



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

POTENCIAL AÇÃO INSETICIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
FICOERITRINA ISOLADA DA MACROALGA VERMELHA *Hypnea musciformis*

FORTALEZA

2020

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

POTENCIAL AÇÃO INSETICIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
FICOERITRINA ISOLADA DA MACROALGA VERMELHA *Hypnea musciformis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

FORTALEZA

2020

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)

- N671p Nobre, Clareane Avelino Simplicio.
Potencial ação inseticida e caracterização bioquímica de uma ficoeritrina isolada da macroalga vermelha *Hypnea musciformis* / Clareane Avelino Simplicio Nobre. – 2021.
82 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Ficobiliproteína. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Glicanos. 4. Ficoeritrina. 5. Lectina. I. Título.
CDD 664
-

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

POTENCIAL AÇÃO INSETICIDA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
FICOERITRINA ISOLADA DA MACROALGA VERMELHA *Hypnea musciformis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 21/12/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras
Centro Universitário UNINTA

Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins
Centro Universitário UNINTA

Dr. Vinícius José da Silva Osterne
Universidade Estadual do Ceará

À minha avó Zélia Braga, que nunca mediu esforços para ajudar na educação dos filhos e netos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a capacidade de seguir essa jornada, sempre sendo luz na minha vida.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, que me ajudou, tirando dúvidas, sempre com alternativas e por me incentivar sempre.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada pela orientação, por permitir a realização desse trabalho no BioMol- Lab e por sempre incentivar seus alunos com novos desafios.

Agradeço ao amigo Vinícius da Silva Osterne por todas as dúvidas esclarecidas e pela participação direta neste trabalho. Em especial, agradeço as minhas amigas Cláudia Lóssio, Mayara Torquato e Maria Gleiciane, que me ajudaram em todos os momentos e pela companhia diária na biologia molecular.

Ao meu esposo, Vianney, agradeço todos os dias por ser meu suporte e enfrentar comigo essa caminhada linda da vida.

À minha mãe Célia, meu Pai Antônio e meus irmãos Diogo, Lucas, Carine e Amanda por serem presentes na minha vida.

Em especial dedico este trabalho à Maria Clara e Heitor, que são minha vida, meus amados filhos e fonte de amor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aos laboratórios de fitopatologia e proteção de plantas e Agrozologia da universidade de Ghent.

À FUNCAP, pelos recursos financeiros com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

A agricultura no século XXI busca produzir mais alimentos para suprir a necessidade de uma população crescente com uma força de trabalho rural menor. Esse aumento populacional está acompanhado com os crescentes investimentos na produção agrícola e, conseqüentemente, no uso de inseticidas que visam garantir o controle de pragas que possam afetar esse investimento, que são cada vez mais potentes e perigosas. O grande problema do uso de pesticidas químicos está nos danos causados ao ambiente e à vida humana, seu uso pode interferir diretamente na diminuição da biodiversidade de espécies ou mesmo contribuir para o aparecimento de espécies resistentes que causam prejuízos irreversíveis ao ambiente. Há um grande esforço para reduzir o risco da exposição humana à pesticidas, alguns estudos, inclusive, focam em inseticidas mais seguros e mais seletivos para pragas naturais. A demanda de inseticidas com novos modos de ação e formulações estão sendo desenvolvidos e registrados com base em regulamentos rígidos, levando em consideração a segurança do meio ambiente e de espécies não-alvo. Estudar outras moléculas capazes de exercerem atividade inseticida é um papel da comunidade científica, pois torna possível a utilização de alternativas menos agressivas ao ambiente e ao próprio ser humano. Nesse sentido, foi avaliada a atividade inseticida de uma ficobiliproteína, a HMLp, purificada de *Hypnea musciformis*, contra células de insetos de *Drosophyla melanogaster* linhagem S2 e *Choristoneura fumiferana* linhagem CF1. A proteína apresentou atividade de inibição do crescimento celular da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster* após 48 horas de incubação. Com relação a *Choristoneura fumiferana* linhagem CF1, a HMLp não inibiu o crescimento das células quando comparada com o controle. A caracterização bioquímica de HMLp mostrou que essa proteína é um heterodímero composto de duas subunidades denominadas alfa e beta, apresentando massa molecular aparente de 20 e 22 kDa, respectivamente. A HMLp apresentou estabilidade até 100 °C de temperatura, estabilidade na faixa de pH de 6,0 a 9,0 e especificidade por N-glicanos. HMLp foi classificada como ficoeritrina a partir de dados de sequenciamento de peptídeos utilizando espectrometria de massas com fonte de ionização MALDI. Esses ensaios preliminares sugerem que HMLp pode ser uma potencial ferramenta em estudos como agente inseticida em outros modelos biológicos.

Palavras-chave: ficobiliproteína; *Drosophila melanogaster*; glicanos; ficoeritrina; lectina.

ABSTRACT

Agriculture in the 21st century seeks to produce more food to meet the need for a growing population with a smaller rural workforce. This population increase is accompanied by increasing investments in agricultural production and, consequently, in the use of insecticides that aim to guarantee pest management, as these pests can progressively and dangerously affect this investment. The problem with the use of chemical pesticides is the hazard caused to environment and human life, as their use can directly interfere in decrease of species biodiversity or even contribute to the emergence of resistant species that cause irreversible damage to the environment. There is a great effort to reduce the risk of human exposure to pesticides, some studies even focus on safer and more selective insecticides for natural pests. The demand for insecticides with new modes of action and formulations is being developed and registered based on strict regulations, considering environment and non-target species safety. The prospection of other molecules that present insecticidal activity is a main goal of the scientific community, as it would make possible the use alternatives that are less aggressive to the environment and to the human being itself. In this sense, the insecticidal activity of a phycobiliprotein, HMLp, purified from *Hypnea musciformis*, against insect cells of *Drosophila melanogaster* strain S2 and *Choristoneura fumiferana* strain CF1 was evaluated. The protein showed cell growth inhibition activity of *Drosophila melanogaster* S2 after 48 hours of incubation. Regarding *Choristoneura fumiferana* strain CF1, HMLp did not inhibit cell growth when compared to the control. The biochemical characterization of HMLp showed that this protein is a heterodimer composed of two subunits called alpha and beta, with an apparent molecular mass of 20 and 22 kDa, respectively. HMLp showed stability up to 100 °C of temperature, stability in the pH range of 6.0 to 9.0 and specificity for N-glycans. HMLp was classified as phycoerythrin from peptide sequencing data using mass spectrometry with MALDI ionization source. These preliminary tests suggest that HMLp may be a potential tool in studies as an insecticidal agent in other biological models.

Keywords: phycobiliprotein; *Drosophila melanogaster*; glycan; phycoerythrin; lectin.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | – Alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 16 |
| Figura 2 | – Complexo que forma um ficobilissomo | 21 |
| Figura 3 | – Estrutura química dos cromóforos | 22 |
| Figura 4 | – Biossíntese do cromóforo | 23 |
| Figura 5 | – Aplicações de ficobiliproteínas nas indústrias alimentícia, cosmética farmacêutica e biomédica | 26 |
| Figura 6 | – Localização dos glicoconjugados nos compartimentos extracelular e intracelular | 29 |
| Figura 7 | – Purificação da HMLp e determinação do grau de pureza e subunidades monoméricas | 46 |
| Figura 8 | – Propriedade hemaglutinante da HMLp | 47 |
| Figura 9 | – Efeito da estabilidade da HMLp a uma ampla faixa de pH e temperatura | 49 |
| Figura 10 | – Glicanos utilizados para análise da especificidade da HMLp | 51 |
| Figura 11 | – <i>Glycan array</i> da HMLp | 52 |
| Figura 12 | – <i>Glycan array</i> da HMLp com alguns ligantes fracos | 54 |
| Figura 13 | – Mapa peptídico da cadeia alfa da HMLp | 56 |
| Figura 14 | – Mapa peptídico da cadeia beta da HMLp | 56 |
| Figura 15 | – Ensaio de citotoxicidade da HMLp sobre células de inseto da linhagem S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> | 59 |
| Figura 16 | – Gráfico de crescimento das células de inseto da linhagem S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> | 60 |
| Figura 17 | – Ensaio de citotoxicidade da HMLp sobre células de inseto da linhagem CF1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> | 64 |
| Figura 18 | – Gráfico do crescimento das células de inseto da linhagem CF1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Localização dos glicoconjugados nos compartimentos extracelular e intracelular | 33 |
| Tabela 2 – Peptídeos sequenciados da cadeia alfa por MS/MS | 55 |
| Tabela 3 – Peptídeos sequenciados da cadeia beta por MS/MS | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| AplA | Lectina de <i>Fremyella diplosiphon</i> |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| Bt | <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| BTL | Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> |
| CF-1 | Células de <i>Choristoneura fumiferana</i> |
| CTAB | Brometo de Cetiltrimetilamônio |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| GOL | Lectina de <i>Gracilaria ornata</i> |
| GRFT | Lectina de <i>Grifthisin sp.</i> |
| GUTAW1 | Células de <i>Helicoverpa zea</i> , lepdoptera |
| HCA | Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> |
| HJA | Lectina de <i>Hypnea japônica</i> |
| HML | Lectina de <i>Hypnea musciformis</i> |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| MALDI | Ionização e dessorção a laser assistida por matriz |
| PBS | Ficobilissomo (phycobilissome) |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PE | Ficoeritrina (phycoerythrin) |
| PEB | Ficobiliproteína (phycobiliprotein) |
| PI | Ponto isoelétrico |
| PNA | Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| RFU | Unidades de fluorescência Relativa |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| S2 | Células de <i>Drosophila melanogaster</i> |
| Sf9 | Células de vários de <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| TBE | Tris-borato |
| TcA | Células de <i>Tribolium castaneum</i> , Coleoptera |

TFA Ácido Triclororacético

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Considerações gerais | 13 |
| 1.2 | Algas | 13 |
| 1.2.1 | <i>Algas marinhas vermelhas</i> | 15 |
| 1.2.2 | <i>Alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i></i> | 16 |
| 1.3 | Importância biotecnológica das algas marinhas vermelhas | 17 |
| 1.4 | Ficobiliproteínas de macroalgas marinhas vermelhas | 18 |
| 1.4.1 | <i>Histórico</i> | 18 |
| 1.4.2 | <i>Definição e características estruturais</i> | 19 |
| 1.4.3 | <i>Importância biotecnológica das ficobiliproteínas</i> | 25 |
| 1.5 | Lectinas | 28 |
| 1.5.1 | <i>Lectinas de algas marinhas</i> | 31 |
| 1.6 | Atividade inseticida | 33 |
| 1.6.1 | <i>Células de <i>Drosophila melanogaster</i> (linhagem S2)</i> | 37 |
| 1.6.2 | <i>Células de <i>Choristoneura fumiferana</i> (linhagem CFI)</i> | 37 |
| 2 | OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 | Objetivo geral | 39 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 30 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 3.1 | Coleta e fracionamento proteico | 40 |
| 3.2 | Cromatografia de troca iônica e avaliação do perfil eletroforético da HMLp | 40 |
| 3.3 | Avaliação da atividade hemaglutinante | 41 |
| 3.4 | Efeito de temperatura sobre a atividade hemaglutinante da HMLp | 41 |
| 3.5 | Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da HMLp | 42 |
| 3.6 | Ensaio de inibição | 42 |
| 3.7 | Determinação da especificidade fina da HMLp por <i>Glycan array</i> | 42 |
| 3.8 | Identificação da função da HMLp por sequenciamento de peptídeos | 43 |
| 3.9 | Atividade biológica contra células de insetos | 44 |
| 3.9.1 | <i>Incubação com células de insetos</i> | 44 |
| 3.9.2 | <i>Avaliação da fluorescência</i> | 44 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 45 |
| 4.1 | Perfil de purificação e caracterização bioquímica da HMLp | 45 |
| 4.2 | Análise da especificidade da HMLp por <i>Glycan array</i> | 50 |
| 4.3 | Identificação da função da proteína HMLp por sequenciamento de peptídeos | 55 |
| 4.4 | Análise da atividade inseticida da HMLp contra células de insetos | 57 |
| 5 | CONCLUSÕES | 68 |
| | REFERÊNCIAS | 69 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A biotecnologia marinha é uma área de rápido crescimento, com receita na Europa prevista para atingir € 1 bilhão em 2020. Os produtos e aplicações são altamente diversos, abrangendo a produção de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e aplicações médicas. O aprimoramento e a ampliação de pesquisas científicas se faz necessário para a contínua bioprospecção e desenvolvimento de novos produtos para o mercado (EUROPEAN MARINE BOARD, 2017). Apesar de ser uma área bastante atrativa, ainda existem alguns fatores limitantes quanto à pesquisa e bioprospecção de organismos marinhos. Muitas vezes o processo se torna bastante longo em decorrência das metodologias utilizadas para o isolamento, elucidação estrutural, caracterização e gerenciamento dos resultados obtidos. Esses fatores são agravados pela complexidade estrutural, quantidade excepcionalmente limitada disponível para os estudos e condições difíceis de coleta e manuseio desse tipo de material. Complicações adicionais surgem quanto à identificação (aspectos quimiotaxonômicos) dos organismos, e pela incerteza quanto à origem de um composto ativo, o qual pode ter sido sintetizado devido aos fenômenos de simbiose (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012).

Dentre os recursos marinhos, as algas marinhas merecem um destaque especial, pois oferecem uma grande diversidade tanto em espécies quanto em bioprodutos com importantes aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BOROWITZKA, 2015). Diversos estudos mostram que, através das algas marinhas, é possível obter moléculas com interessantes potenciais biotecnológicos como, por exemplo, lectinas, polissacarídeos sulfatados (ágar e carragenana), carotenoides, lipídeos, ficobiliproteínas, dentre outras moléculas (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; SOUSA, 2010; THANGAM *et al.*, 2013; TAKAICHI, 2011).

1.2 Algas

Os oceanos são considerados os “pulmões da terra”, pois oferecem até 80% do oxigênio atmosférico, do qual dependemos para respirar, isso só é possível devido a existência de cianobactérias e algas fotossintéticas. As cianobactérias são organismos procarióticos, enquanto as algas são organismos eucarióticos (BARSANTI; GUATIERI, 2014).

As algas são quase onipresentes, podendo ser encontradas em vários ecossistemas aquáticos. Esses organismos constituem um “grupo” com ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência conforme demonstrado, em especial, pela teoria da endossimbiose dos cloroplastos e das mitocôndrias, e por diversos estudos bioquímicos e de biologia molecular. Esses organismos fotossintéticos variam entre uni a pluricelulares e seus órgãos de reprodução (gametângios ou esporângios) não são envolvidos por camada de células estéreis (BICUDO; MENEZES, 2010).

Vários filos são inclusos na classificação desses organismos, tais como, o filo rodófito (algas vermelhas), clorófito (algas verdes), feófito (algas pardas), bacilariófito (diatomáceas) e um grupo procariótico representado pela divisão cianófito (alga verde-azul) (VAN DEN HOEKE; MAN; JAHNS, 1995; MOHAMED *et al.*, 2012). Além disso, o termo “alga” não é taxonômico, sendo usado para indicar um grupo de organismos variado que, mesmo possuindo a clorofila *a*, não possuem raízes, caule, folhas ou tecidos vasculares bem definidos, muitas vezes conhecidas como “plantas inferiores” (BARSANTI; GUATIERI, 2006). Elas apresentam diversas formas, tamanhos e distribuição no ecossistema, sendo constituídas por aproximadamente 40 mil espécies de algas que se apresentam na forma micro e macroscópica, denominadas micro e macroalgas, respectivamente. Elas podem apresentar talos cenocítico, parenquimatoso e pseudoparenquimatoso, sendo a maioria das espécies macroscópicas pertencente à classe das algas vermelhas (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; EL GAMAL, 2010).

O filo rodófito inclui principalmente espécies marinhas multicelulares, enquanto espécies de água doce ou unicelulares são raras. As células são esféricas com um núcleo contendo um cloroplasto rodeado por duas membranas (HEIMANN; HUERLIMANN, 2015). As rodófitas devem sua cor à presença em excesso de R-ficoeritrina e seus cromóforos, e esse pigmento vermelho mascara a cor de outros pigmentos fotossintéticos.

As clorófitas constituem um grupo bastante heterogêneo, apresentam uma enorme variabilidade de forma, tamanho e hábitos. Como produtoras primárias, as algas verdes têm uma importância em nosso planeta comparável à das florestas tropicais. Provavelmente essas espécies têm um ancestral comum com as plantas terrestres, pois possuem o mesmo tipo de pigmento e produzem o mesmo tipo de carboidrato durante a fotossíntese (NASELLI-FLORES; BARONE, 2009). Essas algas são encontradas na forma unicelular, em colônias (cenóbio), na forma filamentosa e parenquimatosa (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

As algas pardas são aquelas que pertencem ao filo feófito, como o sargaço e a laminária. Essas algas são exclusivamente marinhas e multicelulares, podendo atingir grandes

dimensões, sendo reconhecidas, por esse motivo, como os maiores organismos do reino protista. O género *Macrocystis*, vulgarmente conhecido por *kelp*, pode atingir vários metros de comprimento, e são especialmente abundantes em costas rochosas temperadas ou frias. Algumas, como o sargaço, formam extensas massas flutuantes ao longo da costa, mas a grande maioria está firmemente fixada às rochas por uma estrutura especializada (SIMBIÓTICA, 2020).

As macroalgas representam um dos principais componentes do ecossistema marinho e são de fundamental importância ecológica como produtores primários nas regiões costeiras das águas oceânicas. As rodófitas possuem a maior diversidade de espécies, aproximadamente 6.000, e incluem espécies que podem ser cultivadas e com grande valor comercial como, por exemplo, a *Porphyra* (ou nori em japonês), que é consumida como alimento em todo o mundo e considerada a base da agricultura de muitos países asiáticos (REDDY; GUPTA; JHA, 2010).

1.2.1 Algas marinhas vermelhas

Sobre as algas marinhas vermelhas, acredita-se que o seu plastídeo (organela celular) se originou por endossimbiose primária, formando uma quimera que deu origem às três principais linhagens fotossintéticas, ou seja, as algas vermelhas, verdes (incluindo plantas terrestres) e as glaucófitas (YOON; ZUCCARELLO, 2010; HACKETT, 2007). Nesse sentido, dados filotranscriptômicos, utilizando conjuntos de dados nucleares para a reconstrução filogenética, mostram que há aproximadamente 450–500 milhões de anos atrás, as plantas terrestres evoluíram a partir de uma linhagem de algas estreptófitas (WICKETT *et al.*, 2014).

Cerca de 98% das espécies estão presentes no ambiente marinho e apenas 2% em água doce, exibindo uma ampla gama de ciclos de vida e morfologia (ADL *et al.*, 2005). A cor vermelha característica, e suas muitas variações, são o resultado de uma diversidade de pigmentos fotossintéticos como clorofilas, carotenoides, ficoeritrinas (vermelha), ficocianina (azul) e aloficocianina (azul-esverdeado) (GROSSMAN *et al.*, 1993).

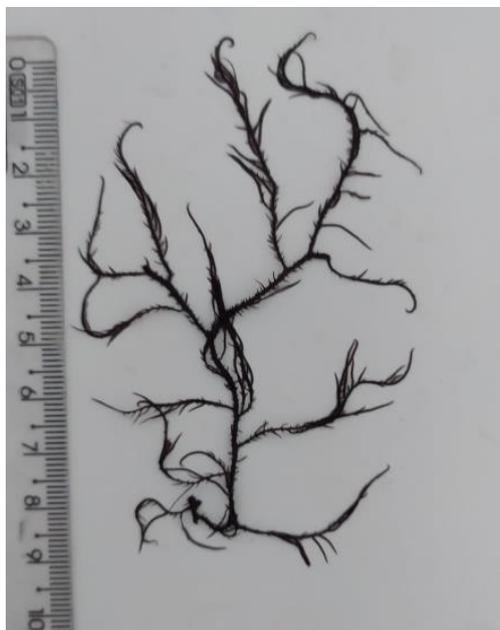
As paredes das células de algas vermelhas são compostas por fibrilas de celulose (raramente fibrilas de xilana) e uma matriz de hidrocolóides. As matrizes de hidrocolóides da parede celular são formadas por polissacarídeos sulfatados (ágar e carragenana), sendo que algumas espécies apresentam depósitos de carbonato de cálcio, cujo estado cristalino podem conferir formas diferentes nessas algas. Tradicionalmente, as algas vermelhas são separadas em três grupos principais que são: um grupo unicelular com reprodução apenas por divisão celular

binária, um grupo multicelular onde um ramo carpogonial está ausente ou incipiente (Bangiofíceas) e um grupo multicelular com ramos carpogoniais bem desenvolvidos (Florideofíceas). A taxonomia de algas vermelhas é um campo dinâmico com novos esquemas de classificação em diferentes níveis de organização biológica, sendo propostos frequentemente, isso porque muitas espécies novas vêm sendo descritas a cada ano, especialmente com o advento de análises filogenéticas baseadas em moléculas (GURGEL; LOPEZ-BAUTISTA, 2007).

1.2.2 Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*

É importante ressaltar que o gênero *Hypnea* apresenta um total de 67 espécies amplamente distribuídas no ambiente marinho (GERALDINO *et al.*, 2010). Espécies de *Hypnea* são abundantes nos substratos rochosos da costa do Ceará sendo a alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* uma epífita pertencente a seguinte classificação (Figura 1):

Figura 1 - Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*



Fonte: Imagem elaborada pela autora (2020).

Classificação taxonômica:

Domínio: Eukaryota

Reino: Protista

Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: *Cystocloniaceae*

Gênero: *Hypnea*

Espécie: *Hypnea musciformis*

A *Hypnea musciformis* é uma alga cultivada comercialmente em todo o mundo como fonte de alimento e por ter grande quantidade de carragenana. É comum em recifes submarinos calmos e rasos, piscinas de maré e em bancos rochosos entre marés. Durante o florescimento, pode ser encontrada flutuando livremente (HAYEE-MEMON; SHAMEEL, 1996).

