Carbohydrate Research** **46**: 11-18, 1976.
- DUBOIS, M., GILLERS, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** **28**(3): 350-356, 1956.
- FÁBREGAS, J., MUÑOZ, A., LLOVO, J. & ABALDE, J. Agglutinins in marine red algae. **J. R. C.S. Medical Science** **12**: 298-299, 1984.
- FÁBREGAS, J., LLOVO, J. & MUÑOZ, A. Hemagglutinins in red seaweeds. **Botanica Marina** **28**(12): 517-520 1985.
- FÁBREGAS, J.; MUÑOZ, A. & LLOVO, J. Hemagglutinins in brown seaweeds. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **97**: 213-219, 1986.
- FÁBREGAS, J.; MUÑOZ, A.; LLOVO, CARRACEDO, A. Purification and partial characterization of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds) Stackh. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **124**: 21-30, 1988a.
- FÁBREGAS, J., MUNOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A. Tomentine: a lectin for the detection of glycoprotein polymorphisms. **Medical Science Research** **16**: 819-820, 1988b.
- FAVERO, J. Lectins in AIDS research. **Glycobiology** **4**: 387-396, 1994.

- FAE (Fundação de Assistência ao Estudante)-Manual Técnico. **Reunião do Grupo Consultor da Fae em Brasília**, código MT 01.07.04, 155pp., 1985.
- FARIAS, W. R. L. Purificação, caracterização parcial a atividade biológica da lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*(Areschoug) Cheney et Gabrielsin, Dissertação de Mestrado, **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, **Universidade Federal do Ceará**, 100pp, 1995.
- FERREIROS, C.M. & CRIADO, M.T. Purification and partial characterization of a *Fucus vesiculosus* agglutinin. **Revista Española de Fisiologia** 39: 51-60, 1983.
- FISH, B. C. Isolation and characterisation of lectins from marine algae, with particular reference to *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. University of Portsmouth: (PhD Thesis). 240pp., XVI, 1991.
- FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D. I. A., COSTA, F. H. F., FARIAS, W. R. L., LOBATO, A. S. C., SAMPAIO, A. H. & BENEVIDES, N. M. B. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of Applied Phycology**, 9: 495-501, 1997.
- GARTNER, T. K. & OLGIVIE, M. L. Isolation and characterization of three  $Ca^{++}$  dependent  $\beta$ -galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochemistry Journal** 224: 301-307, 1984.
- GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pestic Sci.**, v.52, p.165-175, 1998.
- GILBOA-GARBER, N., CITRONBAUM, R., LEVENE, C. & SELA, R. H blood group detection by the L-fucose binding lectin of the green marine alga *Ulva lactuca*. **Developmental and Comparative Immunology** 12: 695-705, 1988.

GOODWIN, T. W. MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochem. J.**, v. 40 ,p. 628-632, 1946.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R.,C., MONSIGNY, M., OZAWA, T. & SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature** 285: 60, 1980.

GLICK, G.D., TOOGOOD,P.L., WILEY,D.C., SKEHEL, J.J & KOWLES,J.R.Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalents sialosides. The j. Biochem. Chem., 266(35): 23660-23669,1991.

GRIFFIN, R. L., ROGERS, D. J., SPENCER-PHILLIPS, P. T. N. & SWAIN, L. Lectin from *Codium fragile* ssp *tomentosoides* conjugated to colloidal gold: a new histochemical reagent. **British Journal of Biomedical Science** 52: 225-227, 1995.

HAMMARSTROM, S. Snail (*Helix pomatia*) hemagglutinin. **Methods in Enzymology** 28: 368-383, 1972.

HAMERSTRAND ,G. E., BLACK L.T., GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products:modification of the standart analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v.58, p 42-45, 1981.

HANSEN B., REFSNES K., PIHL A. Monitoring Natural Vegetation in Southern Geenhand using Field-mMeasurements. **Arctic** 44:94-101,Suppl. 1 ,1991.

HILLER, A., PLAZIN, J., VAN-SLYKE, B.A study of conditions for kjeldahl determination of nitrogen in proteins. **Journal Biological Chemical**, v.176, n.3, p.1401-1420, 1948.