Além de ser cultivada em diversos lugares do mundo, a *Hypnea musciformis* apresenta uma riqueza de compostos bioativos. Os principais constituintes são o ácido n-hexadecanóico, ácido tetradecanóico, ácido oleico-9-octadecenóico, entre outros. Análises bioquímicas dessa alga mostraram grande quantidade de conteúdo fenólico, vitaminas A, C e E e antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis, além de Ca, Mg, Na, K e Fe (BALAMURUGAN *et al.*, 2013)

1.3 Importância biotecnológica das algas marinhas vermelhas

As algas ocorrem normalmente em habitats complexos, frequentemente em condições ambientais extremas que favorecem o desenvolvimento de estratégias de defesa, produzindo uma grande variedade de metabólitos secundários e outras biomoléculas (SANTOS *et al.*, 2015). O uso da biomassa de algas como fonte de bioprodutos tem sido estudado há anos, mostrando que algumas espécies produzem uma grande quantidade de carboidratos, proteínas, pigmentos e óleos que poderiam ser usados como produtos na indústria nutracêutica e de biocombustíveis (MARTINS *et al.*, 2018).

As algas marinhas fornecem produtos que podem ser aplicados na indústria cosmética e alimentícia. Em macroalgas vermelhas podem ser encontrados dois tipos de hidrocoloides, o ágar e a carragenana, que são carboidratos solúveis em água com grande capacidade de formarem géis com diversas aplicações industriais (BARSANTI; GUATIERI, 2006). Esses biopolímeros possuem diversas aplicações como, por exemplo, função de estabilizar produtos alimentícios e suporte de matrizes de eletroforese e colunas cromatográficas que são utilizadas em pesquisas científicas e em análises clínicas. A carragenana pode ser encontrada em grandes quantidades nos gêneros de algas vermelhas *Kappaphycus*, *Hypnea* e *Betaphycus*, e serem comercializadas em larga escala devido a sua capacidade de ser utilizada como aditivo alimentar natural, agente gelificante, espessante e estabilizante de alimentos e, também, como insumo de drogas solúveis (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; EL GAMMAL, 2010).

Alguns pigmentos naturais são encontrados nas algas marinhas vermelhas, dentre eles, podemos citar os carotenoides que podem apresentar grupos funcionais contendo oxigênio, como as xantofilas, ou com a presença de hidrocarbonetos insaturados, como os carotenos (SOUSA *et al.*, 2006). O papel dos carotenoides na área da saúde é amplamente estudado pelo fato de apresentarem atividade antioxidante. Alguns estudos relatam a participação dos

carotenoides nos processos de envelhecimento e no combate de doenças graves como o câncer e o derrame (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2004; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

Além dos carotenoides, as algas marinhas possuem as ficobiliproteínas, também chamadas de pigmentos acessórios ou antena. Diversos estudos mostram que as aplicações biotecnológicas de ficobiliproteínas se estendem desde a indústria farmacêutica até a alimentícia, muitas delas relacionadas as características espectroscópicas dessas biomoléculas (PATEL *et al.*, 2004; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013).

Ainda com relação as biomoléculas, é importante destacar as lectinas de algas marinhas, que são biomoléculas bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico. As lectinas podem ser purificadas de diversas algas, tais como, pardas, verdes e vermelhas, e apresentam atividades biológicas diversas como, por exemplo, atividade antiviral, sendo essa característica relacionada principalmente a capacidade de reconhecer oligossacarídeos (WU *et al.*, 2016; SATO *et al.*, 2015; HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

Do ponto de vista biotecnológico, as algas marinhas possuem importância econômica, pois são utilizadas como fonte de produtos naturais com aplicações em diversas áreas. Essas características renderam diversas patentes relacionadas à produtos biotecnológicos de origem marinha, contribuindo para o desenvolvimento científico e agregando alto valor comercial para esses recursos (BRASIL, 2010).

A caracterização química detalhada e a identificação de componentes bioativos ainda são amplamente inexploradas em muitas espécies. Além disso, essa caracterização é de grande interesse, uma vez que a maioria das espécies de macroalgas fazem parte da dieta tradicional de regiões específicas e, por sua vez, a agricultura e introdução na dieta humana está se tornando uma tendência global (SANTOS *et al.*, 2015).

1.4 Ficobiliproteínas de macroalgas marinhas vermelhas

1.4.1 Histórico

No ano de 1836, Ness Esebeck trabalhando com *Oscillatoria sp.*, uma cianobactéria, descreveu um pigmento azul brilhante que apresentava grande solubilidade em água, o qual chamou de saprocianina. Alguns anos depois, foi possível isolar pigmentos avermelhados e solúveis em água de algas marinhas vermelhas, recebendo a denominação de ficoeritrinas. Em 1854, Stokes realizou as primeiras análises espectroscópicas desses

pigmentos, observando a intensa fluorescência, uma das principais características dessas moléculas (MARSAC, 2003).

No final do século XIX, Molisch Hans (1894) obteve os primeiros cristais de ficobiliproteínas, propondo a natureza proteica dessas biomoléculas, sendo essa teoria reforçada por diversos estudos posteriores que, entre outras características, mostraram as diversas propriedades físico-químicas e estruturais dessa nova classe de proteínas (MARSAC, 2003). A sequência completa de aminoácidos só foi divulgada no final da década de 70, em 1978, a partir dos estudos de estrutura primária de uma ficocianina isolada de *Mastigocladus laminosus*, uma cianobactéria termofílica (FRANK *et al.*, 1978).

O uso de algas marinhas está presente há séculos na dieta alimentar de diversas regiões, a espirulina, por exemplo, tem uma história documentada de uso como alimento há mais de 1000 anos, e é produzida como suplemento dietético há 40 anos. Dentre muitos dos componentes bioativos, as ficobiliproteínas e seus cromóforos ocupam um lugar especial devido às amplas possibilidades de aplicações em diversas áreas da tecnologia de alimentos e na farmacologia (STANIC-VUCINIC, 2018).

1.4.2 Definição e características estruturais

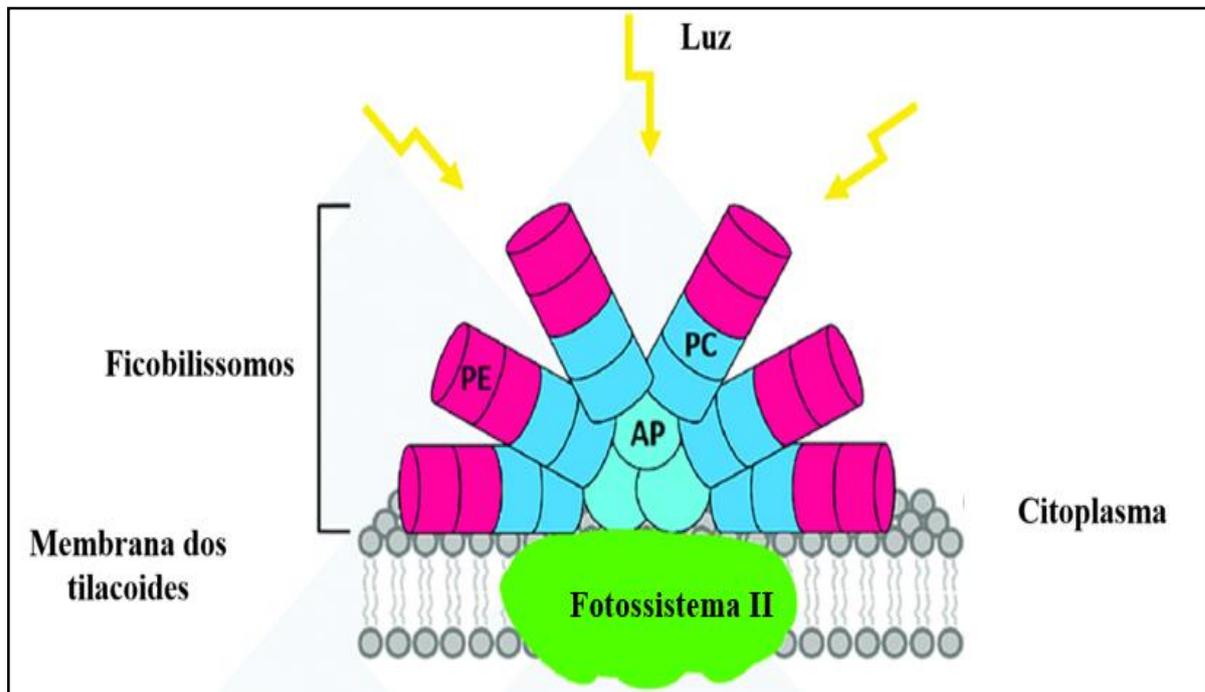
A fotossíntese ocorre nos cloroplastos dos organismos autotróficos eucariontes, caracterizada por ser um processo responsável pela transformação da energia luminosa em energia química, dividida nas fases de reações luminosas e fase de assimilação do carbono (clara e escura). Clorofila, carotenoides e ficobiliproteínas (*Phycobiliprotein*- PEB) são as três classes de pigmentos naturais encontrados nas algas marinhas, sendo a clorofila *a* o principal pigmento fotossintético por estar presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica (PANGESTUTI; KIM, 2011; NELSON; COX, 2009). A energia solar captada por organismos fotossintéticos se baseia em comprimentos de onda de 400 a 700 nm (radiação fotossinteticamente ativa), convertida em energia química que pode ser usada diretamente nas células. Diferentemente das plantas e das algas verdes, as principais “antenas” de captação de luz nas cianobactérias e nas algas vermelhas é um grande complexo de proteínas (ficobiliproteínas) com múltiplas subunidades chamado de ficobilissomo (*Phycobilisome* - PBS) (LI *et al.*, 2019).

No momento da endossimbiose primária, acredita-se que os únicos organismos produtores de oxigênio conhecidos eram as cianobactérias. A maioria das cianobactérias modernas utiliza as ficobiliproteína para captar espectros de luz, e algumas substituem os

sistemas baseados em clorofila por ficobiliproteínas sob escassez de ferro (BIBBY *et al.*, 2001; BOEKEMA *et al.*, 2001). A presença de clorofila b (Chl b) nas “cianobactérias verdes” e nas plantas levou à proposta de que ambos os sistemas de captação de luz estavam presentes na cianobactéria que deu origem ao plastídeo moderno (PINEVICH *et al.*, 2012).

As ficobiliproteínas (PEB) são chamadas de pigmentos acessórios ou antenas, e apresentam a capacidade de participarem de uma cadeia eficiente de transferência de energia nos organismos, absorvendo luz fotossintética em porções do espectro visível (450-650 nm) (ROMAN *et al.*, 2002, SOUSA *et al.*, 2006). As ficobiliproteínas são constituídas por uma parte proteica (apoproteína) ligada covalentemente a cromóforos denominados bilinas (grupo prostético) encontrados em cianobactérias, algas vermelhas e criptófitas (alga eucariótica unicelular) (GLAZER, 1994; GROSSMAN, 1993; OVERKAMP *et al.*, 2014). Elas formam um complexo altamente ordenado denominado ficobilissomo, localizado na membrana dos tilacoides (Figura 2). A energia dos fótons absorvidos pelos pigmentos é conduzida para a clorofila *a* presente no centro de reação fotossintético, promovendo o fluxo ideal e condições fotoquímicas necessárias (NELSON; COX, 2009; ADIR, N.; BAR-ZVI, S.; HARRIS, D., 2020). Os ficobilissomos permitem que as ficobiliproteínas se arranjam geometricamente para otimizar a captura de luz e transferência de energia, participando de uma cadeia de transferência em sequência (ficoeritrina - PE > ficocianina - PC > aloficocianina - AP > clorofila *a*) (KUDDUS *et al.*, 2013).

Figura 2- Complexo que forma um ficobilissomo

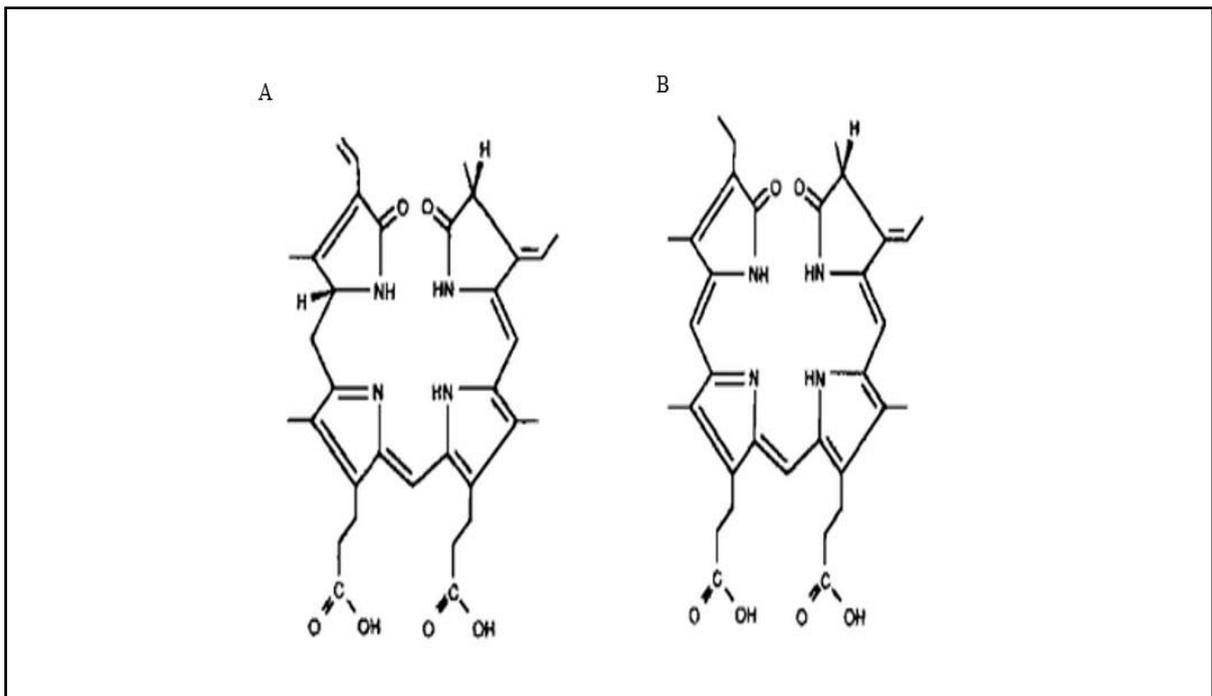


Fonte: Adaptado de Kim et al., 2018.

Essa característica de otimização da absorção de luz é importante para as algas que vivem em ambientes com flutuações de maré, onde a intensidade da luz na coluna d'água pode variar ao longo do dia. Dessa maneira, as PEBs absorvem de forma efetiva os comprimentos de ondas da luz solar que a clorofila seria ineficiente na captura. Segundo Montgomery *et al.* (2017), a água apresenta um ambiente de luz diferenciado de acordo com a profundidade. Nesse sentido, a absorção preferencial de fótons de comprimento de onda longo e com baixa energia, como a luz vermelha, determina a distribuição espectral da atenuação da luz em regiões menos profundas onde existem as macroalgas, enquanto os fótons azuis de comprimento de onda curto e alta energia podem penetrar em regiões de grande profundidade. Como resultado, as águas profundas estão cheias de luz azul esverdeada, e muitas cianobactérias e algas vermelhas podem sobreviver no ambiente luminoso com irradiância menor que 1%, e algumas microalgas, ainda menores, podem exigir irradiância luminosa tão baixa quanto 0,1%, até menos, porque as PEBs podem capturar e transmitir com eficiência a energia da luz solar em áreas de águas profundas, em particular, a luz azul esverdeada. Curiosamente, as cianobactérias exibem uma forma de fotomorfogênese denominada aclimação cromática (CA), e uma das características da CA é regular a composição de pigmentos da PEB para otimizar a absorção de luz para a fotossíntese, adaptando-se, portanto, ao ambiente natural.

O cromóforo (bilina) corresponde ao grupo prostético de cadeia tetrapirrólica linear que se ligam covalentemente às proteínas específicas através de uma ou duas ligações do tipo tioéter entre os resíduos de cisteínas (Figura 3). As maiores classes de ficobiliproteínas são as ficocianinas e as ficoeritrinas que possuem coloração azul e vermelha, respectivamente. Esses pigmentos são responsáveis pela coloração características de cada organismo que as possuem (BEALE, 1991).

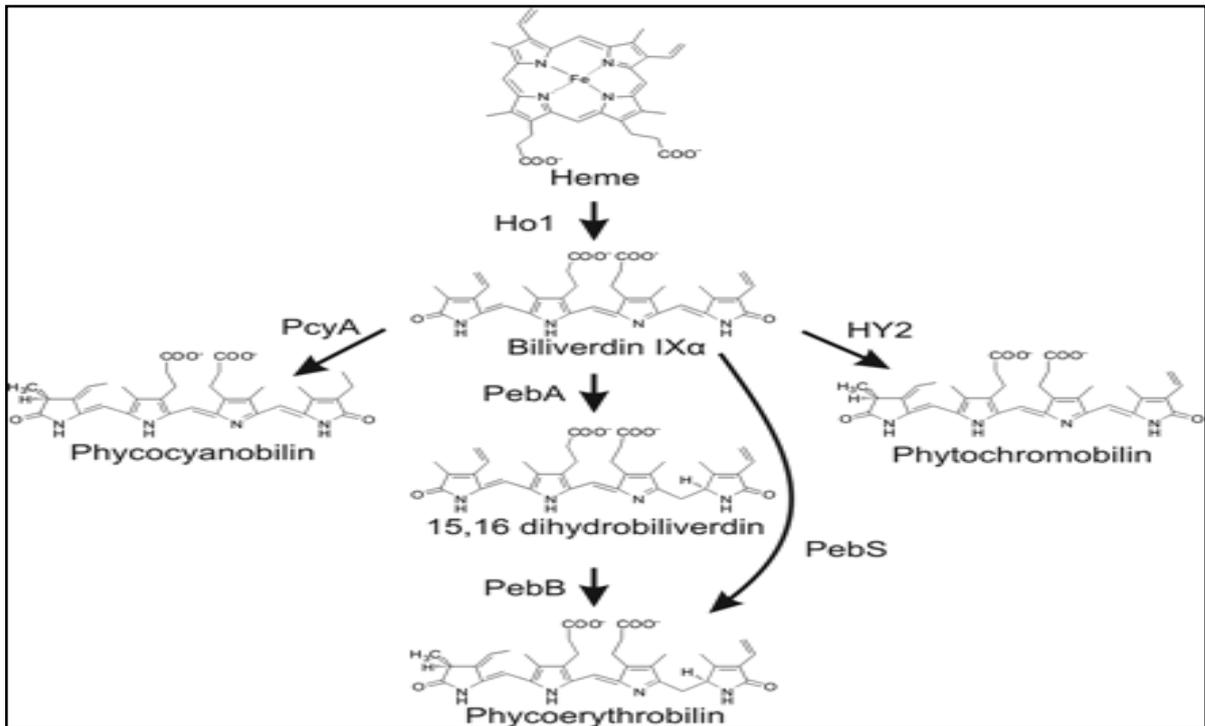
Figura 3- Estrutura química dos cromóforos



Fonte: Adaptado de Beale (1991). A) Ficeritrobilina e B) Ficoeritrocianina.

No começo da década de 90, Beale e Cornejo (1991), relataram a biossíntese das bilinas na alga vermelha *Cyanidium caldarium*, mostrando que essas moléculas são sintetizadas a partir do succinil-CoA e glicina que produzem o ácido α -aminolevulínico que forma o grupo heme via biliverdina. Inicialmente, a heme oxigenase cliva o grupo heme para formar a biliverdina IX α , nos organismos fotossintéticos eucarióticos, a fotocromobilina sintase converte a biliverdina IX α em fitocromobilina, em seguida, a ficobilina apresenta-se como o produto da biossíntese (Figura 4). Essas moléculas podem ser utilizadas por várias espécies para conferir diferentes combinações de cromóforos e ficobiliproteínas com capacidade de otimizar a captação de luz para a fotossíntese de acordo com o espectro de luz disponível (SCHLUCHTER; GLAZER, 1999; ALVEY *et al.*, 2011).

Figura 4 - Biossíntese do cromóforo



Fonte: ALVEY *et al.*, 2011.

O espectro de absorção das ficobiliproteínas varia de cerca de 450 a 660 nm, sendo divididas em três classes principais com base em diferentes características espectrais que são as: ficoceritrina ou ficoeritrocianina, ficocianina e aloficocianina (LARKUM *et al.*, 2003). As ficoeritrinas (PE) são as ficobiliproteínas mais abundantes nas algas vermelhas e algumas cianobactérias unicelulares, estas são divididas em três subclasses com base nas propriedades espectroscópicas. São classificadas em C-ficoeritrina (λ max \sim 565 nm), B-ficoeritrina (λ max \sim 495 nm) e R-ficoeritrina (λ max \sim 540- 565 nm) (GLAZER, 1994; HILDITCH *et al.* 1991; GALLAND-IRMOULI, 2000). No caso das algas marinhas vermelhas, B- e R- ficoeritrina são as ficobiliproteínas mais abundantes (GALLAND-IRMOULI, 2000). As R-ficoeritrinas são proteínas oligoméricas que possuem dois tipos de cromóforos denominados ficoeritrobilina (*phycoerythrobilin*) e ficourobilina (*phycourobilin*) ligados às suas subunidades proteicas através dos resíduos de cisteína (SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011).

Com relação às suas cadeias proteicas, as ficobiliproteínas apresentam cadeias α e β que são codificadas como um único operon nas algas vermelhas, e podem se associar de maneira complexa como trímero ($\alpha\beta$)₃ e hexâmeros (KIM; FUJITA, 1997; DAVID; MARX; ADIR, 2011; CONTRERAS-MARTEL *et al.*, 2001). Nas algas vermelhas existem ainda uma terceira subunidade, denominada γ , que está presente na estrutura do hexâmero, garantindo uma

maior estabilidade do oligômero (APT; METZNER; GROSSMAN, 2001). Essa cadeia γ , na alga vermelha *Aglaothamnion neglectum*, existe em duas diferentes subunidades, possuindo massa molecular aparente de 31 e 33 kDa denominadas, respectivamente, de γ e γ' , o mesmo pode acontecer na alga vermelha *Rhodella viollacea* (APT; GROSSMAN, 1993; BERNARD *et al.*, 1996).