- HOREJSI, V. & KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins. XVII. Some properties of the anti-H-phytohemagglutinin of the furze seeds (*Ulex europeus* L.) **Biochimica et Biophysica Acta** 336: 329-337, 1974.
- HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries** 47 (6): 793-798, 1981.
- HORI, K., KEISURE, M. & ITO, K. Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algae species. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries** 52(2): 323-331, 1986.
- HORI, K., OIWA, C., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Evidence for wide distribution of agglutinins in marine algae. **Botanica Marina** 31(2): 133-138, 1988.
- HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia** 204/205: 561-566, 1990.
- HORI, K., SHIMADA, Y.; OIWA, C., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Occurrence of a novel group of hemagglutinins extractable by pronase treatment in marine algae. **Journal of Applied Phycology** 5: 219-223, 1993.
- HORI, K., MATSUBARA, K. & MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonina*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1474: 226-236, 2000.
- HUESING, J. E., MURDOCK, L. L. & SHADE, R. E. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. **Phytochemistry** 30(11): 537-540, 1991.

- INBAR M., SACHS L. Interaction of carbohydrate-binding protein concanavalin a with normal and transformed cells. **P. Natl. Acad Sci USA** 63(4) : 1418,1969.
- ISHIKAWA, M., TONOSAKI, A., HISATOMI, O., TOKUNAGA, F., KOSEKI, T. & SAKURAGI, S. Lectins cytochemical analysis of glicoconjugates in photoreceptor cell membranes of *Lampetra japonica*. **Vision Reserch** 36: 1513-1520, 1996.
- JANZEN, D. H., JUSTER, H. B., LIENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black bean on a bruchid beetle. **Science**, v. 192, p.795-796, 1976.
- JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. São Paulo. Livraria Editora Santos, 1983.
- KAKITA, H., FUKUOKA, S., OBIKA, H., LI, Z.F. & KAMISHIMA, H. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Botanica Marina** 40: 241-247, 1997.
- KAMIYA, H., SHIOMI, K. & SHIMIZU, Y. Marine biopolymers with cell specificity-III- Agglutinins in the red alga *Cystoclonium purpureum*: isolation and characterization. **Journal of Natural Products** 43: 136-139, 1980.
- KAMIYA, H. Properties of the hemagglutinins in the red alga *Monospora* sp **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries** 48: 1365, 1982a.
- KAMIYA, H., OGATA, K. & HORI, K. Isolation and characterization of a new agglutinin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Botanica Marina** 25(11): 537 - 540, 1982b.

- KANEKO, M., HIRABAYASHI, J., ODA, Y & KASAI, K.  $\beta$ -D-Galactoside-binding lectin of human umbilical cord: purification, characterization, and distribution. *In Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. (J. Kocourek & D. L. J. Freud eds.). Sigma Chemical Company, v. 7: 77-82. St. Louis, Missouri, USA, 1990.
- KANO, H., KITAMURA, T. & KOBAYASHI, Y. A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102: 445-449, 1992.
- KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia and urease. In: GLICK, D. (ed.). *Methods of Biochemical analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1969. p.311-314, 1969.
- KARASAKI Y., TSUKAMOTO S., MIZUSAKI K. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Res. Int.* 34(1):7-13, 2001.
- KIM, M., RAO, M. V. & TWEARDY, D. J. Lectin-induced apoptosis of tumor cells. *Glycobiology* 3: 447-453, 1993.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. The primary structures of two types of the *Ulex europaeus* seed lectin. *Journal of Biochemistry* 109: 650-658, 1991.
- KRAJHANZL, A., KOCOUREK, J.; PANCOSKA, P & NOSEK, J. Studies on lectins LXIV. Fish oocyte lectins: further physicochemical characterization of lectins from oocytes of the bream, *Abramis brama* L., and the perch, *Perca fluviatilis* L. Interaction of the perch lectin I with components of the mature egg jelly envelope. In T.C. Bog-Hansen, & J. Breborowicz, (Eds). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Proceedings of the 6th Lectin Meeting. v. 4: 377-396. Walter de Gruyter Berlin-New York, 1985.

KULKARNI, G. V. & McCULLOCH, C. A. G. Concanavalin A Induced Apoptosis in Fibroblasts: The Role of Cell Surface Carbohydrates in Lectin Mediated Cytotoxicity. **Journal of Cellular Physiology** 165: 119-133, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage  $\phi$ . **Nature** 227: 680-685, 1970.