Apesar do cloroplasto ter genoma próprio e sintetizar parte das próprias proteínas, a maioria de suas proteínas são codificadas pelo genoma nuclear, sendo formadas no citoplasma e transportadas para o destino, ou seja, o próprio cloroplasto. Um bom exemplo desse processo, é a enzima fotossintética rubisco que possui 16 subunidades, 8 grandes e 8 pequenas, onde as subunidades menores são codificadas pelo genoma nuclear (ALBERTS *et al.*, 2010). No caso das cadeias α e β de ficobiliproteínas, estas são codificadas pelo genoma do cloroplasto enquanto a subunidade γ pelo genoma nuclear (APT; GROSSMAN, 1993; APT; GROSSMAN, 2001).

Os resíduos de cisteínas que realizam ligação covalente com os cromóforos (bilinas), possuem posições bastante conservadas na estrutura primária das ficobiliproteínas, sendo as posições $\alpha 84$, $\alpha 139$, $\beta 50$, $\beta 61$, $\beta 82$ e $\beta 158$ as mais representativas quanto a conservação. As ficoeritrinas possuem tanto ficoeritrobilina quanto ficourobilina, conferindo um grande espectro de absorção, podendo apresentar diversas interações com a estrutura polipeptídica (GLAZER, 1994). Cada subunidade α possui duas ficoeritrobilinas-PEB ($\alpha 82$ e $\alpha 139$), enquanto a subunidade β possui duas ficoeritrobilinas ($\beta 82$ e $\beta 158$) e uma ficourobilina-PUB ($\beta 50$) (SEPULVEDA-UGARTE *et al.*, 2011).

Estudos mostram que essa classe de proteínas de algas, apesar de grande similaridade de estrutura primária, possui grande complexidade estrutural, isso foi mostrado até mesmo em trabalhos não tão recentes como o feito por Schirmer e colaboradores (1987) nos estudos de resolução da estrutura tridimensional de uma C-ficocianina, onde foi possível verificar a interação do aminoácido aspartato com o cromóforo de maneira não covalente. Além desse trabalho, Montgomery *et al.* (2004) descreveu a AplA, uma ficobiliproteína purificada a partir de uma cianobactéria, a *Fremyella diplosiphon*, que apresentava uma extensão de 28 aminoácidos em sua estrutura primária, a qual identificou como uma nova classe de ficobiliproteínas, denominando-a de aloficianina-like. A AplA não foi encontrada nos ficobilissomos, supondo uma nova localização e função dessa molécula na célula que ainda é desconhecida.

Nas últimas décadas, estruturas de cristal de ficobiliproteínas de várias fontes foram resolvidas. O elemento básico compreende um monômero com subunidades α e β , cada uma

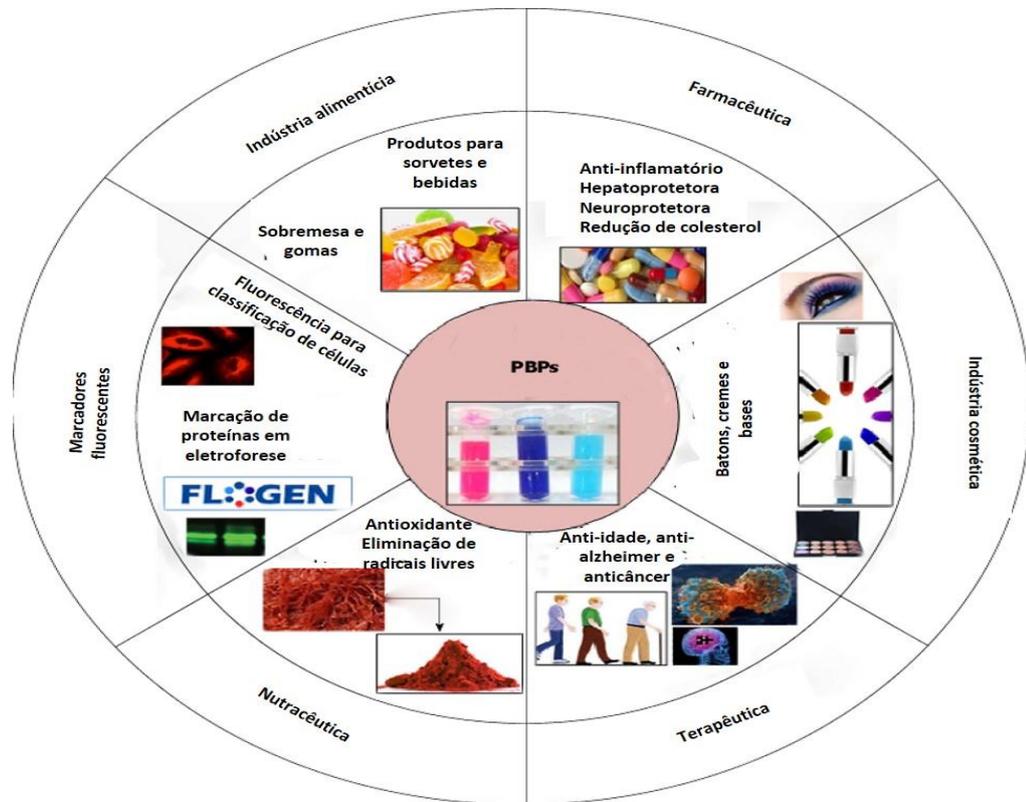
com uma massa molecular aparente de 15 a 20 kDa para 160-165 aminoácidos. Na PE, uma subunidade γ adicional geralmente se liga a uma fração $(\alpha\beta)_6$, resultando em um PBP mais estável. Nas cianobactérias e algas vermelhas, os trimeros ou hexâmeros de PBP podem ser ligados no PBS com a ajuda de peptídeos ligantes. No entanto, em *Cryptophytas*, as PBPs existem como unidade $(\alpha\beta)_2$ e não formam um estado de agregação mais complexo (LI *et al.*, 2019; ANWER *et al.*, 2015).

1.4.3 Importância biotecnológica das ficobiliproteínas

Os pigmentos naturais encontrados em algas marinhas são uma fonte valiosa de compostos bioativos que poderiam ser introduzidos para a preparação de novos ingredientes funcionais em alimentos, e também como alternativa para o tratamento ou prevenção de doenças crônicas. Recentemente, muita atenção foi dada pelos consumidores em relação a esses bioativos e, portanto, pode-se sugerir que os mesmos são uma fonte alternativa para substituição de ingredientes sintéticos, contribuindo para o bem-estar do consumidor, fazendo parte de novos alimentos funcionais e produtos farmacêuticos (PANGESTUTI; KIM, 2011).

Diversos estudos mostram as aplicações biotecnológicas de PEBs, muitas delas relacionadas as características espectroscópicas. As aplicações estendem-se desde a indústria farmacêutica até a alimentícia (Figura 5). Algumas novas aplicações de PBPs em produtos farmacêuticos e nutracêuticos criam mais demanda de PBPs nos mercados de *commodities*. Além disso, ainda é necessária uma pesquisa mais extensa no campo de aplicação para elucidar o modo completo de ação das PBPs durante seus efeitos antioxidantes, antiproliferativos, antienvelhecimento e neuroprotetores usando vários organismos modelo (SONANI, 2016).

Figura 5- Aplicações de ficobiliproteínas nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e biomédica



Fonte: Adaptado de SONANI *et al.*, 2016.

Verificou-se que as PBPs têm um forte efeito antioxidante, eliminando o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentando a quantidade de enzimas antioxidantes (WU *et al.*, 2016). Portanto, as PBPs têm potencial para tratar uma variedade de doenças causadas pelo estresse oxidativo. Desde que o efeito antioxidante das PBPs foi demonstrado, essas proteínas foram investigadas para o tratamento de várias doenças *in vivo* e *in vitro* (FERNANDEZ-ROJAS; HERNANDEZ-JUAREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). Esse papel antioxidante torna-se importante para a área da saúde, pois sabe-se que os radicais livres derivados de hiperglicemia são considerados como o principal mediador das complicações diabéticas, com isso, Soni e colaboradores (2009) mostraram que uma C- ficoeritrina tinha capacidade de reduzir esse tipo de complicação. Esse trabalho demonstrou que a proteína apresentava atividade antioxidante, através da redução dos danos oxidativos causados ao LDL (*low density lipoprotein*), que aumentava também o nível de açúcar no sangue. Além disso, como ROS são consideradas fatores importantes para causar o envelhecimento, as PBPs podem ser usadas como eliminadores de radicais livres e serem importantes candidatas ao

desenvolvimento de medicamento antienvhecimento (SONANI; RASTOGI; MADAMWAR, 2015).

Na indústria de alimentos, as PBPs podem ser usadas como ingredientes nutricionais e corantes naturais para alimentos. Os tratamentos com ácidos, álcalis e calor são essenciais no processamento de alimentos, podendo esses fatores serem determinantes para a utilização de certas moléculas. Considerando os efeitos do pH e da temperatura nas propriedades funcionais das PBPs, foi observado que, quando estudadas em detalhes, essas moléculas se mostraram estáveis a baixa temperatura, em condições ácidas e básicas, além de serem estáveis na presença de conservantes como o ácido cítrico (CHEN *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2004; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013).

Sobre a capacidade de funcionar como agente anticâncer, já foi demonstrado que essa classe de proteínas pode bloquear a proliferação de células cancerígenas, exercendo uma atividade biológica importante. As PBPs atuam bloqueando o ciclo celular das células tumorais, induzindo a apoptose e a autofagia das células tumorais, podendo assim, servir como um agente anticâncer promissor. Ressalta-se ainda que essas proteínas podem ser tóxicas para células cancerígenas enquanto não são tóxicas para células normais, sendo esse mecanismo de ação ainda não muito bem elucidado (JIANG *et al.*, 2017; RAVI *et al.*, 2015).

A interação proteína-proteína foi testada para a PNA, uma lectina purificada do amendoim que é específica para Gal/GlcNac. O estudo mostrou que essa lectina se liga à ficobiliproteína independentemente do sítio de ligação a carboidratos, mostrando que esse tipo de interação pode ter várias aplicações clínicas, pois se trata de uma proteína fluorescente que poderia funcionar como um biomarcador (PANDEY; FATMA; KOMATH, 2009).

Além das propriedades de coloração, as PBPs também possuem grande aplicação na indústria cosmética, pois podem funcionar como substâncias antioxidantes e, portanto, apresentam propriedades conservantes naturais. Esse papel foi estudado inicialmente a partir de algas marinhas exploradas no Japão, na busca de aditivos para alimentos que substituíssem os sintéticos (ROCHA *et al.*, 2007).

De fato, essas proteínas são amplamente comercializadas para aplicações fluorescentes em análises clínicas e imunológicas. A partir de bancos de dados de patentes globais, é possível verificar várias patentes de PEBs, compreendendo-a maioria nos EUA, Japão e alguns países da Europa. As americanas estão relacionadas principalmente à aplicações fluorescentes, enquanto as japonesas estão envolvidas na produção, purificação e aplicação para fins terapêuticos e de diagnóstico, reforçando o interesse nessas biomoléculas como ferramentas biotecnológicas (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

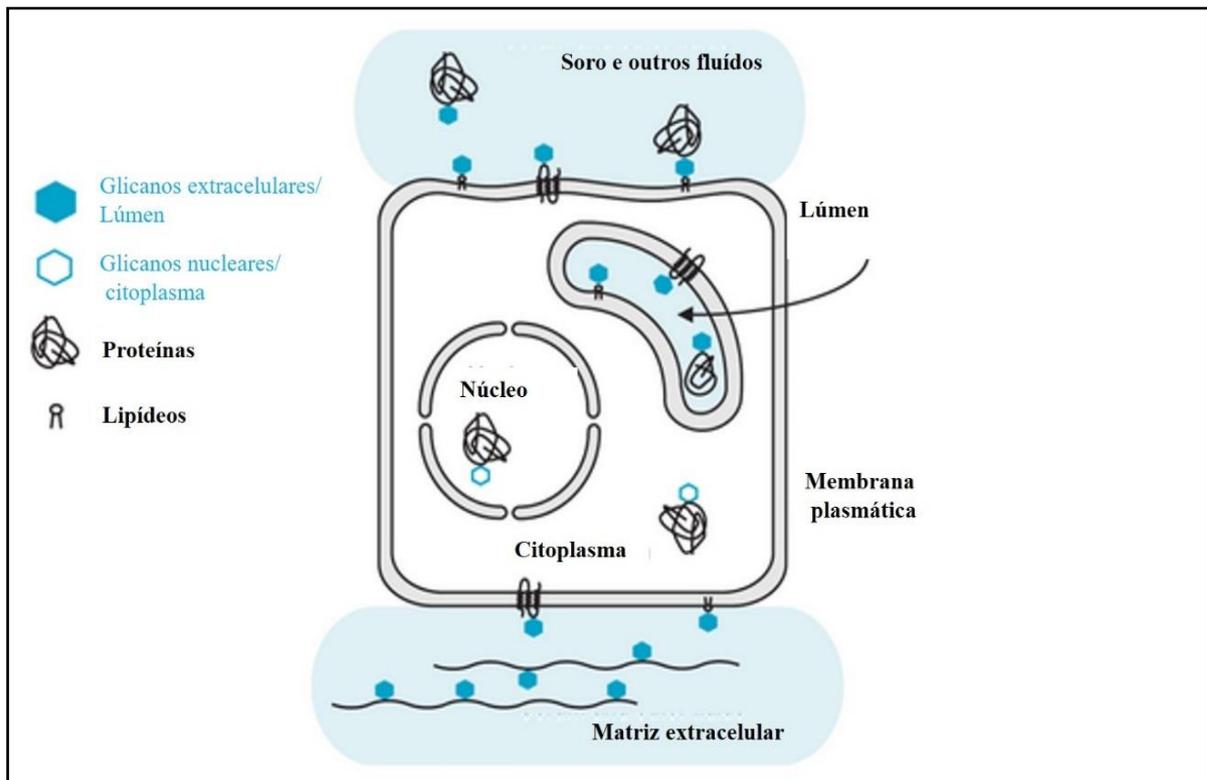
Apesar de apresentarem inúmeras atividades biológicas, não existem estudos mostrando a sua capacidade de hemaglutinação, um potencial mostrado neste trabalho, e que fortalece a perspectiva de novas aplicações para essa biomolécula. Essa característica de hemaglutinação é comum as proteínas classificadas como lectinas, que apresentam características peculiares de acordo com o organismo a qual é extraída.

1.5 Lectinas

Inicialmente, acreditava-se que os carboidratos tinham apenas funções estruturais e de energia metabólica para as células, mas no decorrer dos anos foi possível observar que essas moléculas poderiam funcionar como fonte de informações celulares bastante interessantes, surgindo, assim, um ramo da ciência denominado de glicobiologia. A função das moléculas de carboidratos como formas de armazenamento e transporte de energia é, geralmente, considerada fora do campo da glicobiologia e, portanto, o desafio dessa área é definir as funções biológicas dos açúcares ligados às diferentes estruturas como, por exemplo, as proteínas e membranas, e determinar como essas funções são realizadas (TAYLOR; DRICKAMER, 2009)

Muitas células utilizam oligossacarídeos específicos para codificar importantes informações e sinais celulares que podem ser utilizados na interação célula-célula, diferenciação celular e receptação de moléculas importantes para o metabolismo (WIEDERSCHAIN, 2013). Os glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) podem estar ligados através de mono, oligo ou polissacarídeos, e ambos podem ser encontrados na superfície extracelular das membranas plasmáticas (Figura 6). Antes de chegarem à superfície celular, esses são produzidos dentro da célula, e os glicanos que se ligam às proteínas podem ser do tipo *O*- ligados e *N*- ligados (TAYLOR; DRICKAMER, 2009).

Figura 6 - Localização dos glicoconjugados nos compartimentos extracelular e intracelular



Fonte: Adaptado de Taylor e Drickamer (2009)

Em *N*-glicosilação, um resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) é ligado a um resíduo de asparagina através de uma ligação do tipo amida, este aminoácido faz parte de uma sequência consenso Asn-X-Thr/Ser, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Em algumas situações raras GlcNAc pode se ligar a sequência Asn-X-Cys (SCHMALTZ; HANSON; WONG, 2011; TAYLOR; DRICKAMER, 2009).

No caso das *O*-glicosilações, esta consiste de uma ligação glicosídica entre um carbono anomérico de um carboidrato com a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina de uma proteína e, diferentemente das *N*-glicosilações, não possuem sequência consenso. Nesse tipo de glicosilação, o açúcar mais abundantemente encontrado é o *O*-acetilgalactosamina (GalNAc), de mucina, uma glicoproteína presente em diversos organismos (SCHMALTZ; HANSON; WONG, 2011; TAYLOR; DRICKAMER, 2009).

Alguns estudos afirmam que anomalias no padrão de glicosilação de uma célula podem estar relacionadas às mudanças fisiológicas e patológicas que estão associadas a algumas doenças como, por exemplo, o câncer (DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999). A transformação neoplásica resulta em uma ampla variedade de alterações celulares que afetam o crescimento, a sobrevivência e o comportamento geral do tecido afetado, e mesmo que o padrão

genético esteja relacionado a esse processo, as alterações epigenéticas podem exercer um efeito igualmente significativo na transformação neoplásica, como as alterações na glicosilação celular. Essas alterações na glicosilação parecem não apenas impactar diretamente o crescimento e a sobrevivência das células, mas também facilitar a imunomodulação induzida por tumores e eventuais metástases. Essas alterações únicas na glicosilação associada ao tumor também podem servir como uma característica distinta das células cancerígenas e, portanto, fornecer novos alvos diagnósticos e até terapêuticos (STOWELL; JU; CUMMINGS, 2015).

Nesse sentido, é importante destacar as lectinas, que são um grupo de proteínas diversas que ocorrem na natureza de forma ubíqua e compartilham a capacidade de reconhecer e se ligar a estruturas específicas de carboidratos (revisado por VAN HOLLE; VAN DAMME, 2018). Por ter essa característica de reconhecer carboidratos de forma seletiva, as lectinas despertam amplo interesse para serem utilizadas como ferramentas biotecnológicas. Lectinas mediam interações célula-célula através do reconhecimento específico de glicoconjugados e podem reconhecer células cancerígenas diferenciando-as das demais células (SHARON; LIS, 2004; PINTO *et al.*, 2009).

As lectinas são amplamente distribuídas em todos os organismos microbianos, vegetais e animais, e estão envolvidas em numerosos processos celulares que dependem de seu reconhecimento específico a carboidratos. É importante ressaltar que as células, geralmente, exibem glicoproteínas e glicolipídios de superfície alterados em determinadas condições fisiológicas e patológicas, sendo que as lectinas reconhecem estruturas específicas de carboidratos, e isso resulta na regulação de várias células por meio dos glicoconjugados (GABIUS, 1997; OGAWA, 2011).

Existem estudos *in vitro* indicando que as lectinas de plantas se ligam a uma variedade de ligantes que não são, necessariamente, carboidratos como o ácido 2,6-toluidinilnaftaleno sulfônico, a adenina e alguns outros fitohormônios, sendo esse tipo de ligação não afetado pela interação da proteína com os carboidratos (KOMATH; KAVITHA; SWAMY, 2006).

Diversas atividades biológicas foram atribuídas às lectinas como, por exemplo, atividade anticâncer, pró inflamatória, anti-HIV, inseticida (MEJÍA; PRISECARU, 2007; LOSSIO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2005), entre outras.

1.5.1 *Lectinas de algas marinhas*

A presença de aglutininas nas algas marinhas foi primeiramente relatada por Boyd, Almodóvar e Boyd (1966), que utilizando extratos de algas pardas, vermelhas, verde e cianobactérias observaram a aglutinação de diferentes eritrócitos. Comparativamente às lectinas vegetais, as lectinas de algas se diferem em uma variedade de características físico-químicas. Em geral, as lectinas de algas marinhas são proteínas monoméricas de baixo peso molecular, exibindo alto teor de aminoácidos ácidos, com ponto isoelétrico (pI) na faixa de 4-6, sendo a sua maioria independente de íons metálicos para suas atividades biológicas e com grande especificidade para carboidratos complexos (HORI *et al.*, 1990; ROGERS; HORI, 1993; AINOUZ *et al.*, 1995). No Brasil, os primeiros estudos com aglutininas desses organismos foram realizados em 1991 com espécies coletadas no litoral do Ceará (AINOUZ; SAMPAIO, 1991).

Quando comparados com as lectinas de plantas e animais, os estudos com lectinas de algas ainda são poucos, e isso pode ser justificado pela baixa quantidade de proteína extraída de seus organismos primários e a dificuldade de obtenção (NAGANO *et al.*, 2005). Esse baixo rendimento pode ser compensado pela capacidade de exercer determinadas atividades biológicas mesmo em pequena concentração e ser menos antigênica devido ao baixo peso molecular (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Diversos estudos mostraram que as lectinas de algas apresentam atividades biológicas interessantes como os relatados para as lectinas purificadas de *Eucheuma serra* e *Kappaphycus alvarezzi*, que apresentaram atividade antiviral contra cepas de influenza, esta última alga é cultivada em diversas regiões no Brasil (SATO *et al.*, 2015; SATO *et al.*, 2011). A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva também foram mostradas para as lectinas *Phaeodactylum tricornutum* e *Hypnea cervicornis* (GUZMAN; GATO; CALLEJA, 2001; BITENCOURT *et al.*, 2008).

Além disso, as lectinas têm funções endógenas importantes para as algas, podendo participarem do processo de agregação de organelas para formar protoplasto após injúria celular, como no estudo mostrado com a *bryohealina*, uma lectina específica de *N*-acetil-D-glicosamina e *N*-acetiL-D-galactosamina, purificada de *Bryopsis plumosa* (KIM *et al.*, 2005).