LANDSTEINER, K., RAUBITSCHKEK, H. Beobachtungen über hamolyse and hamagglutination. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig.*, v.45,p.660-667,1907.

LERNER, D. R. & RAIKHEL, N. V. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. **Journal of Biological Chemistry** 267(16): 11085-11091, 1992.

LEE, R.E. mycology, 2a. Ed. **Cambridge University Press**, 645p, 1989.

LIENER, I. E.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, 600 pp., Academic Press, New York, 1986.

LIMA, H. C., COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S. A., BENEVIDES, N. M. B., TEIXEIRA, D. I. A., ROGERS, D. J. & FREITAS, A. L. P. Induction and inhibition of human lymphocyte transdformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology** 10: 153-162, 1998.

LIPSICK, J.S., BEYER, E.C., BARONDES, S.H. & KAPLAN, N.O. Lectins from chicken tissues are mitogenic for Thy-1 negative murine spleen cells. **Biochemical Biophysical Research Communication** 97: 56-61, 1980.

- LIS H. & SHARON, N. **Annum. Ver. Biochemistry** 42: 541 - 547, 1991.
- LIS, H. & SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Method. Enzymol.**, v.28, p.360-368, 1972.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higher plants. **The Biochemistry of Plants** 6: 371-447, 1981.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins as molecules and tools. **Ann. Ver. Biochemistry** 55: 35-67, 1998.
- LITCHFIELD, J. T. J., WILCOXON, F. A simplified method for evaluation of dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.96, p.99-104, 1949.
- LOVELESS, R. W. and D. J. ROGERS. Biochemical studies on the lectins from subspecies of *Codium fragile*, **British of Phycology Journal** 20: 188, 1985.
- LORIS R., BOUCKAERT J, HAMELRYCK T.W. Structural features of the legume lectins. **Plant Physiol.**, 82:1036-1039, 1998.
- MACHUKA R., SCHONNING K., HANSEN J.E.S. Transmission of a minor variant of transcriptionally active HIV-1. **Scand J. infect Dis.** 31(3) :243-249, 1999.
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.** 35 (11): 1-156, 1957.
- MARCHETTI P, CARRACEDO J., RAMIREZ R.. Toxin-Sensitive GTP-binding proteins regulate activation-induced apoptotic cell-death of human natural-killer-cells. **Eur. J. Immunol.** 25 (11):3094-3099, 1995.

- MATSUBARA, K., SUMI, H. & HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia** 52: 540-543, 1996
- MATSUMOTO, H., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T. & SHIMAZU, H. Carbohydrate profiles shown by a lectin and a monoclonal antibody correlate with metastatic potencial and prognosis of human lung carcinoma. 1708-1713, 1992.
- MELO, F. R. Purificação, caracterização parcial e variação sazonal de uma lectina presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Martens, C. Agardh) J. Agardh. . **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 92pp, 2000.
- MOREIRA, R. A., AINOUIZ, I. L., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 86(11): 211-218, 1991.
- MOREIRA, R. A. **Tese de Professor Titular, Universidade Federal do Ceará**, 600 pp., 1998.
- MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.), isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, 26(2): 113-120, 1984.
- MOREIRA, R. A. , PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v.59, p.783-787, 1977.
- MOREIRA, R.A., CORDEIRO, E.F., CAVADA, B.S., NUNES, E.P., FERNANDES, A.G., OLIVEIRA, J.T.A. Plant seed lectins. A possible marker for the chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**,

5(2): 127-132, 1993.

MUÑOZ, A., LLOVO, J. & FÁBREGAS, J. Hemagglutinins of the green algae. **Acta Científica Compostelana**, 22: 873-878, 1985

MURDOCK, L. L., HUESING, J.E., NIELSEN, S. S., PRATT, R. C., SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v.29, p.85-89, 1990.

NEVES, S. A. Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento, caracterização parcial e estudo comparativo do seu efeito indutor de migração de neutrófilos, *in vivo* e *in vitro*, com o de outras lectinas de algas marinhas. Fortaleza, CE, 104pp. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará**, 1999.

NEVES, S. A. ; M. DIAS-BARUFFI; A. L. P. FREITAS & M. C. ROQUE-BARREIRA. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**, 50, 486-490, 2001.

NICHOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **Int. Review Cytology** 39: 89-190, 1974.

NICHOLLS, T. J., CARPENTER, B. G., ROGERS, D. J., COOK, D. J., WILLOUGHBY, J., WOLOWACZ, S. & SMART, J. D. An investigation of lectin-binding sites on unfixed corneal and conjunctival surfaces of rats. In **"Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry"**. (Van Driessche, E., Fischer, J., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C. eds.), v. 10: 39-43, 1994.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Câncer Research** 20: 462-466, 1960.

- OBIDAIRO, T. K., AKPOCHAFO, O. M. Isolation and characterization of some proteolytic enzyme inhibitors in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Enzyme Microb. Technol.**, v.6, p.132-134, 1984.
- OKA, Y., CHET, I. SPIEGEL, Y. An immunoreactive protein to wheat-germ agglutinin antibody is induced in oat roots following invasion of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*, and by jasmonate. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.10, p.961-969, 1997.
- OKAMOTO, R., HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia** 46: 975-977, 1990.
- OLIVEIRA, J. T. A., RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A. & CAVADA, B. S. An anti-blood group A lectin from *Crotalaria striata* seeds. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** 32: 152, 1989.
- OLIVEIRA, J. T. A., MORAES, S. M. D., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. & VASCONCELOS, I. M. Protein and lectin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 10(1): 25-30, 1998
- OLIVEIRA, S. R. M., NASCIMENTO, A. E., LIMA, M. E. P., LEITE, Y. F. M. M. & BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica** 25(4): 397-403, 2002.
- PEREIRA, M. G. Isolamento e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha verde *Ulva fasciata*. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 108pp, 2000.

- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology** 109: 347-352, 1995.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W.J.N. Plant lectins: specific tools for the Identification, Isolation, and Characterization of O-Linked Glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 33(3): 209-258, 1998.
- PEREZ-LORENZO, S., LEVY-BENSHIMOLA, A. GOMEZ-ACEVEDO, S. Presencia de lectinas, taninos e inibidores de proteasas em algas marinas de las costas venezolanas. **Acta Científica Venezolana** , v.49, p.141-151, 1998.
- POLLACO, J. C., HOLLAND, M. A. Roles of ureases in plant cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 145, p.65-103, 1993.
- RAIKHEL, N.V. & LERNER, D.R. Expression and regulation of lectin genes in cereals and rice. **Developmental genetics**, 12:255-260, 1991.
- RAVIDRANATH, M. H. & COOPER, E. L. Crab lectins: receptor specificity and biomedical applications. **Program of Clinical Biology Research** 157: 83-96, 1984.
- RAPIN, A. M. C. & BURGER, M. M. Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. **Advanced Cancer Research** 20: 1-78, 1974.
- RENKONEN, H. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **Ann. Med. Exp. Fenn** , v.26, p.66, 1948.
- RIBEAU-GAYON & J., PEYNAUD. E. **Traite d'ampelologie , sciences et techniques de la vigne** / J. R, E. Peynaud. Paris :Dunod.,719pp.1971.

- ROGERS, D.J., BLUNDEN, G. & EVANS, P.R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood-group B specific lectin. **Medical Laboratory Sciences** 34: 193-200, 1977.
- ROGERS, D. J., TOPLISS, J. A. & BLUNDEN, G. Reactions of anti-B lectins with eritrocytes sensitised with lipopolysaccharide from *Echerichia coli* O<sub>86</sub>. **Medical Laboratory Sciences** 36: 79 - 84, 1979.
- ROGERS, D. J., BLUNDEN, G. TOPLISS, J. A. & GUIRY, M. D. A survey of some marine organisms for haemagglutinins. **Botanica Marina** 23(9): 569-577, 1980.
- ROGERS, D. J. & LOVELESS, R. W. Haemagglutinins of the Phaeophyceae and non-specific aggregation phenomena by polyphenols. **Botanica Marina** 28 (4): 133-137, 1985.
- ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W. & BALDING, P. Isolation and characterization of the lectins from sub-species of *Codium fragile*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (T.C. Bog-Hansen, & J. Breborowicz eds).v. 5: 155-160. Walter de Gruyter Berlin-New York, 1986.
- ROGERS, D. J., FISH, B. & BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (J. Kocourek & D.L.J. Freud eds) v. 7: 49-52. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, 1990.
- ROGERS, D.J. & FISH, B.C. Marine algal lectins. In **Lectins Reviews** (D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche & T.C. Bog-Hansen eds) v. 1: 129-142. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, 1991.
- ROGERS, D.J. & FANGLU, H. Lectins from *Codium* species. **British Phycology Journal** 26: 95-96, 1991.

Yáskara F. M. Marques Leite

- ROGERS, D.J. & HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia** 260/261: 589-593, 1993.
- ROGERS, D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G. & CRITCHLEY, A.T. Binding of N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine by lectins from species of the green marine alga genus, *Codium*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (Van Driessche, E., Fisher, J., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C. eds). v. 10: 162-165, 1994.
- RÜDIGER, H. Plant lectins- more than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p.130-152, 1998.
- SAMPAIO, A. H. Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species. Tese de Doutorado apresentada no Division of Biomedical Science, University of Portsmouth, 191. Inglaterra, 1997.
- SAMPAIO, A. H., HOGERS D. J. & BARWELL, C. J & FARNHAM, W. F. Characterization of a new lectin from the green marine alga *Ulva laetevirens*: Biology, biochemistry, clinical biochemistry. **D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche & T.C. Bg-Hansen**. Textop Hellerup, Denmark, v.11, p.96-100, 1996.
- SAMPAIO, A. H., HOGERS D. J. & BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina** 41: 427-433, 1998a.
- SAMPAIO, A. H., ROGERS, D. J. and BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry** 48(5): 765-769, 1998b.
- SANTOS, L.F.L. Toxina da salsa (*Ipomea asarifolia* R. et Schult): Aspectos bioquímicos, estruturais, funcionais e potencial biotecnológico. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 142pp, 2001.

- SCHAEFER, R. L., KELLER, K. F. & DOYLE, R. J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutination for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology** 10: 669-672, 1979.
- SCHNETTER, S. Nova Hedwigia-A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision. **J. Cramer**, p-78, 1979.
- SHARMA, R., VAN DAMME, E. J., PEUMANS, W. J., SARFIELD, P., & SCHUMACHER, U. Lectin binding reveals divergent carbohydrate expression in human and mouse Peyer's patches. **Histochemistry Cellular Biology** 105(6): 459-465, 1996.
- SHARON, N. & LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **TIBS** 12: 488-491, 1987.
- SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. 126pp., Chapman and Hall. London. New York, 1998.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of Life Sciences** 1-9, 2001.
- SHIOMI, K., KAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. **Biochimica et Biophysica Acta** 576: 118-127, 1979.
- SHIOMI, K., YAMANAKA, H. & KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries** 47(8): 1079-1084, 1981.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell** 5: 9-23, 1993.

- SILVEIRA, V. C. Toxina da Ala Marinha Vermelha *Amansia multifida* (Lamouroux). Purificação e Caracterização. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 78pp, 2001.
- SINGH, U., SINGH, B. Tropical grain Legumes as important human foods. **Econ. Bot.**, v.46,p.310-321, 1996.
- SLIFKIN, M. & DOYLE, R. J. Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews** 197-218, 1994.
- SOUSA, M F. Efeitos da salinidade na expressão gênica de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 128pp, 1999.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, N. H. & MOORE, E. S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, **30**: 1190-1198, 1958
- STINISSEN, H. M. & PEUMANS, W. J. Recent advances in biochemistry, cell biology, physiology, biosynthesis and genetics of *Gramineae* lectins. **Biochem. Physiol. Pflanzen** 180: 85-106, 1985.
- SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriology**, **32**(2): 227-237, 1936.
- TAKAHASHI, Y. & KATAGIRI, S. Seasonal variation of the hemagglutinating activities in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Nippon Suissan Gakkaishi** 53: 2133-2137, 1987.