Fazendo-se uma breve busca em bancos de dados, é possível comprovar que há poucos estudos com lectinas de algas, apesar dessas se mostrarem interessantes do ponto de vista estrutural e quantos às suas atividades biológicas. Os primeiros dados estruturais de lectinas de algas foram apresentados apenas há duas décadas, quando as lectinas de

Bryothamnion triquetrum (BTL) e *Hypnea japonica* (HJA) tiveram suas estruturas primárias elucidadas, mostrando inclusive que essas lectinas tinham especificidade para glicanos complexos, BTL, por exemplo, reconhece fetuína e mucina (CALVETE *et al.*, 2000; HORI *et al.*, 2000). Posteriormente, algumas lectinas tiveram suas estruturas primárias sequenciadas, como as purificadas de *Hypnea Musciformis* (HML) e *Hypnea cervicornis* (HCA), apresentando diferenças estruturais, mesmo pertencendo a um mesmo gênero de algas (NAGANO *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

A complexidade estrutural ficou ainda mais evidente quando a GRFT, uma lectina purificada de *Griffithsia sp.*, apresentou similaridade com a lectina de planta terrestre *Artocarpus integrifolia* (MORI *et al.*, 2005). A GRFT possui capacidade de inibir o vírus da imunodeficiência humana (HIV), um dos vírus mais potentes descobertos até o momento. A GRFT pode inibir a infecção pelo vírus em concentrações picomolares, superando a capacidade da maioria dos agentes anti-HIV, isso decorre de sua capacidade de se ligar à resíduos de manoses presentes em oligossacarídeos na superfície das glicoproteínas do envelope viral (LUSVARGHI; BEWLEY, 2016). A seguir algumas lectinas de algas vermelhas com seus respectivos ligantes (Tabela 1).

Tabela 1 - Localização dos glicoconjugados nos compartimentos extracelular e intracelular

| Lectina | Alga vermelha | Especificidade | Referência |
|--------------------|--------------------------------|--|-------------------------------------|
| BTL | <i>Bryothamnion triquetrum</i> | Mucina e fetuína | CALVETE <i>et al.</i> , 2000 |
| HML | <i>Hypnea musciformis</i> | Mucina | NAGANO <i>et al.</i> , 2005b |
| HCA | <i>Hypnea cervicornis</i> | Mucina e GalNAc | NAGANO <i>et al.</i> , 2005b |
| GRFT | <i>Grifthisin sp.</i> | GlcNAc e manose | MORI <i>et al.</i> , 2005 |
| GOL | <i>Gracilaria ornata</i> | Mucina, lactotransferrina, asialofetuína, tiroglobulinas | LEITE <i>et al.</i> , 2005 |
| BSHV (1, 2, 3 e 4) | <i>Bryothamnion seaforthii</i> | Mucina e fetuína | MEDINA-RAMIREZ <i>et al.</i> , 2006 |
| TCL | <i>Tichocarpus crinitus</i> | Mucina e fetuína | MOLCHANOVA <i>et al.</i> , 2009 |

1.6 Atividade inseticida

A agricultura no século XXI busca produzir mais alimentos para suprir a necessidade de uma população crescente com uma força de trabalho rural menor, precisando, ainda, adotar métodos de produção mais eficientes, padrões sustentáveis e adaptar-se às mudanças climáticas. Estima-se que a população mundial deve crescer mais de um terço, ou 2,3 bilhões de pessoas, entre 2009 e 2050, sendo esse crescimento mais visível nos países em desenvolvimento. No entanto, mesmo em 2050, o mundo ainda estará longe de resolver o problema da privação econômica e da desnutrição de partes significativas da população. Essas tendências significam que a demanda do mercado por alimentos continuaria a crescer e atingiria cerca de 3 bilhões de toneladas até 2050. A Zona Agroecológica Global mostra que ainda existem amplos recursos terrestres com potencial para produção agrícola disponível, mas esse resultado precisa ser altamente qualificado e seguro (FAO, 2009).

Esse aumento populacional está acompanhado com os crescentes investimentos na produção agrícola e, conseqüentemente, no uso de inseticidas que visam garantir o controle de

pragas que possam afetar esse investimento, estando cada vez mais potentes e sendo utilizados em grande escala (TOSH, 2019). O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, aparecendo na 44^a posição em um ranking da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) sobre uso de defensivos agrícolas, que incluem fungicidas e inseticidas (FAO, 2019).

O grande problema do uso de pesticidas químicos está nos danos causados ao ambiente e à vida humana. A primeira linha de ataque é através da pulverização de culturas com inseticidas cada vez mais potentes que causam, entre outros, a morte de espécies importante na pulverização e decomposição natural. Além disso, podem provocar a perda da qualidade do solo, tornando-o improdutivo e arenoso (TOSH, 2019). Ainda na questão ambiental, o uso de pesticidas pode interferir diretamente na diminuição da biodiversidade de espécies ou mesmo contribuir para o aparecimento de espécies resistentes que causam prejuízos irreversíveis (BEKETOV, 2013; WHALON.; MOTA-SANCHEZ; HOLLINGWORTH, 2008). Dados divulgados pela Agência de Vigilância Sanitária mostram que alguns alimentos apresentam resíduos de produtos químicos utilizados no cultivo (ANVISA, 2019). Esse resíduos podem ir diretamente para a mesa do consumidor e impactar de forma negativa a sua saúde. Milhome e colaboradores (2009) identificaram a presença de pesticidas na região do Baixo Jaguaribe (Ceará) que afetam diretamente na qualidade da água da região.

Alguns tipos de agrotóxicos, ao permanecerem no ambiente ou atingirem o meio aquático, oferecem riscos para espécies animais por sua toxicidade e possibilidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. Efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos a longo prazo são pouco conhecidos, devido, em parte, ao fato de que os agrotóxicos pertencem a famílias de substâncias de estruturas químicas muito diferentes, o que dificulta a generalização dos efeitos, inclusive para pesticidas de um mesmo grupo químico, levando à necessidade de considerar cada caso particularmente (MILHOME *et al.*, 2009).

Há um grande esforço para reduzir o risco de exposição humana a pesticidas, alguns estudos, inclusive, focam em inseticidas mais seguros e mais seletivos para pragas naturais. A demanda de inseticidas com novos modos de ação e formulações estão sendo desenvolvidos e registrados com base em regulamentos rígidos, levando em consideração a segurança do meio ambiente e de espécies não-alvo (RATHEE; MENRA; DALAL, 2018). Estudar outras moléculas capazes de exercerem atividade inseticida é um papel da comunidade científica, pois torna possível a utilização de alternativas menos agressivas ao ambiente e ao próprio ser humano. Partindo desse princípio, várias lectinas foram estudadas em relação a capacidade de

exercer atividade inseticida em diversos organismos baseado na característica de se ligar a glicanos específicos.

As lectinas têm capacidade de atuarem, por exemplo, no crescimento e desenvolvimento de plantas, e também no sistema de defesa contra herbívoros e patógenos. Elas desempenham papéis adicionais quando são encontradas em altas concentrações nos tecidos das plantas, desempenhando uma forma de armazenamento de proteínas. As lectinas, geralmente, são mais abundantes em sementes e tecidos de armazenamento vegetativo, podendo ser encontradas em organelas subcelulares. Além disso, essas moléculas se acumulam durante o desenvolvimento ou fase reprodutiva do ciclo de vida das plantas para serem utilizadas posteriormente. O fato de desempenharem um papel de armazenamento é perfeitamente compatível com a ideia de que as mesmas podem servir como defesa (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; MURDOCK; SHADE, 2002).

A atividade inseticida de lectinas já foi demonstrada em diversos trabalhos e está relacionada a sua capacidade de reconhecer diferentes carboidratos da superfície de células. Esses estudos foram realizados, por exemplo, em plantas transgênicas que tinham a capacidade de codificar o gene da lectina e também através de dietas artificiais utilizando a lectina como componente (SHAHIDI- NOGHABI *et al.*, 2010; SHAHIDI-NOGHABI, 2009).

As lectinas podem desencadear uma variedade de atividades biológicas, como estimulação por mitose, inibição do crescimento e apoptose. No entanto, deve-se enfatizar que a especificidade fina de diferentes lectinas em relação a oligossacarídeos e glicanos pode ser muito diferente, mesmo que elas interajam com o mesmo monossacarídeo (SMAGGHE; GOODMAN; STANLEY, 2009).

Vandeborre e colaboradores (2009) mostraram que a lectina denominada Nictaba passou a ser expressa nas folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*) somente após herbivoria por diferentes espécies de insetos (*Myzus nicotianae*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tetranychus urticae*, *Spodoptera littoralis* e *Manduca sexta*). É importante enfatizar que a maioria das lectinas vegetais de plantas é sintetizada como precursor inativo que se torna ativo somente após a interação na organela especializada e, devido a essas observações, foi proposto que essas proteínas vegetais desempenham um papel na defesa geral contra várias pragas de plantas como microrganismos fitopatogênicos, nematóides e insetos (VANDEBORRE, SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

Muitas lectinas vegetais são, inclusive, altamente tóxicas para insetos fitófagos, sendo isso mostrado na expressão ectópica de lectinas em plantas geneticamente modificadas e na incorporação de lectinas purificadas em dietas artificiais que afetam negativamente o

desempenho de muitos insetos e de pragas pertencentes a diferentes ordens, como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera. Pode-se supor que, após a ingestão de sementes ou tecidos de plantas por insetos fitófagos, as lectinas sejam liberadas das estruturas celulares rompidas e entrem em contato com as estruturas de carboidratos presentes no intestino médio dos insetos (VANDEBORRE, SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

Com relação a atividade de inseticida de lectinas de algas, não há muitos trabalhos publicados. Recentemente, foi mostrado que o extrato de *H. Musciformis* reduziu fortemente a longevidade e fecundidade de adultos de *Aedes aegypti* e *Plutella xylostella*. Este estudo adiciona conhecimento sobre a toxicidade de inseticidas através de compostos de algas marinhas contra artrópodes de importância médica e agrícola, permitindo propor como candidatos efetivos ao desenvolvimento de ferramentas de controle de pragas (RONI *et al.*, 2015). GOL, uma lectina da alga vermelha marinha *Gracilaria ornata* (Gracilariaceae, Rodophyta), alterou significativamente o desenvolvimento de larvas de *Callosobruchus maculatus*, indicando a possibilidade do uso dessa lectina em uma estratégia biotecnológica para o manejo de insetos de sementes do feijão caupi armazenados (LEITE *et al.*, 2005).

Dois dos desafios mais importantes que a humanidade enfrenta no século XXI incluem a produção de alimentos e o controle de doenças. Ferramentas de combate mais ecológicas contra vetores de mosquitos e pragas agrícolas são urgentemente necessárias. Os produtos inseticidas de origem marinha têm um enorme potencial para controlar essas pragas e ajudar no desenvolvimento de uma agricultura mais eficiente (RONI *et al.*, 2015).

Diversas linhagens de células de insetos, que são consideradas importantes na agricultura, podem ser utilizadas para verificar a atividade inseticida tais como: CF1 e CF-203 (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera), GUTAW1 (*Helicoverpa zea*, Lepidoptera), células High5 (*Trichoplusia ni*, Lepidoptera), Sf9 (células de ovário de *Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera), S2 (hemócito, *Drosophila melanogaster*, Diptera) e TcA (*Tribolium castaneum*, Coleoptera) (SHEN *et al.*, 2017). Essas linhagens celulares são usadas como ferramentas de pesquisa em virologia, em estudos de mecanismos de sinalização para compreender a imunidade a insetos, migração de hemócitos e para testar hipóteses sobre a expressão gênica, entre outros mecanismos (SMAGGHE; GOODMAN; STANLEY, 2009).

1.6.1 Células de *Drosophila melanogaster* (linhagem S2)

Células de *Drosophila melanogaster* são bastante utilizadas em bioensaios para estudar moléculas com potencial ação inseticida, e por apresentarem diversas características específicas, sendo uma delas o fato das proteínas de *Drosophila* possuírem alto teor de oligossacarídeos do tipo High-manose e glicanos com núcleos fucosilados (HIRATA; DIAS; ROSA, 2002; SEPO; TIEMEYER, 2000; FABINI *et al.*, 2001). As células também podem expressar *O*-glicoproteínas envolvidas em uma ampla gama de funções biológicas, incluindo proteínas da matriz extracelular, proteínas de reconhecimento de patógenos (Gnbp1), proteínas de resposta ao estresse (Glicoproteína 93), proteases segregadas (matriz-metaloprotease 1), inibidores de protease (Serpin 27 A) e proteínas de função desconhecida (SCHWIENSTEK *et al.*, 2007). É importante deixar claro, que as glicoproteínas do tipo *O*-ligadas são sintetizadas em níveis baixos nesses organismos quando comparadas com os *N*- glicanos, sendo a mucina o *O*-glicano mais presente em *Drosophila* (GARENAUX *et al.*, 2011; TIAN; HAGEN, 2009).

As células S2, de *Drosophila melanogaster*, foram derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio (20 a 24 horas) pelo Dr. Imogene Schneider, provavelmente de uma linhagem semelhante a macrófagos (SCHNEIDER, 1972). A utilização desse organismo em diversos estudos biológicos deve-se à disponibilidade do genoma completo em bancos de dados, além dos dados de proteoma. Essa linhagem pode ser cultivada por protocolos bastante reprodutivos, sendo a *Drosophila melanogaster* um dos melhores organismos modelos para se trabalhar, apresentam ciclo de vida rápido, uma genética bastante simplificada que envolve quatro pares de cromossomos, além de ter um número expressivo de descendentes e, apesar de ser um inseto, tem genes muito parecidos com os dos mamíferos como, por exemplo, algumas proteínas caspases (ADAMS *et al.*, 2000; SANG, 2001; KUMAR; DOUMANIS, 2000).

1.6.2 Células de *Choristoneura fumiferana* (linhagem CF1)

A lagarta-do-botão oriental, *Choristoneura fumiferana*, é um desfolhador nativo de abetos, nome popular das diversas espécies do gênero *Abies*, que são árvores coníferas da família pinácea, nativas da Europa, Ásia, norte da África e América Central e do Norte. É considerada a praga mais destrutiva dessas florestas e continua sendo o principal alvo para controle com uso do inseticida microbiológico formulado à base da bactéria *Bacillus*

thuringiensis, o chamado Bt. O último surto começou por volta de 1970 e persistiu por mais de 20 anos e, durante o pico, afetou 58 milhões de hectares. Afim de evitar novos surtos, algumas regiões adotaram o uso de pulverização aérea e, assim, garantir a sobrevivência das florestas e todos os fatores socioeconômicos associados (HAJEK; FRANKENHUYZEN, 2017).

Os abetos são árvores que fornecem madeira macia e fibras longas, portanto, são consideradas árvores de interesse econômico. Além disso, são utilizadas para exploração de resina, substância aplicada na fabricação de produtos industriais (ALVES, 2019). Algumas espécies têm sido usadas para tratar problemas digestórios, doenças vasculares, pulmonares e venéreas (YANG *et al.*, 2008). A *C. fumiferana* deposita seus ovos nas árvores que elas parasitam, assim que as largatas nascem devoram os brotos, podendo matá-los em questão de quatro ou cinco anos, aumentando os impactos negativos em várias florestas das regiões temperadas, e que vem se intensificaram nos últimos anos devido ao aquecimento global que impulsionou a migração dessas espécies para as regiões mais ao norte do globo (KRAUSE *et al.*, 2013; AFP, 2014).

Obviamente, a desfoliação reduz a capacidade fotossintética dessas florestas, interferindo no equilíbrio ecológico e aumentando a necessidade de intervenção para o controle de surtos. Devido as controvérsias do uso de pesticidas químicos durante alguns desses surtos, meios de controle biológicos utilizando *Trichogramma minutum*, uma microvespa parasita, foram realizados para o controle da proliferação de *C. fumiferana*, isso porque os ovos das mariposas eram perfurados e impedidos de eclodirem. Esse estudo iniciou na década de 80 após um período de grande perda florestal devido ao aumento descontrolado da população de *C. fumiferana* (SMITH; HUBBE; CARROW, 1986). Muitas das técnicas utilizadas podem causar impactos positivos, mas também negativos, pois podem afetar espécies não-alvo, gerar desbalanço ecológico e ter um custo muito elevado.

Recentemente, foram identificados mecanismos de resistência para *Choristoneura fumiferana* (PARENT *et al.*, 2017). Entender esses mecanismos de resistência se faz necessário para preservar o futuro de diversas espécies que são economicamente importantes, e essa resposta pode estar presente nas moléculas que são expressas nas células dos organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização bioquímica da ficoeritrina HMLp e avaliar a citotoxicidade desta proteína contra células de insetos de *Choristoneura fumiferana* linhagem CF1 e *Drosophila melanogaster* linhagem S2.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade hemaglutinante da HMLp com diferentes eritrócitos;
- Determinar a estabilidade térmica e de pH da HMLp;
- Determinar a função da proteína através de sequenciamento de peptídeos da cadeia alfa e beta utilizando espectrometria de massa;
- Avaliar a especificidade fina da HMLp por oligossacarídeos utilizando a técnica de *glycan- array*;
- Avaliar a citotoxicidade da HMLp contra células de inseto de *Choristoneura fumiferana* linhagem CF1 e *Drosophila melanogaster* linhagem S2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e fracionamento proteico

A purificação da proteína seguiu conforme o protocolo estabelecido por NOBRE (2015). Para tanto, a alga marinha *Hypnea musciformis* foi coletada na praia do Pacheco, município de Caucaia, estado do Ceará, em substratos rochosos durante as marés de sizígia. A alga foi armazenada em sacos plásticos e transportada para o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Após serem removidos da alga fauna e flora acompanhante, a alga foi lavada com água corrente, macerada em nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo até a obtenção de um pó fino que foi armazenado a -20 °C até posterior utilização. A alga macerada foi submetida a extração proteica em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo 150 mM de NaCl na proporção de 1:4 (p/v) sob agitação constante por 4 horas a 4 °C. O material foi filtrado em tecido de nylon, centrifugado a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C.

O sobrenadante, denominado extrato proteico total, foi dialisado exaustivamente contra água destilada e submetido ao fracionamento de proteínas com sulfato de amônio na fração 20-40%. O material foi deixado em repouso à temperatura ambiente e, após 4 horas, as proteínas precipitadas foram concentradas por centrifugação a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dialisado exaustivamente contra água destilada, seguido de diálise contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6.

3.2 Cromatografia de troca iônica e avaliação do perfil eletroforético da HMLp

Para a realização da cromatografia, foram utilizados 5 mL da fração proteica na concentração de 17 mg. mL⁻¹ em uma matriz de troca iônica DEAE-Sephacel (1,5 x 7 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 7,6 a 50 mM. As proteínas não retidas foram eluídas da matriz com o mesmo tampão de equilíbrio e a proteína retida, denominada de HMLp, foi eluída com o mesmo tampão contendo NaCl na concentração de 500 mM em fluxo de 2 mL.min⁻¹. As frações foram coletadas a cada 1,5 mL e analisadas em espectrofotômetro a 280 nm e 565 nm. O perfil eletroforético da fração retida correspondente à HMLp foi investigado através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na presença de β-mercaptoetanol, utilizando o método descrito por Laemmli (1970) e adaptado para o uso de placas de vidro verticais (BIO-RAD System). Para a visualização das

bandas, foi utilizado o reagente *coomassie Brilliant Blue* (ThermoScientific) e comparadas com marcadores moleculares com pesos pré-estabelecidos em daltons.

3.3 Avaliação da atividade hemaglutinante

A presença da atividade hemaglutinante foi avaliada tanto no extrato total quanto em todas as etapas de purificação, e foi detectada a partir de ensaios de aglutinação celular através da formação de precipitado visível macroscopicamente em ensaios utilizando sangue de coelho. Para esses testes, as amostras foram submetidas a avaliação da aglutinação em placas de acordo com o protocolo descrito por Moreira e Perrone (1977) com algumas adaptações. Assim, para o teste de atividade hemaglutinante foram utilizadas hemácias de coelho e humana tratadas enzimaticamente com tripsina e papaína e, também, não tratadas enzimaticamente. As amostras foram diluídas em série e em duplicata (1:2, 1:4, 1:8 ...) em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM. A cada 50 µL de diluição adicionou-se 50 µL de uma suspensão de hemácias nativas ou tratadas com enzimas a 2% em NaCl 150 mM. O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos, em seguida deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H./mL) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

3.4 Efeito de temperatura sobre a atividade hemaglutinante da HMLp

O efeito da temperatura sobre a atividade da proteína foi analisado utilizando a HMLp na concentração de 1 mg. mL⁻¹ em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6, as quais foram submetidas a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por um período de uma hora em termobloco. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 9.000 x g por 5 minutos e submetidas ao ensaio de hemaglutinação utilizando sangue de coelho para verificar a termoestabilidade da proteína.

3.5 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da HMLp

Para avaliar a estabilidade da HMLp frente a diferentes condições de pH, foram utilizados alguns tampões em várias condições de pH (acetato 100 mM pH 4,0 e 5,0, citrato de sódio 100 mM pH 6,0, fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, Tris-HCl 100mM pH 8,0 e glicina 100 mM pH 9,0 e 10,0). Alíquotas da solução de proteína na concentração de 1 mg.mL⁻¹ foram centrifugadas na condição de 9.000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de hemaglutinação para investigar a estabilidade da proteína em diferentes pHs.

3.6 Ensaio de inibição

Para o ensaio de inibição, solução de açúcares simples (D-manose, D-galactose, D-glicose, D-frutose, *N*-acetil-D-glicosamina e *N*-acetil-D-galactosamina) foram preparados em solução salina na concentração de 100 mM. As glicoproteínas (mucina e tiroglobulina) foram preparadas em solução salina a 5 mg.mL⁻¹.

A atividade foi conduzida utilizando a HMLp na concentração capaz de causar 4 U.H. Para isso, 50 µL de tampão Tris 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM, foram adicionados 50 em cada poço da placa e, posteriormente, 50 µL de açúcar simples ou glicoproteína foram adicionadas no primeiro poço e serialmente diluídos e em duplicata, exceto no último poço. Posteriormente, 50 µL da solução de proteína foram adicionados aos poços. A placa foi mantida por 1 hora em temperatura de 37 °C e, após esse período, um volume igual de suspensão de hemácias foi adicionado. Após a incubação por 1 hora, a placa foi avaliada e a mínima concentração de carboidrato capaz de inibir a hemaglutinação (IMC) foi considerada por avaliação a olho nu e expressas em mg.mL⁻¹.

3.7 Determinação da especificidade fina da HMLp por *Glycan array*

Para os ensaios de *Glycan Array*, utilizando glicanos de biblioteca própria, a HMLp foi marcada com Alexa fluor 488-TFP (Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, a HMLp foi diluída em diferentes concentrações (0,2 a 200 µg.mL⁻¹) em tampão de equilíbrio (tampão Tris-HCl pH 7,6 contendo 10 mM de CaCl₂, 10 mM de MgCl₂, BSA a 1% e 0,05% de Tween 20) e 70 µL da solução de proteína foram aplicados em lâminas de microarranjo específicas para análise por *Glycan Array*. Após 60 min de incubação, em uma câmara umidificada em temperatura ambiente, a lamínula foi removida em uma solução salina

tamponada com Tris-HCl pH 7,6 contendo Tween 20 na concentração de 0,05% e lavada mergulhando as lâminas quatro vezes, sucessivamente, usando solução salina tamponada com Tris-HCl pH 7,6. Após a remoção da lamínula e lavagem, a lâmina foi lavada em água deionizada e centrifugada em uma centrífuga por 15 segundos para secar. A lâmina foi escaneada imediatamente em um scanner de *microarray* Agilent G265BA (PerkinElmer) usando um comprimento de onda de excitação de 488 nm e o software ImaGene (BioDiscovery, El Segundo, CA, EUA) foi utilizado para quantificar a fluorescência.

Os dados foram relatados como unidades médias de fluorescência relativa (RFU) de seis réplicas para cada glicano apresentado na matriz após a remoção dos valores mais alto e mais baixo.

3.8 Identificação da função da HMLp por sequenciamento de peptídeos

A identificação da proteína HMLp foi realizada através do sequenciamento de peptídeos utilizando um espectrômetro de massa (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonik GmbH) e fonte ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voe (MALDI- TOF). Para isso, a proteína foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, posteriormente, bandas proteicas foram excisadas do gel, descoradas com 100 mM de bicarbonato de amônio em acetonitrila (1:1 v/v) e dessecadas com acetonitrila pura.

Para o processo de digestão proteolítica, foi utilizado tripsina (Promega, Madison, WI, USA) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Os peptídeos oriundos da digestão foram ressuspendidos em 5% de ácido trifluoracético (TFA) e acetonitrila (1:2 v/v) e secos em *speedvac*. Posteriormente, ressuspendidos em 1% de TFA e colocados em placas de MALDI, sendo utilizado a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico na proporção de 1:2 v/v. A matriz (10 mg.mL⁻¹) foi solubilizada em 0,3 % de TFA em acetonitrila (1:1 v/v).

O espectrômetro operou na voltagem de 20 kV e analisou peptídeos dentro do espectro de massa de 400 a 5.000 daltons. Os espectros de massa foram processados usando o programa FlexAnalysisTM 3.4. (Bruker Daltonik GmbH), e sequenciados manualmente utilizando o mesmo programa computacional. Os peptídeos sequenciados foram comparados utilizando proteínas presentes em bancos de dados (UniProt) e alinhamento utilizando o programa *MultiAlin* (disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para determinar a função da proteína.

3.9 Atividade biológica contra células de insetos

3.9.1 Incubação com células de insetos

Para a avaliação da citotoxicidade de HMLp, placas de 96 poços foram semeadas com meio SF-900 para a célula da linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*) e meio IPL-41 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino para a linhagem CF1 (*Choristoneura fumiferana*). Em seguida, a HMLp foi solubilizada/suspensa em tampão fosfato de sódio salino pH 7,4 na concentração de 1 mg. mL⁻¹ (concentração estoque) e, a partir desta, foram obtidas diferentes concentrações da proteína variando de 6,25 µg.mL⁻¹ (0,062 µM) até 100 µg.mL⁻¹ (1 µM) ou controle seguido da adição de células para um número final de 20.000 células/poço.

3.9.2 Avaliação da fluorescência

Posteriormente, as placas foram incubadas por 48 horas para análise das imagens por microscópio óptico usando lentes objetivas com magnificação de 4 e 20 x, além de ser avaliado o perfil de crescimento celular em 24, 48 e 72 horas de incubação para efeito comparativo. Nesse sentido, foi adicionado o reagente PrestoBlueTM (ThermoFisher) e as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C ao abrigo da luz. Em seguida, a fluorescência foi medida usando o equipamento Infinite 200 PRO (Tecan) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. O número de células em cada poço foi determinado comparando-se o valor da fluorescência com uma curva padrão preparada anteriormente. Foram feitas 3 replicatas biológicas cada uma com 3 repetições técnicas.

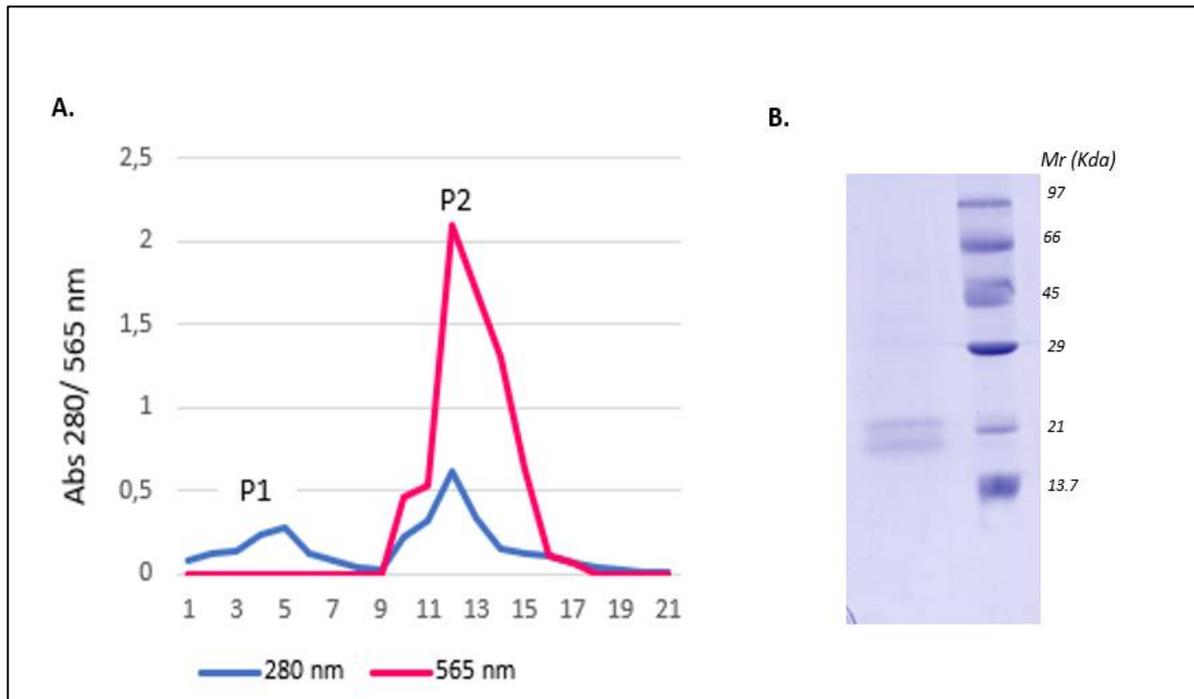
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Perfil de purificação e caracterização bioquímica da HMLp

A proteína HMLp foi purificada por técnicas de cromatografias de troca iônica e o monitoramento da presença da proteína acompanhado na absorção de 280 e 565 nm. A integridade foi avaliada por SDS-PAGE que mostrou apenas duas bandas visíveis que correspondem a cadeia alfa e beta com massa molecular aparente de 20 e 22 kDa, respectivamente (Figura 7). A literatura relata que as ficobiliproteínas podem formar hexâmero com 6 cadeias alfa e 6 cadeias beta, sendo que algumas apresentam uma terceira cadeia, denominada gama, em torno de 30 kDa (D'AGNOLO *et al.*, 1994). A essas cadeias estão as bilinas com comprimento de absorção máxima para a R-ficoeritrina em 565, 538 e 498 nm para a R-ficoeritrina (D'AGNOLO *et al.*, 1994).

A HMLp foi purificada de acordo com protocolo pré estabelecido por Nobre (2015), utilizando métodos clássicos de química de proteínas como a utilização de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica (Figura 7). O método de purificação foi bastante simples, inclusive muitos protocolos na literatura demonstraram ser similares ao que foi utilizado neste trabalho, como os da purificação de R-PE (R-ficoeritrina) de *Gracilaria verrucosa* e *Portiera hornemannii*, onde ambos utilizaram cromatografias de troca iônica (WANG, 2002; SENTHILKUMARA *et al.*, 2013). Método ainda mais simples foi utilizado recentemente por Gu e colaboradores (2018) ao purificarem uma ficobiliproteína da alga vermelha comestível *Gracilaria lemaneiformis* em cromatografia por precipitação centrífuga, onde a proteína foi purificada em uma única etapa apresentando alto grau de pureza. Nesse mesmo estudo foi demonstrado a presença de heterodímeros de cadeia α / β e γ , sendo ilustrado, portanto, que a R-PE purificada tinha três subunidades (α , β e γ), consistentes com a composição das subunidades $(\alpha\beta)_6\gamma$ de diversos estudos, mostrando o quanto essa classe de proteínas é heterogênea. No caso da HMLp, através de SDS-PAGE não foi possível verificar a presença de subunidade gama, cujo gene é codificado pelo genoma nuclear, sendo esse dado demonstrado também no trabalho de purificação anterior, onde a massa molecular nativa correspondia as proteínas oligomerizadas em forma de trímeros ao invés de hexâmero, que necessita de cadeia γ para manter a estrutura estável.

Figura 7 - Purificação da HMLp e determinação do grau de pureza e subunidades monoméricas



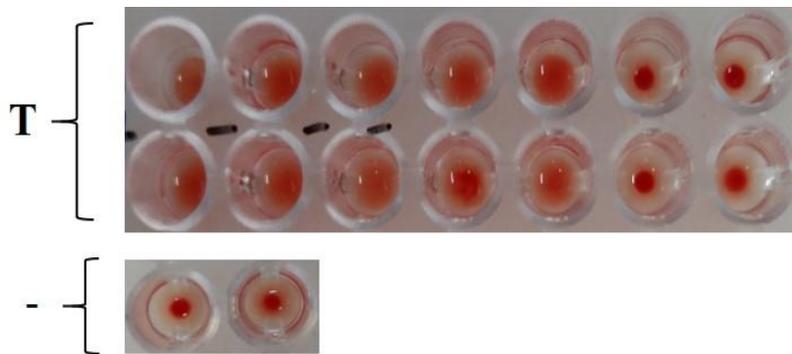
Fonte: elaborado pela autora. A) Perfil cromatográfico. Fração proteica aplicada em uma matriz cromatográfica de troca iônica DEAE-Sephacel. Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 foi utilizado para equilibrar a matriz e eluir as proteínas não retidas no gel (P1). As proteínas retidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo 500 mM de NaCl (P2). A cromatografia foi conduzida a um fluxo de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e frações de 1,5 mL foram coletadas. Em azul estão as proteínas monitoradas a 280 nm e em vermelho o monitoramento realizado a 565 nm, sendo coletado um total de 21 tubos. B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE. Coluna 1: HMLp. Coluna 2: Marcadores moleculares (Da): fosforilase B 97.000, BSA 66.000, ovoalbumina 45.000, anidrase carbônica 29.000, ovomucóide 21.000 e ribonuclease 13.700.

Essas características heterogêneas de ficobiliproteínas em SDS-PAGE foram comprovadas por Zhao *et al.* (2013) com a ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata*, que formava agregados de $\alpha\beta$ e $\beta\gamma$. Essas interações acontecem mesmo em amostras tratadas com agentes caotrópicos como ureia e SDS. A exposição à luz também interfere nesses agregados, onde o aumento do tempo de exposição ajuda nas interações das subunidades. A ficobilina PUB parece estar relacionada a formação desses heterodímeros. Esses relatos mostram a diversidade de conformações assumidas pelas subunidades de ficoeritrinas, justificando o fato de que a ficoeritrina de *H. musciformis* se comporta de forma incomum a maioria das ficoeritrinas de algas vermelhas, ou seja, apresenta-se na forma trimérica ao invés de hexamérica. Essa característica, pode estar associada a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Na superfície dos ficobilissomos, a ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata* comporta-se de três formas

diferentes, formando hexâmero com subunidade γ , hexâmero com subunidade γ' e na forma trimérica sem a subunidade γ (NOBRE, 2015; ZHAO *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi testada a atividade hemaglutinante da ficobiliproteína HMLp, ensaio ainda não relatado na literatura para essa classe de proteínas. Essa característica de aglutinar eritrócitos é comum às lectinas. A HMLp foi testada tanto para sangue humano quanto de coelho, não sendo possível visualizar a hemaglutinação em eritrócitos do sistema ABO de sangue humano, apenas de coelho, em especial, os tratados enzimaticamente com papaína e tripsina (Figura 8).

Figura 8 - Propriedade hemaglutinante da HMLp



Presença de hemaglutinação de HMLp ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) contra suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tratados com tripsina (T) e ausência de hemaglutinação no controle negativo contendo apenas os eritrócitos e Tris-HCl pH 7,6 com NaCl 150 mM (-).

Como relatado anteriormente, a interação proteína-proteína foi testada para a PNA, uma lectina purificada do amendoim que é específica para Gal/GlcNAc. O estudo mostrou que essa lectina se liga à ficobiliproteína independentemente do sítio de ligação a carboidratos, mostrando que esse tipo de interação pode ter várias aplicações clínicas. Nesse ensaio, foi possível verificar a interação de lectinas com ficobiliproteínas através da interação hidrofóbica com o intuito de buscar alguma aplicação biotecnológica através da terapia fotodinâmica. Sendo assim, foi demonstrado que a interação da lectina com a ficobiliproteína era específica e que, mesmo não afetando significativamente a sua capacidade de aglutinar eritrócitos, a conformação geral da lectina era alterada. A interação pode sugerir que as lectinas desempenham um papel *in vivo* muito importante através da relação proteína-proteína. Esses conjugados podem ter grande potencial, pois as lectinas podem atuar como molécula transportadora na administração direcionada de medicamentos e a ficobiliproteína, por outro

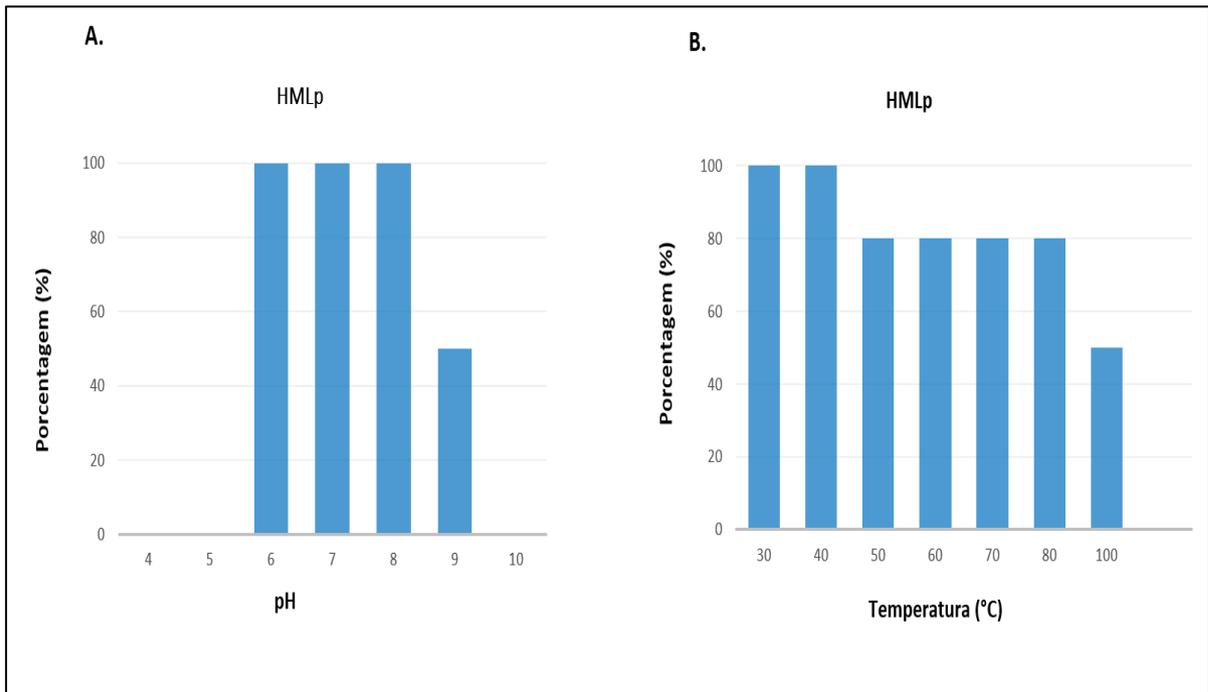
lado, é um fotossensibilizador citotóxico que pode matar células pela produção de oxigênio singlete e, portanto, poderia ser um candidato útil à terapia fotodinâmica. Ambos poderiam ser candidatos interessantes para aplicações biotecnológicas, facilitando a identificação do tecido tumoral ou para elucidação de tipos específicos de padrões de glicosilação em laboratórios de patologia (PANDEY; FATMA; KOMATH, 2009). No presente trabalho está sendo mostrado a capacidade da HMLp reconhecer carboidratos de forma natural, sem a necessidade de conjugação, fator que demandaria um custo maior e poderia, de alguma forma, alterar a conformação biológica da proteína, ocasionando a perda de uma função ou estabilidade em determinadas condições não previstas.

Dos açúcares e glicoproteínas testados em experimentos de bancada, a HMLp foi inibida pela glicoproteína mucina de estômago de porco na concentração de 0,625 mg. mL⁻¹. Nenhum outro açúcar simples ou glicoproteína testada inibiu a atividade da HMLp. Algumas lectinas são inibidas por glicoproteínas de forma muito restrita como é o caso da HML, BTL, BSL e TCL (NAGANO *et al.*, 2005b; CALVETE *et al.*, 2000; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006; MOLCHANOVA *et al.*, 2009). A lectina de *Codium barbatum*, que foi inibida somente por glicoproteínas mucina de estômago de porco e tiroglobulina, quando avaliada a afinidade por outras glicoproteínas ricas em resíduos de manose em *N*-glicanos complexos, não foi inibida, havendo variação no reconhecimento desses carboidratos, isso muito possivelmente devido a variação de ligação α 1-6 presente somente na tiroglobulina mas não na transferrina e fetuína (PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012).

Com relação a estabilidade da HMLp, esta apresentou atividade hemaglutinante em tampões com valores de pH variando entre 6 e 9 e temperatura em todas as condições testadas (Figura 9).

A temperatura é um fator ambiental que afeta muito a distribuição de formas vivas em nosso planeta. A temperatura varia muito ao longo do dia, de acordo com as estações e latitudes e, portanto, constitui uma grande restrição ecológica à fisiologia dos organismos e, conseqüentemente, ao funcionamento dos ecossistemas. Como o PBS constitui o principal portão de entrada de energia luminosa nas máquinas fotossintéticas em alguns organismos aquáticos, a sustentabilidade da função de PBP é de importância crucial para a célula (PITTERA; PARTENSKY; SIX, 2017).

Figura 9 - Efeito da estabilidade da HMLp a uma ampla faixa de pH e temperatura



Fonte: elaborado pela autora. Teste de estabilidade da HMLp em tampões com pH 4 a 10 (A) e temperaturas de 30 a 100 °C (B).

A dissociação de unidades $(\alpha\beta)_3$ e $(\alpha\beta)_6$ durante o processo de purificação geralmente leva a um desvio do pico fluorescente (KUPKA; SCHEER, 2008). Como as PBPs possuem um coeficiente de extinção molar mais alto, elas são amplamente utilizadas em microscopia de fluorescência e ensaios imunológicos. No entanto, as características espectrais das PBPs purificadas geralmente dependem de seus estados de agregação, pois se as PBPs perderem suas estruturas de proteínas, suas propriedades de absorção e fluorescência podem ser diminuídas, até completamente perdidas. Com relação a HMLp, esta manteve-se com sua absorbância mesmo após as várias etapas de purificação, onde o pico de absorbância a 565 nm foi 3,1 vezes maior que o pico de absorbância a 280 nm. Além disso, a proteína manteve-se estável durante a avaliação da hemaglutinação em temperaturas elevadas, isso, provavelmente, deve-se ao fato de serem encontradas em uma ampla gama de nichos ecológicos, incluindo aqueles organismos que crescem em ambientes extremos, como em altas temperaturas e condições ácidas. Notavelmente, nesses ambientes, os componentes dos PBPs desenvolveram modificações estruturais que aumentam significativamente a estabilidade e preservam a função proteínica-pigmento, mesmo sob condições de limites biológicos da vida fototrófica (PUZORJOV; MCCORMICK, 2020).