- TREVELYAN, W. E. ; PROCTER, D. P. ; HARRINSON, J. S. Detection of on paper chromatograms. **Nature**, v.166, p.444-445, 1950.
- TRIEBOLD, H. O. **Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products**, D. Van Nostrand Co., New York, 331pp, 1946.
- TEIXEIRA, D.I.A. Distribuição, isolamento e atividade biológica de lectinas presentes em algas das Ilhas Shetland do sul da Antártica. Fortaleza, CE, 114pp. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará**, 1997.
- VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal Biochemistry** 235: 128-137, 1996.
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. **Handbook of Plant Lectin: Properties and Biochemical Applications**. John Wiley & Son, Chichester, UK, 452pp, 1998.
- VASCONCELOS, I. M. TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A. CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Arch. Biochem. Biophys.**, v.312.p.357-366,1994.
- VASCONCELOS, I.M., SIEBRA, E.A., MAIA, A.A.B., MOREIRA, R.A., NETO, M.A. F., CAMPELO, G.J.A.A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **J. Sci. Food Agric.**, v.75, p.419-426, 1997.
- VIANA, G. S.; A. L. P. FREITAS; M. M. LIMA; L. A. VIEIRA; M. C. ANDRADE & N. M. B. BENEVIDES. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red

algae Bryothamnion seforthii(turner) Kutz. And B. triquetrum (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, 35(6), 713-22, 2002.

VIJAYAN, M., CHANDRA, N. Lectins. **Cur. Op. Struct. Biol.**, v.9, p.707-714, 1999.

WU, A . M. SUGII, S. & HERP, A . A guide of carboidrate specificities of lectins. *In* **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates** (WU, A. M. ed) 819-847, Plenum Publishing Co. New York, 1988.

WU, A. M., SONG, S. C., HWANG, P. Y., WU, J. H. & CHANG, K. S. S. Binding studies on the combining site of a GalNac $\alpha$ 1-especific lectin with Thomsen-Friedenreich activity prepared from green marine algae *Codium fragile* subspecies *tomentosoides*. **European Journal Biochemistry** 233: 145-151, 1995.

ZAVODNIK,N. Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of Zavodnik,N.Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of the the litoral seaweeds *Ulva rigida* and *Porphyra leucostica* from the North Adriatic. **Botanica Marina**, v.30, p.71-82, 1998.

## 8-ANEXOS

## ANEXO 1

AMOSTRAS	EMERGÊNCIA %	VARIÂNCIA
Controle	100	a
EB -0,25%	82,53	b
EB -0,50%	88,77	b
EB -2,50%	88,91	b
EB -1,00%	82,20	b
F0/70 -0,25%	43,86	b
F0/70 -0,50%	59,88	b
F0/70 -2,50%	65,69	b
F0/70 -1,00%	67,45	b
PII -0,10%	65,41	b
PII -0,25%	67,40	b
PII - 0,50%	66,98	b
PII - 1,00%	81,19	b

## ANEXO 2

AMOSTRAS	SOBREVIVÊNCIA	VARIÂNCIA
Controle	100	a
EB -0,25%	76,78	ab
EB -0,50%	72,88	ab
EB -1,00%	37,32	ab
EB -2,50%	31,47	b
F0/70 -0,25%	69,33	ab
F0/70 -0,50%	83,56	ab
F0/70 -1,00%	58,62	ab
F0/70 -2,50%	57,33	ab
PII -0,10%	70,83	ab
PII -0,25	49,31	ab
PII - 0,50%	40,86	ab
PII -1,00%	34,96	b

## ANEXO 3

AMOSTRAS	PESO	VARIÂNCIA
Controle	100	a
EB -0,25%	82,16	ab
EB -0,50%	80,42	ab
EB -1,00%	91,26	ab
EB -2,50%	88,46	ab
F0/70 -0,25%	95,45	ab
F0/70 -0,50%	94,75	ab
F0/70 -1,00%	96,50	ab
F0/70 -2,50%	94,06	ab
PII -0,10%	86,71	ab
PII -0,25%	84,46	ab
PII -0,50%	93,35	ab
PII -1,00%	84,96	ab

## ANEXO 4

AMOSTRAS	DIAS	VARIÂNCIA
Controle	28,43	a
EB -2,50%	30,00	ab
EB -1,00%	30,33	ab
EB -0,50%	27,67	ab
EB -0,25%	27,32	ab
F0/70 -2,50%	29,51	ab
F0/70 -1,00%	29,29	ab
F0/70 -0,50%	27,56	ab
F0/70 -0,25%	29,69	ab
PII -1,00%	28,95	ab
PII -0,5%	28,20	ab
PII - 0,25%	30,22	ab
PII - 0,1%	29,77	ab