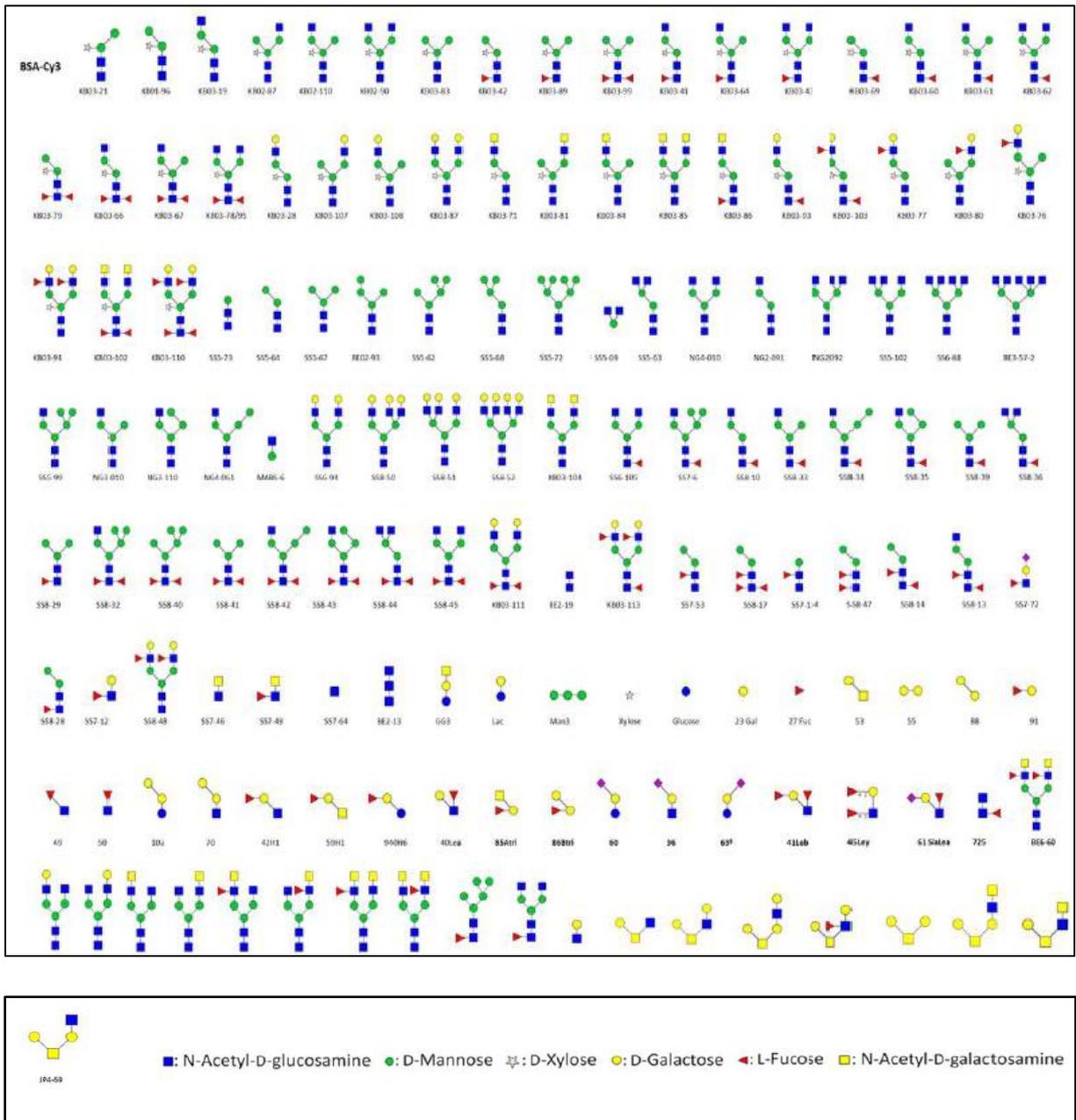
4.2 Análise da especificidade da HMLp por *Glycan array*

Muitos estudos mostram a interação de lectinas com diferentes glicanos, mas a maioria se baseia na ligação utilizando grandes concentrações de açúcar e proteína. Com intuito de descobrir novos ligantes para a HMLp, bem como aumentar a acurácia dos resultados, foi realizada a análise da ligação à diferentes ligantes em superfície sólida através de *Glycan array*. Os resultados foram expressos em Unidade Relativas de Fluorescência (URF).

A técnica de *glycan array* é uma poderosa ferramenta para analisar a especificidade fina de ligação a carboidratos por lectinas de diversos organismos, contudo quando se trata de lectinas de algas há poucos relatos na literatura. A principal característica é utilizar uma grande diversidade de açúcares em quantidades muito pequena. As lectinas de *Hypnea japônica*, por exemplo, tiveram suas especificidades determinadas por cromatografia de afinidade, se ligando a *N*-glicanos complexos contendo núcleo de fucolisação α 1-6 (OKUYAMA *et al.*, 2008). No caso da ESA-2, de *Euchema serra*, foi utilizado o método de ultracentrifugação centrífuga acoplada a um HPLC, mostrando-se específica a *N*-glicanos com alto teor de manose (HORI *et al.*, 2007).

A HMLp possui, por atividade de inibição em placas, especificidade por mucina, uma glicoproteína que pode conter inúmeras cadeias de oligossacarídeos *O*-ligados, principalmente *O*-GalNAc e *O*-fucose. A expressão de mucina é bastante comum nas células epiteliais especializadas na produção de muco como barreira de proteção, podendo também participar do processo de adesão celular (SCHMALTZ *et al.*, 2011). A seguir estão dispostos os açúcares testados para verificar a especificidade da HMLp pela técnica de *glycan Array* (Figura 10).

Figura 10 - Glicanos utilizados para análise da especificidade da HMLp



Fonte: Glicanos utilizados no screening de determinação do específico de HMLp utilizando *Glycan array*

A HMLp possui capacidade de se ligar a *N*-glicanos complexos com núcleo de fucosilação α 1-6 como mostrado na figura 11, em especial para os glicanos KB0361, KB066, KB067, SS6105, SS8-33, SS8-34, SS8-42, SS8-45, KB0111 e KB0113 (Figura 11).

para distinguir a diferença entre câncer e inflamação (WANG *et al.*, 2009). Nesse sentido, algumas lectinas são comercializadas por reconhecer esses glicanos como é o caso da lectina de *Aleuria aurantia*, um cogumelo, que se liga preferencialmente à fucose (α -1,3, α -1,2, α -4 e α -1,6) e estruturas relacionadas à *N*-acetilactosamina (ROMANO *et al.*, 2011).

Por *glycan array*, foi demonstrado que a BTL, da alga marinha *Bryothamnion triquetrum*, tem especificidade estrita por *N*-glicanos complexos com núcleo de fucosilação α -1,6, sendo a primeira lectina de alga a ter esse resultado concluído, mostrando seu potencial como possível marcador para detectar a fucosilação do núcleo das glicoproteínas da superfície celular dos animais, além de uma potencial ferramenta para o diagnóstico de câncer, bem como um reagente para a preparação e controle da qualidade de anticorpos (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

O uso de *glycan array* foi utilizado também para BPL3 recombinante e BPL3 nativa, da alga *Bryopsis plumosa*, que exibiram propriedades de ligação diferentes. Ambos mostraram fraca atividade de ligação a α -manose. A BPL3 nativa mostrou forte especificidade de ligação à conformação alfa de monossacarídeos enquanto a proteína recombinante teve atividade de ligação à conformação beta, muito provavelmente porque BPL3 nativa tinha duas cisteínas intramolecular conectadas. Utilizando o sistema bacteriano recombinante, a formação da ligação dissulfeto foi difícil, ou seja, essa ligação é um determinante importante da especificidade do açúcar (HWANG *et al.*, 2018). Esses estudos são importantes para caracterizar essas proteínas e verificar de forma confiável possíveis alterações de especificidade.

A HMLp também apresentou especificidade fraca (fluorescência abaixo de 10) para alguns açúcares conforme figura 12.

4.3 Identificação da função da proteína HMLp por sequenciamento de peptídeos

Alguns peptídeos foram sequenciados com o intuito de elucidar a estrutura primária dos peptídeos de ambas as cadeias. No trabalho anterior (NOBRE, 2015), foi possível obter peptídeos por espectrometria de massa utilizando a fonte de ionização do tipo *eletrospray* e ferramentas de biologia molecular, sendo concluído 50% da cadeia beta. Neste trabalho, os dados de MS/MS, foram obtidos utilizando a fonte de ionização por MALDI e analisador de massa do tipo TOF (Tabela 2 e 3), o que possibilitou sequenciar peptídeos da cadeia alfa e beta, entretanto, alguns eram idênticos aos que já tinham sido sequenciados, muito provavelmente por terem facilidade no processo de ionização, e alguns novos peptídeos, que permitiram um alinhamento com a gerythrin, uma ficoeritrina da alga marinha vermelha *Hypnea pannosa*.

Tabela 2 - Peptídeos sequenciados da cadeia alfa por MS/MS

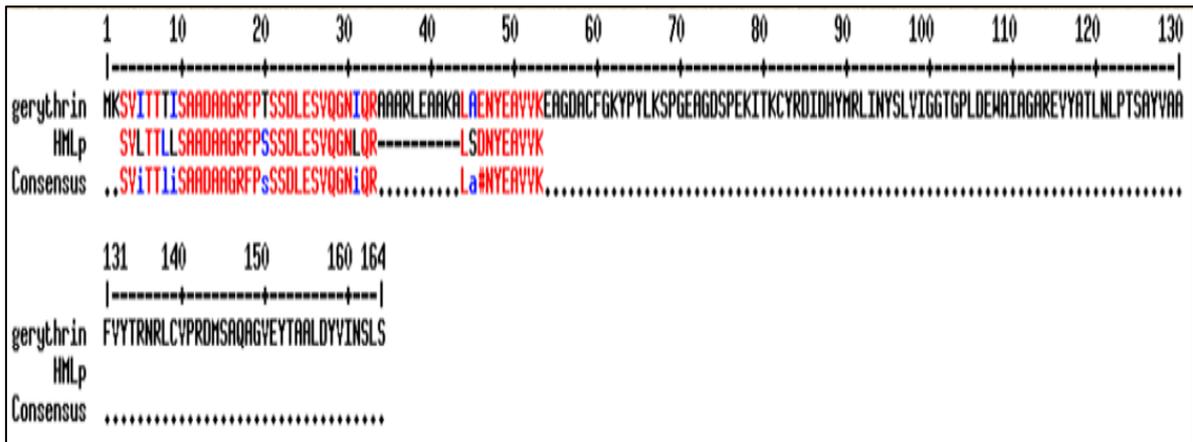
| PEPTÍDEO | MASSA MOLECULAR (Da) |
|--------------------------------|----------------------|
| SVLTLLSAADAAGRFPSSSDLESVQGNLQR | 1065,37 |
| LSDNYEAVVK | 605,38 |

Tabela 3 - Peptídeos sequenciados da cadeia beta por MS/MS

| PEPTÍDEO | MASSA MOLECULAR (Da) |
|-----------------------|----------------------|
| CLDGLKETYLALGVPANSSLR | 1147,82 |
| SYALLAGDASVLEDR | 922,11 |

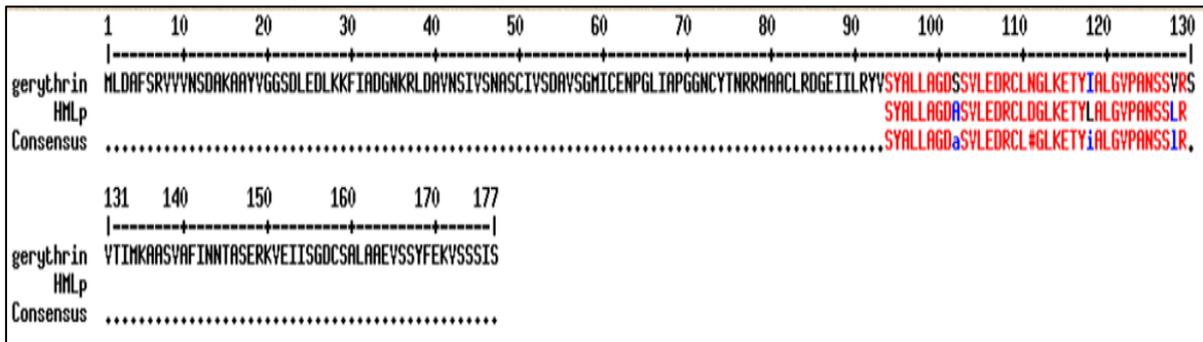
A HMLp apresentou identidade com peptídeos da *gerythrin*, de *Hypnea pannosa* (Figuras 13 e 14). Os extratos dessa alga possui atividade antibacteriana, analgésica, antifúngica e atividade hemaglutinante (SHANMUGHAPRIYA *et al.*, 2008, MAZHAR *et al.*, 2011; ASHRAF; AHMED, 2015; ALAM; USMANGHANI, 1994).

Figura 13 - Mapa peptídico da cadeia alfa da HMLp



Alinhamento resultante do programa *MultiAlin*. Em preto a sequência de aminoácidos da cadeia alfa de *gerythrin* de *Hypnea pannosa* (acesso *Uniprot* A0A4D6WTR8) alinhada com os peptídeos sequenciados de HMLp de acordo com a tabela 2. Em vermelho consta a sequência consensus.

Figura 14 - Mapa peptídico da cadeia beta da HMLp



Alinhamento resultante do programa *MultiAlin*. Em preto a sequência de aminoácidos da cadeia beta de *gerythrin* de *Hypnea pannosa* (acesso *Uniprot* A0A4D6WU84) alinhada com os peptídeos sequenciados de HMLp de acordo com a tabela 3. Em vermelho consta a sequência consensus.

4.4 Análise da atividade inseticida da HMLp contra células de insetos

As plantas transgênicas resistentes a insetos, que dominam o mercado atual, são aquelas que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). No entanto, nem todas as pragas são suscetíveis à essas toxinas como, por exemplo, insetos e pulgões sugadores, e há preocupação de que mesmo espécies suscetíveis possam evoluir para se tornarem resistentes a essas culturas. Atualmente, a busca por inseticidas alternativos está em andamento, com avanços significativos já feitos na produção de culturas transgênicas que expressam compostos inseticidas de plantas, como inibidores de proteases, lectinas e inibidores de alfa-amilases (MALONE *et al.*, 2008). De fato, a maioria dos estudos de atividade inseticida tem se concentrado nas lectinas de plantas do domínio das leguminosas, por mostraram potencial como agente inseticida devido ao padrão de glicosilação nas células do intestino médio dos insetos (REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018). É sabido que as lectinas de algas não são a maioria no número de proteínas purificadas, talvez isso justifique os poucos estudos publicados com atividades inseticidas dessas biomoléculas. De qualquer forma, esses estudos com lectinas de plantas sinalizam a importância do domínio de ligação a carboidrato na eficiência da atividade, servindo como base para aplicação de outras classes de lectinas, em especial as oriundas de organismos aquáticos.

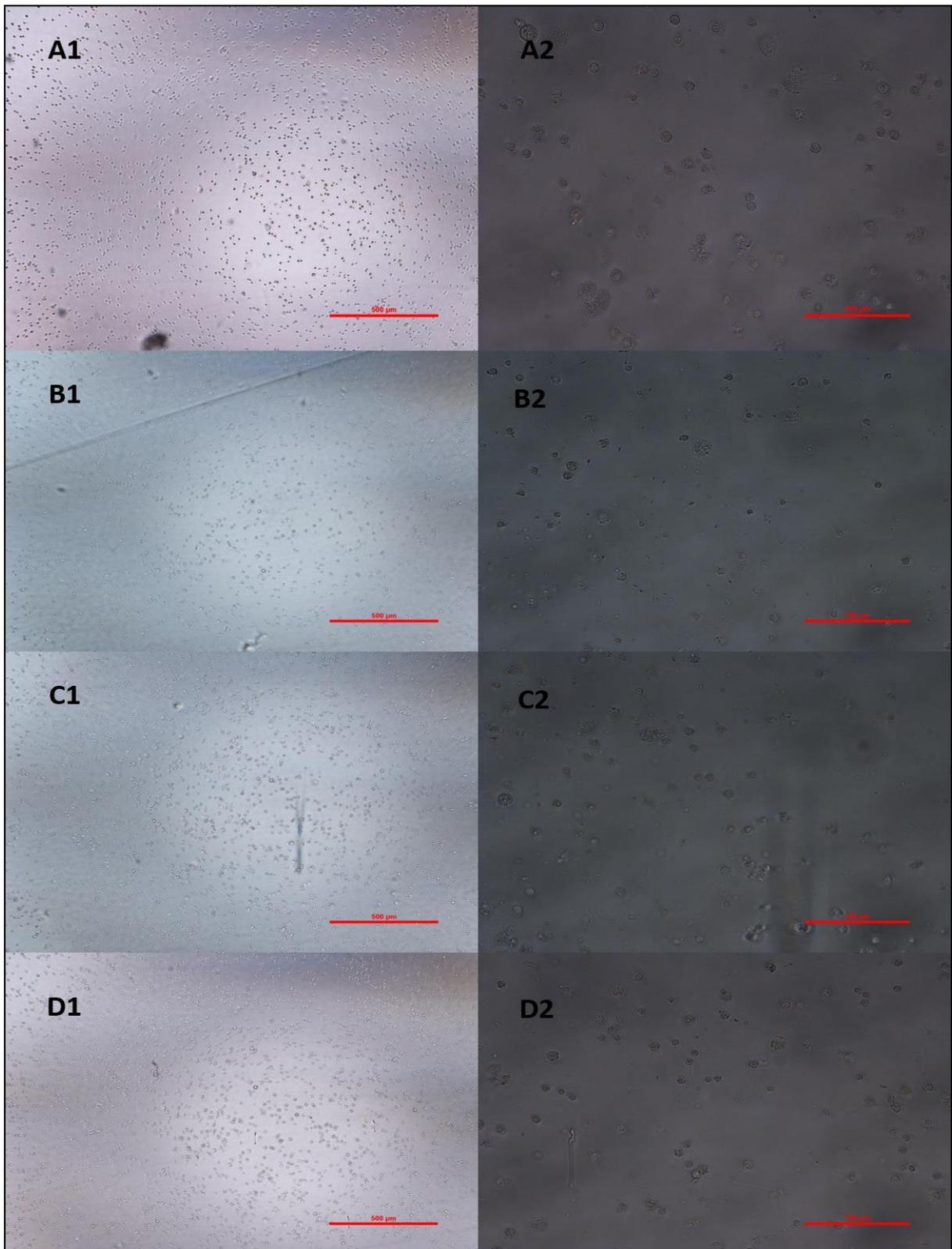
No presente trabalho, foi verificada a interação da HMLp com duas linhagens de células de insetos (linhagem S2 de *Drosophila melanogaster* e linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana*). É sabido que as lectinas agem nos insetos ligando-se às glicoproteínas presentes no epitélio intestinal, causando a morte do inseto por inanição e por inibir a absorção de nutrientes. Acredita-se que os *N*-glicanos nos insetos possuam alto teor de manose, sendo assim, há um grande interesse, especialmente em lectinas vegetais específicas a manose, como possíveis moléculas inseticidas e também para o desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas de manejo de pragas. No entanto, as lectinas possuem especificidades a diferentes açúcares e, considerando a variedade de estruturas de glicanos nos corpos dos insetos, têm muitos alvos possíveis que ainda não foram testados. Avanços foram feitos no conhecimento relacionado à diversidade e funções de glicanos em proteínas de insetos, como *N*-glicosilações e *O*-glicosilações, e postulou-se que a interferência na glicosilação de insetos parece ser uma estratégia promissora para o controle de pragas e atividade inseticida (VANDENBORRE *et al.*, 2011; HAMSHOU *et al.*, 2012; WALSKI *et al.*, 2017).

Com relação a atividade inseticida para a linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*), tanto as células controles quanto as células incubadas com a HMLp, foram avaliadas após o

período de até 48 horas de incubação, como mostrado na figura 15. Na linha A, as células controles estão na resolução de 4 x (A1) e 20 x (A2). A atividade de HMLp foi realizada na concentração de 100, 50 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B, C e D). Na avaliação da atividade é possível visualizar a diminuição no crescimento das células de acordo com o aumento na concentração de proteínas, mostrando que existe uma atividade de morte celular. Para comprovar que a morte das células estava sendo pela presença da HMLp, foi realizada uma quantificação das células e os dados foram disponibilizados na figura 16, sendo assim, comparativamente as células controle, a HMLp promove a morte celular da linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*) de forma dose dependente.

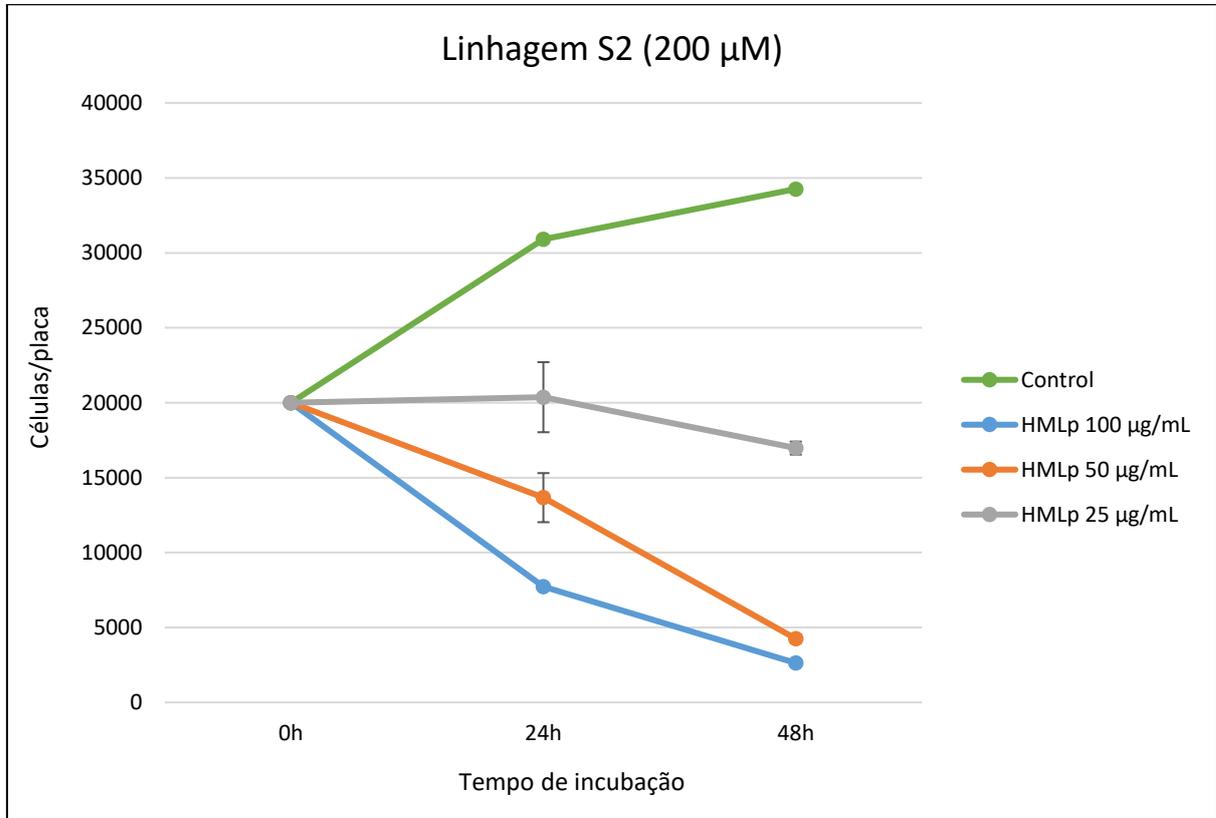
Há ainda estudos que demonstram que muitas enzimas com atividades hidrolíticas, que são conhecidas por se concentrarem em lisossomos, contêm *N*-glicanos oligo-manosídico nas células S2 de *Drosophila melanogaster*, sendo esse evento de *N*-glicosilação específico para cada espécie (VANDEBORRE *et al.*, 2011).

Figura 15 - Ensaio de citotoxicidade da HMLp sobre células de inseto da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster*



Linha A: Microscopia óptica da células controle (células na ausência de lectinas) após 48 horas de incubação na resolução de 4 x (A1) e 20 x de magnificação óptica (A2); **Linha B:** HMLp após 48 horas de incubação na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na resolução de 4 x (B1) e 20 x (B2); **Linha C:** HMLp após 48 horas de incubação na concentração de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na resolução de 4 x (C1) e 20 x (C2); **Linha D:** HMLp após 48 horas de incubação na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na resolução de 4 x (D1) e 20 x (D2).

Figura 16 - Gráfico de crescimento das células de inseto da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster*



Avaliação das células controle da linhagem S2 de *Drosophila melanogaster* e incubadas com HMLp em várias concentrações (25, 50 e 100 µg.mL⁻¹) durante o período de 0, 24 e 48 horas de incubação.

A sensibilidade de diferentes espécies de insetos aos efeitos inseticidas da ingestão de lectinas é variável, e a ligação de uma lectina no intestino médio não implica necessariamente toxicidade. Alguns ensaios biológicos indicam que as lectinas afetam várias enzimas hidrolíticas de insetos, como glicosidases, fosfatases e proteases envolvidas na digestão, no desenvolvimento, no crescimento e na desintoxicação. Até o momento, vários estudos demonstraram ação de toxicidade por lectinas em insetos pertencentes a diferentes ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera. No entanto, o modo exato de ação das lectinas na toxicidade contra insetos permanece incerto. A propriedade mais relevante do potencial inseticida da lectina pode estar relacionada a suas interações com diferentes glicoproteínas ou estruturas de glicano em insetos, o que pode interferir em vários processos fisiológicos nesses organismos. As lectinas possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos e diferentes especificidades por açúcares, e os possíveis alvos para reconhecimento da lectina são

numerosos, podendo envolver vários mecanismos (REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018).

A HMLp foi bastante eficiente na inibição do crescimento da linhagem Schneider 2. Essas células, geralmente abreviadas como células S2, pertencem a uma das linhas celulares de *Drosophila melanogaster* mais comumente usadas. A atividade da HMLp pode estar baseada na interação com glicanos presentes na superfície dessas células. S2 são tipicamente redondas com um diâmetro de 15 a 20 µm e foram escolhidas porque representam um importante inseto modelo e devido à disponibilidade do banco de dados do genoma e proteoma de *Drosophila* (ADAMS *et al.*, 2000).

A HMLp interagiu com mucina na análise por inibição em placa e com diversos *N*-glicanos por *glycan array*, mostrando que esta pode ser utilizada como ferramenta na interação com esses carboidratos.

A via de sinalização *Notch* é uma via de sinalização celular que envolve proteínas transmembrânicas que, ao se ligarem com proteínas da célula vizinha, ativam uma cascata bioquímica, e são altamente conservadas de *Drosophilas* até humanos, atuando principalmente no desenvolvimento de células embrionárias, coordenando a diferenciação celular, proliferação celular e apoptose (GILBERT, 2019). É sabido que as *Drosophilas* possuem uma variedade de *O*-glicanos. Em trabalhos anteriores, a demonstração de que a modificação da proteína receptora *Notch* de *Drosophila* com *O*-Fucose ligado afeta a sua sinalização e que a extensão de *O*-Fuc com GlcNAc modula a capacidade de *Notch* de discriminar entre os ligantes, abriu um novo campo fértil para acoplar a análise genética a glicêmicos funcionais (KATOH; MICHAEL, 2012; OKAJIMA; XU; IRVINE, 2003).

Como relatado anteriormente, a HMLp possui pigmento natural (ficobilina) que pode funcionar como uma ferramenta para estudos biotecnológicos baseados na ligação de lectinas a proteínas glicosiladas. Isso se torna importante devido a ampla variedade desses glicanos e os diversos eventos biológicos que eles podem sinalizar. A alta especificidade das lectinas permite que a sinalização desses eventos ocorra de forma bem seletiva. No entanto, os mecanismos que regulam a diversidade e a especificidade são desconhecidos. Nas últimas décadas, estudos genéticos em *Drosophila* foram utilizados para examinar as funções mediadas pela glicosilação *in vivo*. As recentes melhorias no uso combinado de abordagens bioquímicas, biofísicas, genéticas e de biologia celular permitiram a análise rápida e detalhada da estrutura, função e formação de glicanos em *Drosophila*, mas muito ainda precisa ser feito (YAMAMOTO-HINO *et al.*, 2012).

Leite e colaboradores (2005) trabalhando com a GOL, uma lectina da alga vermelha marinha *Gracilaria ornata* (Gracilariaceae, Rodophyta), mostrou que essa lectina afetou significativamente o desenvolvimento de larvas de *Callosobruchus maculatus*, indicando a possibilidade de uso dessa lectina em uma estratégia biotecnológica para o manejo de insetos de sementes do feijão caupi armazenadas. Essa lectina interage com mucina e alguns carboidratos complexos, não se ligando a mono- e dissacarídeos, e não possui atividade hemaglutinante em sangue humano, assim como a HMLp.

Em estudo recente, foi mostrado que uma ficobiliproteína purificada de *Microcystis* (MC-PBP), cianobactérias presentes em água doce, foi tóxica em ensaios de mortalidade e análises morfológicas em uma linhagem celular de *Caenorhabditis elegans* (nematódeo), *Spodoptera frugiperda* (linhagem SF21) e larvas de *Chilo suppressalis*, sendo estas últimas, insetos da ordem lepidoptera com grande importância econômica por serem pragas comuns, em especial do arroz. Nesse estudo, foi utilizado fótons para verificar a possibilidade de desenvolver inseticidas fotossensíveis naturais que são mais ecológicos. Foi possível demonstrar que MC-PBP estava localizada, principalmente, no lisossomo nas células SF21. A observação morfológica demonstrou que a apoptose autofágica é a principal via de morte de *C. elegans*, e o intestino médio e o corpo adiposo são os tecidos alvo nas larvas de *C. suppressalis* induzidas pela toxicidade fotoativa de MC-PBP (LIANG *et al.*, 2016). Portanto, é importante enfatizar que o próprio pigmento pode contribuir com alguma atividade inseticida e, dessa forma, pode potencializar a atividade da HMLp.

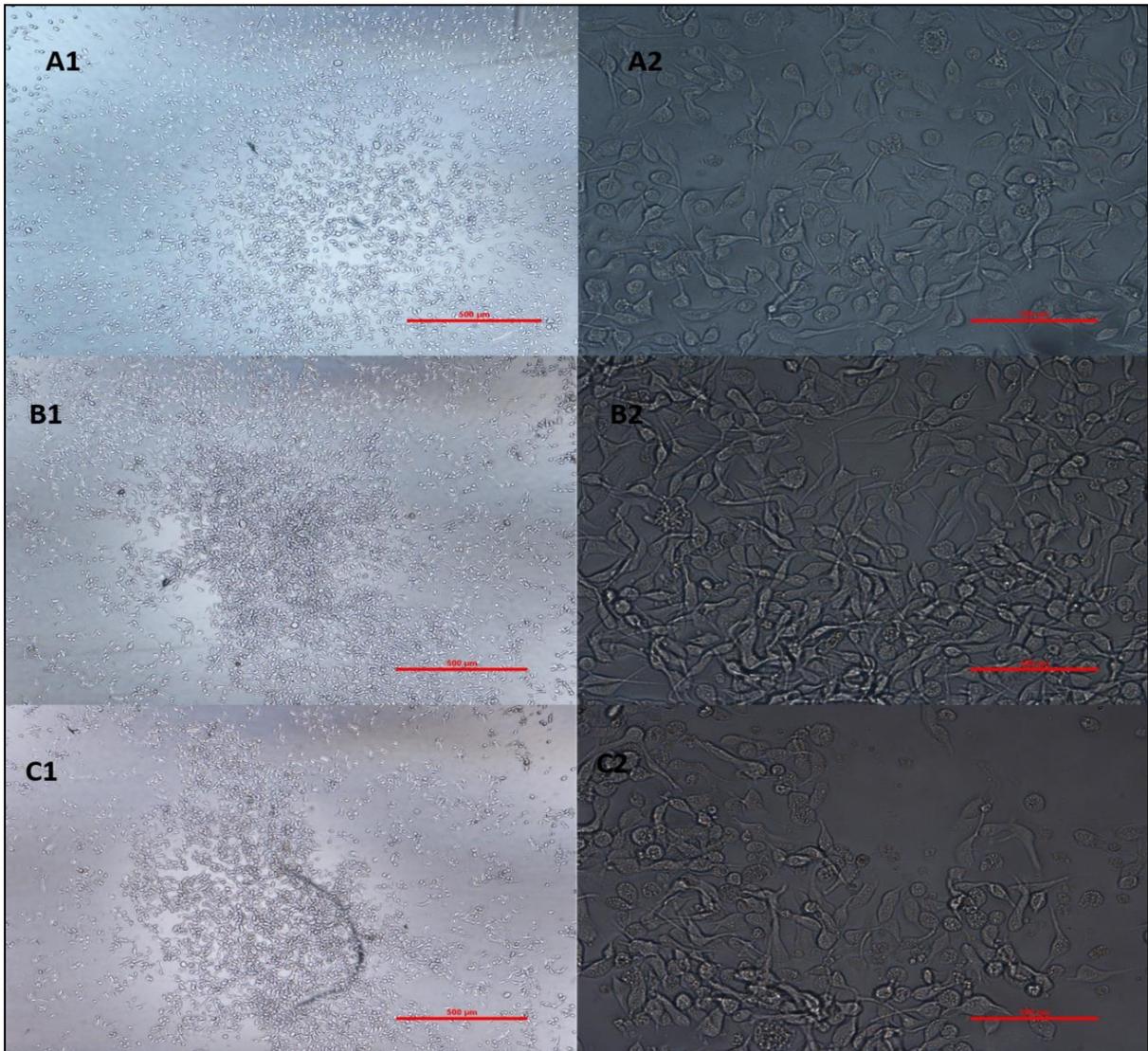
O mecanismo de ação tóxica das lectinas contra insetos ainda não está completamente claro. Parâmetros como sobrevivência, fecundidade, fertilidade, consumo de alimentos, tamanho, peso, cor e período de desenvolvimento são usados para medir seus efeitos. Esta é uma questão muito complicada porque as lectinas mostram uma ampla gama de efeitos sobre os insetos. Considerando a fisiologia complexa do organismo, dois requisitos básicos para a toxicidade da lectina parecem ser a resistência à digestão por enzimas proteolíticas e a capacidade de ligar glicoconjugados em algum ponto do intestino do inseto (PANIZZI, PARRA, 2012).

A atividade da HMLp foi testada também para as células da linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana* (Figura 17). Com relação aos resultados, não houve inibição do crescimento celular quando comparado com os resultados das células controles, sem adição da HMLp (Figura 18), esse resultado também foi avaliado após o período de 72 horas para confirmar o efeito negativo na inibição do crescimento. Poucos estudos mostram a ação de lectinas com as células CF1 (*Choristoneura fumiferana*), dificultando a comparação. Em

trabalho feito com endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* foi possível verificar a inibição da toxicidade quando estas foram pré-incubadas com GalNAc e *N*-acetilneuramínico, mas não com monossacarídeos e GlcNAc. Sabe-se que muitas toxinas e outros ligantes biológicos se ligam a receptores específicos de glicoproteínas ou glicolipídeos na membrana plasmática. Isso leva à hipótese de que a ligação de toxinas específicas dos lepidópteros a um glicoconjugado específico na membrana plasmática das células suscetíveis é uma característica essencial de sua ação citolítica. Nesse trabalho, GalNAc neutralizou completamente a toxina, mostrando que possivelmente faça parte do receptor na linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana* (KNOWLES; THOMAS; ELLAR, 1984).

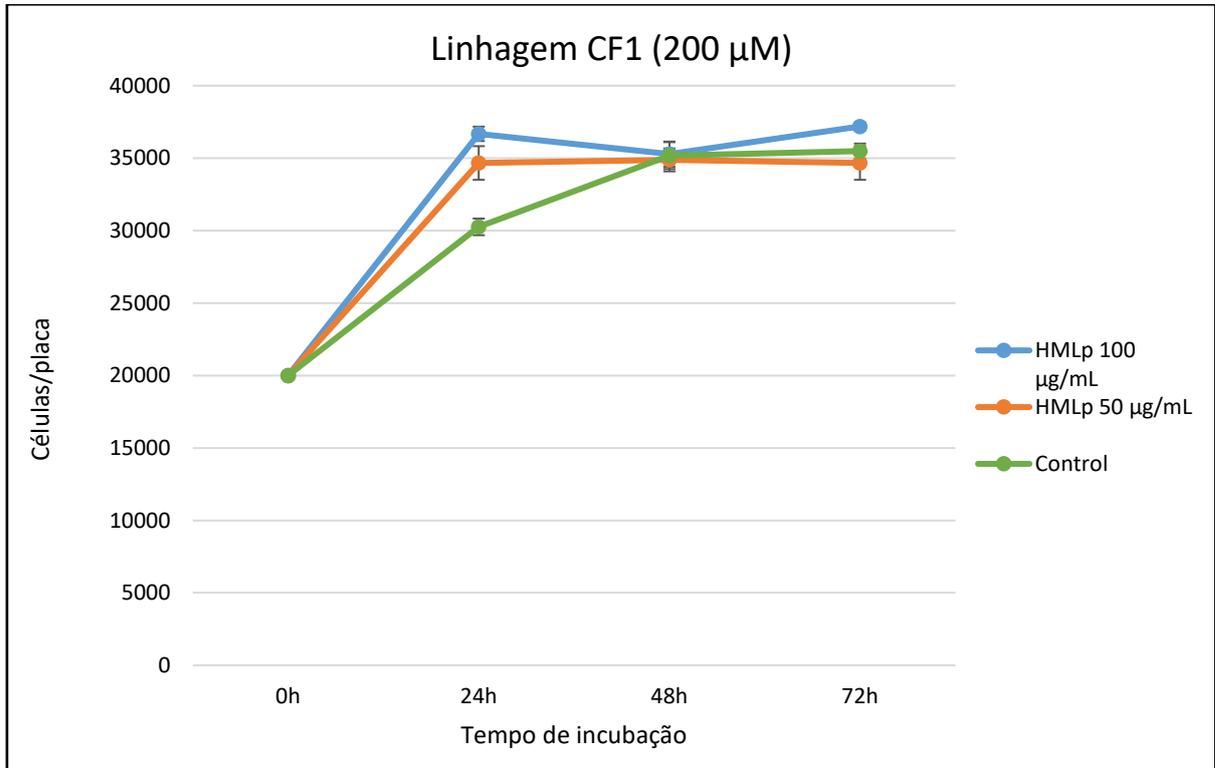
A presença de GalNAc como provável inibidor da ação de toxinas também foi demonstrado por Knowles e colaboradores (1991), que mostraram que essas proteínas presentes na superfície de CF1 também se ligavam à lectina de soja, a SBA, reforçando que GalNAc seja um forte receptor por onde as toxinas atuam inibindo a proliferação das células.

Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade de HMLp sobre células de inseto da linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana*



Linha A Microscopia óptica das células controle (células na ausência de lectinas) após 48 horas de incubação na resolução de 4 x (A1) e 20 x de magnificação óptica (A2); **Linha B:** HMLp após 48 horas de incubação na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na resolução de 4 x (B1) e 20 x (B2); **Linha C:** HMLp após 48 horas de incubação na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na resolução de 4 x (C1) e 20 x (C2).

Figura 18 - Gráfico do crescimento das células de inseto da linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana*



Avaliação das células controle da linhagem CF1 de *Choristoneura fumiferana* e HMLp incubada na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante o período de 0, 24, 48 e 72 horas de incubação.

O mecanismo de ação das lectinas pode variar de acordo com o organismo e a forma com que os testes são conduzidos. A lectina de *Annona coriacea* (ACLEC) foi testada quanto à atividade inseticida contra larvas de duas mariposas *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*. A ACLEC produziu aproximadamente 50% de mortalidade e perda de massa nas larvas de *A. kuehniella* quando incorporadas a uma dieta artificial nos níveis de 1,5% e 1,0% (p/p), respectivamente. Por outro lado, a inclusão de até 2% de ACLEC na dieta não diminuiu significativamente a sobrevivência ou o peso das larvas de *C. cephalonica*. Os índices nutricionais de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* sugeriram que a ACLEC tinha um modo de ação multi-mecanicista. A toxicidade em *A. kuehniella* aparentemente resultou de uma alteração no ambiente da membrana intestinal e consequente interrupção dos mecanismos de reciclagem de enzimas digestivas. A cromatografia de afinidade mostrou que essa lectina se ligava às proteínas do intestino médio de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*. Contudo, a subunidade de 14 kDa de ACLEC não foi digerida pelas proteases do intestino médio de *A. kuehniella*, mas foi degradada pelas proteases de *C. cephalonica* em poucas horas (COELHO; MARANGONI; MACEDO,

2007). Esses estudos mostram que apesar de alguns organismos serem parecidos o mecanismo de ação da lectina pode ser alterado por algum mecanismo presente de forma distinta.

O mecanismo de ação das lectinas em determinadas atividades inseticidas pode ser bastante diferenciado. Shahidi-Noghabi e colaboradores (2011), trabalhando com duas lectinas purificadas de *Sambucus nigra*, mostraram que não houve ligação das lectinas com os glicanos da superfície celular de CF-203 (linhagem de *Choristoneura fumiferana*), mas que ambas foram internalizadas, causando toxicidade e morte celular.

A atividade inseticida de uma lectina de *Sclerotinia sclerotiorum* (fungo patogênico), conhecida como SSA, foi realizada utilizando células de CF-203, uma linhagem de *Choristoneura fumiferana*. Nesse ensaio, pulgões (afídeos) da espécie *Acyrtosiphon pisum*, que são insetos que se alimentam da seiva de plantas, foram submetidos a uma dieta artificial contendo diferentes concentrações de SSA. Os resultados mostraram uma alta mortalidade dos insetos causadas por ação dessa lectina fúngica. Estudos de histofluorescência dos tecidos dos insetos submetidos a dieta artificial contendo SSA marcada com FITC, indicaram que o intestino médio do inseto foi o alvo primário da lectina. Além disso, a toxicidade de SSA para células CF-203 foi significativamente reduzida quando essas lectinas foram incubadas com GalNAc e asialomucina antes do tratamento das células. Esses dados fortalecem a evidência de que SSA se liga aos carboidratos específicos nas proteínas de membrana celular para iniciar uma cascata de transdução de sinalização que leva à morte das células epiteliais do intestino médio, que por sua vez resulta na mortalidade do inseto, sendo um potencial para o controle de insetos e outras pragas (HAMSHOU *et al.*, 2010). A HMLp não foi incubada com o carboidrato, o que poderá ser feito futuramente para garantir que a ação contra as células da linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*) estava relacionada a atividade de reconhecimento a carboidrato.

De fato, os mecanismos podem ser bastante diferenciados dentre as várias lectinas, e muitas vezes podem gerar dúvidas quanto a participação do domínio de ligação a carboidrato na atividade inseticida. Para comprovar a ação do reconhecimento a carboidrato como parte fundamental para a ação inseticida, a lectina de *Griffonia simplicifolia* sofreu uma mutação no seu gene para eliminar a atividade de ligação a carboidrato, o que causou diminuição na toxicidade da lectina para pragas do feijão caupi (ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998).

No presente trabalho, a HMLp não foi eficiente na toxicidade contra células de *Choristoneura fumiferana* linhagem CF1, mas foi tóxica para as células de *Drosophila melanogaster* linhagem S2. Esse resultado sugere que a ação da proteína provavelmente foi dependente do perfil de carboidratos expostos na membrana celular de ambas as células. O reconhecimento a GalNAc parece ser essencial para a ação tóxica por biomoléculas, como

mostrado por Knowles e colaboradores (1991) com as linhagens celulares de *Choristoneura fumiferana*. A lectina de *Clitocybe nebularis* (fungo), a CnSucL, apresentou efeito tóxico elevado contra células de *Drosophila melanogaster*, mas não obteve nenhum efeito tóxico contra as células de *Leptinotarsa decemlineata*, inseto conhecido como besouro da batata (POHLEVEN *et al.*, 2011). O resultado desse estudo foi similar ao obtido pela HMLp, que foi bastante tóxica para uma linhagem em detrimento de outra.

A HMLp foi eficiente na morte celular da linhagem Scheneider 2. Esses resultados sugerem que a proteína possa ser utilizada em novos estudos com essa cepa e outras linhagens celulares de importância para o controle com pragas agrícolas e, assim, descobrir os mecanismos de ação para inibir o crescimento das células e, conseqüentemente, serem utilizadas como uma ferramenta biotecnológica.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível obter uma ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, com similaridade a ficoeritrina de *Hypnea pannosa*. A HMLp, por *glycan array*, apresentou capacidade de reconhecer glicanos complexos com núcleo de fucosilação do tipo α 1-6. Além disso, a biomolécula é composta por duas cadeias proteicas, estável em faixa de pH e temperaturas extremas e com ação citotóxica contra células de *Drosophila melanogaster* linhagem S2. Estes dados sugerem que a HMLp apresenta potencial atividade inseticida, porém estudos estruturais adicionais devem ser realizados para compreender melhor essa ação.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, [S.l.], v. 287, p. 2185–2195, mar. 2000.
- ADIR, N.; BAR-ZVI, S.; HARRIS, D. The amazing phycobilisome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [S.l.], v. 1861, p. 1-12, jul. 2020.
- ADL, S. M. *et al.* The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.l.], v. 52, p. 399–451, set. 2005.
- AFP: Inseto nocivo à floresta boreal migra para o norte devido ao aquecimento. **Correio Braziliense**, Brasília, 25 jul. 2014. Disponível em: https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/mundo/2014/07/25/interna_mundo,439204/inseto-nocivo-a-floresta-boreal-migra-para-o-norte-devido-ao-aquecimento.shtml. Acesso em: 12 dez. 2020.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Comparative study on haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 15-19, fev. 1995.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botânica Marina**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 211-214, jul. 1991.
- ALAM, M. T.; USMANGHANI, K. Studies on marine algae for haemagglutinin activity. **Pak J. Pharm. Sci.**, [S.l.], v. 7, p. 1-15, mar. 1994.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALVES: Coníferas têm grande importância ambiental e econômica. **Agro 2.0**, São Paulo, 08 fev. 2020. Disponível em: <https://agro20.com.br/coniferas>. Acesso em: 11 dez. 2020.
- ALVEY, R. M. *et al.* Effects of Modified Phycobilin Biosynthesis in the Cyanobacterium *Synechococcus sp.* Strain PCC 7002. **Journal of bacteriology**, [S.l.], p. 1663–1671, jan, 2011.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 12 dez. 2020.
- ANWER, K. *et al.* Role of N-terminal residues on folding and stability of C- phycoerythrin: simulation and urea induced denaturation studies. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, [S.l.], v. 33, p. 121–133, out. 2015.

APT K. E.; GROSSMAN, A. R. Characterization and transcript analysis of the major phycobiliprotein subunit genes from *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta). **Plant molecular biology**, [S.l.], v. 21, p. 27- 38, jan. 1993.

APT, K. E.; METZNER, S.; GROSSMAN, A. R. The γ subunits of phycoerythrin from a red alga: position in phycobilisomes and sequence characterization. **Journal of phycology**, [S.l.], v. 37, p. 64-70, abr. 2001.

ARIEDE, M. B. *et al.* Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, [S.l.], v. 25, p. 483-487, jul. 2017.

ASHRAF, M.; AHMED, S. Antifungal activity of *Hypnea pannosa* j. agardh against *Aspergillus flavus*. **Int. J. Phycol. Phycochem.**, Karachi, v. 11, p. 1-4, jul. 2015.

BALAMURUGAN, L. M., *et al.* Biochemical Study and GC-MS Analysis of *Hypnea musciformis* (Wulf.). **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, [S.l.], v. 8, p. 117-123, mar. 2013.

BARRE, A. *et al.* Overview of the Structure–Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 20, p. 1-49, jan. 2019.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1 ed. Flórida: Taylor & Francis, 2006.

BEALE, S. I.; COMEJO, S. Biosynthesis of phycobilins: 15, 16-dihydrobiliverdin IXa is a partially reduced intermediate in the formation of phycobilins from biliverdin IXa. **J. biol. Chem.**, [S.l.], v. 266, p. 22341-22345, jul. 1991.

BEKETOV, M. A. *et al.* Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **PNAS**, [S.l.], v. 110, p. 11039-11043, jul. 2013.

BERNARD, C.; ETIENNE, A. L.; THOMAS, J. C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (rhodophyta). **Journal of phycology**, [S.l.], v. 32, p. 265-272, dez. 1996.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. **Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, v. 1, p. 49-60, 2010.

BITENCOURT, F. S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, [S.l.], v. 377, p. 139–148, fev. 2008.

BOROWITZKA, M. A. Algae Biotechnology. **The Algae World**, [S.l.], v. 26, p. 319-338, jan. 2015.

BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 6, p. 82-83, mar. 1966.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caracterização do estado da arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**, Brasília, 2010.

CALVETE, J. J. *et al.* 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**, [S.l.], v. 57, p. 343-350, fev. 2000.

CHEN, X. *et al.* Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 77, p. 468- 474, dez. 2017.

COELHO, M. B.; MARANGON, S.:I.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.l.], v.146, p. 406-414, out. 2007.

CONTRERAS-MARTEL, C. *et al.* Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallogr.**, [S.l.], v. 57, p. 52-60, jan. 2001.

D'AGNOLO, R. *et al.* Phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longae*. **Phytochemistry**, [S.l.], v.35, p. 693-696, fev. 1994.

DAVID, L.; MARX, A.; ADIR, N. High-resolution crystal structures of trimeric and rod phycocyanin. **J. Mol. Biol.**, [S.l.], v. 405, p. 201–213, jan. 2011.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O.; Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 40, p. 173- 289, abr. 2000.

DENNIS, J. W. GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssays**, [S.l.], v. 21, p. 412-421, mai. 1999.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v.12. p.13-15, abr. 1987.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical journal**, [S.l.], v. 18, p. 1- 25, jan. 2010.

EUROPEAN MARINE BOARD. **Marine Biotechnology**: a sea of advancements. Belgian, v.1, 2017. Disponível em: <http://www.marineboard.eu/publication>. Acesso em: 23 abr. 2020.

FABINI, G. *et al.* Identification of core alpha 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster*: Potential basis of the neural anti-horseradish peroxidase epitope. **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 276, p. 28058-28067, nov. 2001.

FELÍCIO, R.; LEANDRINI, A. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 64, p. 39-42, mar. 2012.

FERNANDEZ-ROJAS, B., HERNANDEZ-JUAREZ, J., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **J. Funct. Foods**, Wageningen, v. 11, p. 375–392, mar. 2014

FIGUEIREDO, J. G. *et al.* Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: involvement of nitric oxide. **Pharmacol Biochem.**, [S.l.], v. 96, p. 371–377, jun. 2010.

FRANCESCHINI, I. M. *et al.* **Algas**: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FRANK, G. *et al.* The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. **Hoppe Seylers Physiol. Chem.**, [S.l.], v. 359, p.1491–1507, abr. 1978.

GABIUS, H. J. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry**, Dublin, v. 243, p. 543–576, jul. 1997.

GALLAND-IRMOULI, A. V. *et al.* Fleurence One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Chromatogr. B**, [S.l.], p.117–123, jun. 2000.

GARENAUX, E. *et al.* Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 346, p. 1093-1104, jul. 2011.

GERALDINO, P. J. L. *et al.* Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) with description of *H. caespitosa*. **Journal of phycology**, [S.l.], v. 46, p. 336- 345, ago. 2010.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

GLAZER A.N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], p. 105–112, out. 1994.

GOUET, P. E.; COURCELLE, D.I.; STUART, F. M. ESPript Analysis of multiple sequence alignments in PostScript, **Bioinformatics** 15, [S.l.], p. 305- 308, abr. 1999.

GRANHAM, L. E.; GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education, 2009.

GROSSMAN, A. R. *et al.* The Phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 57, p. 725–749, set. 1993.

GU, D. *et al.* Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography. **J. Chromatogr. B**, [S.l.], v. 1087-1088, p. 138- 141, jun. 2018.

GURGEL, C. F. D.; LOPEZ-BAUTISTA, J. Red Algae. **Encyclopedia of life sciences**, [S.l.], p. 1-5, 2007.

GUZMAN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J. M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v. 15, p. 224–230, mai. 2001.

HACKETT, J. D., *et al.* Phylogenetic analysis supports the monophyly of cryophytes and haptophytes and the association of *Rhizaria* with chromalveolates. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1702-1713, ago. 2007.

HAMSHOU, M. *et al.* GalNAc/Gal-binding *Rhizoctonia solani* Agglutinin has antiproliferative activity in *Drosophila melanogaster* S2 cells via MAPK and JAK/STAT signaling. **PLoS One**, [S.l.], v. 7, p. 1-10, abr. 2012.

HANGAM, R. *et al.* C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**. [S.l.], v. 1402, p. 62–272, fev. 2013.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD R. J. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. **Journal Phycology**, [S.l.], v. 47, p. 218–232, abr. 2011.

HAYEE-MEMO, A.; SHAMEEL, M. A taxonomic study of some red algae commonly growing on the coast of Karachi. **Journal Mar. Sci.**, [S.l.], v. 5, p. 113-137, nov. 1996.

HEIMANN, K.; HUERLIMANN, R. **Handbook of Marine Microalgae**. Amsterdam: Elsevier, 2015.

HILDITCH, C. M. *et al.* Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanizomenon halophytica*. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], v. 3, 345- 354, 1991.

HIRATA, R.; DIAS, S. S.; ROSA, A. R. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. **Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, p. 97-102, 2002.

HORI, K. *et al.* Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. **Glycobiology**, Oxford, v. 17, p; 479- 491, jan. 2007.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYASAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from marine red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1474, p. 226-236, abr. 2000.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 204-205, p. 561-566, jun. 1990.

HWANG, H. *et al.* Functional Expression and Characterization of the Recombinant N-Acetyl-Glucosamine/N-AcetylGalactosamine-Specific Marine Algal Lectin BPL3. **Marine drugs**, Switzerland, v. 16, p. 1-16, nov. 2018.

- JIANG, L. *et al.* Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. **J Cancer**, [S.l.], v. 8, p. 3416-3429, set. 2017.
- KILPATRICK, N. C. **Handbook of animal lectins, properties and biomedical applications**. 1 ed. Enddiburg: Britsh Library, 2000.
- KIM, B. K.; FUGITA, Y. Nucleotide sequence analysis of the phycoerythrin encoding genes in *Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). **Phycological Research**, [S.l.], v. 45(4), p. 217-224, fev. 1997.
- KIM, G. H. *et al.* Purification ad characterization of a lectin Bryohealin, involved in the protoplast formation of marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, [S.l.], v. 42, p. 86-95, jun. 2005.
- KIM, S. H.; KIM, G. H. Cell-cell recognition during fertilization in the red alga *Aglaothamnio oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 399, p. 81-89, mar. 1999.
- KIM, S. K. **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology**. 1 ed. Nova Jersey: Wiley Blackwell, 2011.
- KIM, Y. *et al.* Photosynthetic functions of Synechococcus in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. **Plos One**, [S.l.], p. 1-14, jan. 2018.
- KNOWLES, B. H.; KNIGHT, P. J. K.; ELLAR, D. J. *N*-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Proc. R. Soc. Lond.**, Londres, v. 245, p-31-35, jul. 1991.
- KNOWLES, B. H.; THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. **Febers Letters**, Amsterdam, v. 68, p. 197- 202, mar. 1984.
- KOMATH, S. S.; KAVITHA, M; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: New directions in plant lectin research. **Org. Biomol. Chem.**, [S.l.], v. 4, p. 973–988, mar. 2006.
- KRAUSE, C. *et al.* Temporal relations between defoliation causedby spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clem.) and growth of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.). **Dendrochronologia**, Switzerland, v. 21, p. 23- 31, out. 2003.
- KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological. Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**, [S.l.], p. 1-9, ago. 2013.
- KUMAR, S.; DOUMANIS, J. The fly caspases. **Cell death and differentiation**, [S.l.], v. 7, p. 1039-1044, nov. 2000.
- KUPKA, M.; SCHEER, H. Unfolding of C-phycoyanin followed by loss of non-covalent chromophore-protein interactions – 1. Equilibrium experiments. **BBA Bioenergetics**, [S.l.], p. 94–103, jan. 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S.l.], v. 227, n. 5259, p. 680, ago. 1970.

LARKUM, A. W. D. Light harvesting systems in algae. Photosynthesis in algae. **Kluwer, Dordrecht**, [S.l.], p. 277–289, fev. 2003.

LEE, J. C. *et al.* Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. **Cancer Cell International**, [S.l.], v. 13, p. 55, out. 2013.

LEITE, Y. F. M. M. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, Frankfurt, v. 1724, p. 137-145, jun. 2005.

LI, W. *et al.* Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications and prospects. **Biotechnology advances**, [S.l.], v. 37, p. 340-353, mar. 2019.

LIANG, J. *et al.* Study on photoactivatable toxicity of phycobiliprotein from *Microcystis aeruginosa* as potential photoinsecticide. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], v. 28, p. 2387–2396, nov. 2016.

LIANG, L. *et al.* Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. **Journal of Cancer**, [S.l.], v. 8, p. 3416- 3429, dez. 2017.

LIMA, M. E. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 53, p. 6414–6419, ago. 2005.

LOSSIO, C. F. *et al.* Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 105, jul. 2017.

LUSVARGHII, S.; BEWLEY, C. A. Griffthsin: An antiviral Lectin with Outstanding Therapeutic Potencial. **Viruses**, Switzerland, v. 24, out. 2016.

MALONE, L. A.; BARRATT, B. I. P.; GATEHOUSE, A. M. R. Beyond Bt: Alternative Strategies for Insect-Resistant Genetically Modified Crops. **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops**, [S.l.], p.357-417, ago. 2008.

MARSAC, N. T. Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. **Photosynthesis Research**, [S.l.], v. 76, p. 197–205, dez. 2003.

MARTINS, A. P. *et al.* Biotechnological potential of benthic marine algae collected along the Brazilian coast. **Algae research**, [S.l.], v. 33, p. 316-327, jul. 2018.

MAZHAR, F. *et al.* Some biological studies on *Hypnea pannosa*. **J. Ag. Afr. J. Biotechnol.**, [S.l.], v. 10, p. 13313-13317, out. 2011.

MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R. V.; CALVETE, J. J. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the hemagglutinins from red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B.*

Triquetrum from the caribbean sea. **European Journal of Phycology**, [S.l.], v. 42, p. 105-112, set. 2007.

MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 45, jan. 2007.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [S.l.], v. 54, p. 209-215, abr. 2004.

MILHOME, M. A. L. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Eng Sanit Ambient.**, [S.l.], v.14, p. 363-372, mar. 2009.

MOHAMED, S.; HASHIM S. N.; ABDUL, H. Rahman seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 23, p. 83-96, mai. 2012.

MOLCHANOVA, V. *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta). **Botanica Marina**, [S.l.], v. 53, jan. 2009.

MONTGOMERY, B. L.; CASEY, E. S.; GROSSMAN, A. R.; KEHOE, D. M. AplA, a Member of a New Class of Phycobiliproteins Lacking a Traditional Role in Photosynthetic Light Harvesting. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], p. 7420–7428, nov. 2004.

MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, [S.l.], 59: 783–787, nov. 1977.

MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v.280, p. 9345-9353, nov. 2005.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and Protease Inhibitors as Plant Defenses against Insects. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 50, p. 6605–6611, mar. 2002.

NAGANO, C. S. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red algae *Hypnea musciformis*. **Acta Crystallographica Section**, [S.l.], v. 61, p. 997-999, jul. 2005a.

NAGANO, C.S. *et al.* HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, [S.l.], v.14, p.2167–2176, mar. 2005b.

NASCIMENTO, A. S. *et al.* Algal lectin binding to core (α 1-6) fucosylated N-glycans: structural basis for specificity and production of recombinant protein. **Glycobiology**, Oxford, v. 25, p. 607- 616, nov. 2015.

- NASCIMENTO, K.S, *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **J. Agardh Biochemistry Cellular Biology.**, [S.l.], v. 84, p. 49–54, jul. 2006.
- NASELLI-FLORES, L.; BARONE, R. Green Algae. **Encyclopedia of Inland Waters**, [S.l.], p. 166-173, ago. 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2009.
- NOBRE, C. A. S. **Isolamento, purificação e caracterização parcial da estrutura primária de uma ficobiliproteína da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (wulfen) lamouroux**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- OGAWA, T. *et al.* Diversified Carbohydrate- Binding Lectins from Marine Resources. **Research Journal of Amino Acids**, [S.l.], p. 1-20, ago. 2011.
- OKAJIMA, T.; XU, A.; IRVINE, K. D. Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. **J. Biol. Chem.**, [S.l.], v. 278, p. 42340–42345, ago. 2003.
- OKUYAMA, S. *et al.* Strict Binding specificity of small-sized Lectins from red alga *Hypnea japonica* for core (α 1-6) Fucosylated N-glycans. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S.l.], v. 73, p. 912- 920, dez. 2008.
- OLIVEIRA, S. R. M. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmel) Santel e Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, p. 397-403, dez. 2002.
- OVERKAMP, K. E., *et al.* Insights into the Biosynthesis and Assembly of Cryptophycean Phycobiliproteins. **J Biol Chem.**, [S.l.], v. 26, p. 26691-26707, set. 2014.
- PANDEY, G.; FATMA, T.; KOMATH, S. S. Specific Interaction of the Legume Lectins, Concanavalin A and Peanut Agglutinin, with Phycocyanin. **Photochemistry and Photobiology**, [S.l.], v. 85, p. 1126-1133, out. 2009.
- PANGESTUTI, R.; KIM, S.K., Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, Wageningen, p. 255–266, out. 2011.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Flórida: Taylor anf Francis, 2012.
- PATEL, A. *et al.* Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycocyanin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, [S.l.], v. 41, p. 254-257, jul. 2004.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, [S.l.], v. 17, p. 575-692, jun. 1998.

- PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma. **Cells Advances in Pharmacological Sciences**, [S.l.], p.1-6, dez. 2009.
- PITTERA, J. PARTENSKY, F.; SIX, D. Adaptive thermostability of light-harvesting complexes in marine picocyanobacteria. **The ISME Journal**, [S.l.], v. 11, p. 112–124, jan. 2017.
- PRASEPTIANGGA, D.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Novel Lectin from the Green Alga *Codium barbatum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S.l.], v. 76, p. 805–811, dez. 2012.
- PUZORJOV, A.; MCCORMICK, A. J. Phycobiliproteins from extreme environments and their potential applications. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 71, p. 3827-3842, jun. 2020.
- RATHEE; M.; MENRA, S.; DALAL, P. K. Latest trends in zoology and entomology. *In*: RATHEE, M. **New insecticide molecules and their role in Insect**. 1 ed. Delhi: Akinik, 2018. cap. 4.
- RAVI, M. *et al.* Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. **BMC câncer**, [S.l.], v. 15, fev. 2015.
- REDDY, C. R. K.; GUPTA, V.; JHA, B. Developments in Biotechnology of Red Algae. **Red algae in the genomic age**, [S.l.], v. 24, p. 1702–1713, abr. 2010.
- REYES-MONTAÑO, E. A.; VEGA-CASTRO, N. A. Lectins with Insecticidal and Insectistatic Activities. **Agriculture and Toxicology**, [S.l.], p. 1-12, fev. 2018.
- ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 631-639, jan. 2007.
- ROGERS D. J., HORI K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, [S.l.], v. 260, p. 589-593, out. 1993.
- ROMÁN, R.B.; ALVAREZ-PEZ J. M.; FERNANDEZ F.G. A.; GRIMA E. M. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 93, p. 73-85, jan. 2002.
- ROMANO, P. R. *et al.* Development of recombinant *Aleuria aurantia* lectins with altered binding specificities to fucosylated glycans. **Biochem Biophys Res Commun.**, [S.l.], v. 414, p. 84–89, mar. 2011.
- ROMAY, C. *et al.* C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. **Current Protein and Peptide Science**, [S.l.], v. 4, p. 207-216, jun. 2003.

- RONI, M. *et al.* Characterization and biotoxicity of *Hypnea musciformis*-synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 121, p. 31-38, nov. 2015.
- SANG, J. H. *Drosophila melanogaster*: The Fruit Fly. **Encyclopedia of genetics**, New York, v. 1, 157 p., 2001.
- SANTOS, S. *et al.* Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemical. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 183, p. 122-128, set. 2015.
- SATO, Y. *et al.* Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. **Marine drugs**, Switzerland, v. 13, p. 3454-3465, mai. 2015.
- SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 405, p. 291-296, mai. 2011.
- SCHIRMER, T.; BODE, W.; HUBER, R. Refined Three-dimensional Structures of Two Cyanobacterial C-phycoyanins at 2.1 and 2.5 Å Resolution, **J. Mol. Biol.**, Cambridge, v. 196, p. 677-695, mar. 1987.
- SCHLUCHTER, W. M.; GLAZER, A. N. Biosynthesis of Phycobiliproteins in Cyanobacteria. **The Phototrophic Prokaryotes**, [S.l.], p. 83-95, 1999.
- SCHMALTZ, R. M. HANSON, S. R.; WONG, C. Enzyme in the synthesis of glycoconjugates. **Chemistry Review**, [S.l.], v. 111, p. 4259-4307, 2011.
- SCHNEIDER, I". Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*". **J. Embryol. Exp. Morphol.**, [S.l.], v. 27, p. 363-365, 1972.
- SCHWIENSTEK, T. *et al.* A serial lectin approach to the mucin-type O-glycoproteome of *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Proteomics**, [S.l.], v. 7, p. 3264- 3277, set. 2007.
- SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, [S.l.], v. 20, p. 113-136, 2008.
- SENTHILKUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **Int J Biol Macromol.**, [S.l.], v. 55, p. 150-160, ago. 2013.
- SEPPO, A.; TIEMEYER, M. Function and structure of *Drosophila* glycans. **Glycobiology**, Oxford, v. 10, p. 751-760, abr. 2000.
- SEPULVEDA-UGARTE, A. J. *et al.* Spectroscopic parameters of phycoerythrobilin and phycourobilin on phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [S.l.], v. 219, p. 211-216, mar. 2011.

SHAHIDI-NOGHABI, S. *et al.* Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. **J. Insect Physiol.**, [S.l.], v. 56, p. 1101–1107, set. 2010.

SHAHIDI-NOGHABI, S.; VAN DAMME, E. J.M.; SMAGGHE, G. Expression of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I') from elderberry bark in transgenic tobacco plants results in enhanced resistance to different insect species. **Transgenic Res.**, [S.l.], v. 18, p. 249–259, abr. 2009.

SHANMUGHAPRIYA, S. *et al.* Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multi resistant pathogens. **Annals of Microbiol.**, [S.l.], v. 58, p. 535-541, set. 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from haemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v. 14, p. 53–62, nov. 2004.

SHEN, Y. *et al.* Toxicity, membrane binding and uptake of the *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin (SSA) in different insect cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [S.l.], v. 53, p. 691–698, nov. 2017.

SIMBIÓTICA. **Filo Phaeophyta**. Lisboa: SIMBIÓTICA, 2020. Disponível em: <http://simbiotica.org/faeofita.htm>. Acesso em: 22 out. 2020.

SMAGGHE, G. *et al.* Effect of plant lectins on growth of insect midgut cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [S.l.], v. 41, mar. 2005.

SMAGGHE, G.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [S.l.], v. 45, p. 93–105, fev. 2009.

SMITH, S.M.; HUBBES, M.; CARROW, J. R. Factors affecting inundative releases of *Trichogramma minutum* Ril. against the spruce budworm. **Journal Appl. Entomol.** [S.l.], v. 101, p. 29–39, jan. 1986.

SONANI, R. R.; RASTOGI, R. P.; MADAMWAR, D. Antioxidant Potential of Phycobiliproteins: Role in Anti-Aging Research. **Biochem Anal Biochem**, [S.l.], v. 4, abr. 2015.

SONANI, R. R.; RASTOGI, R. P.; PATEL, R.; MADAMWAR, D. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. **World J. Biol. Chem.**, [S.l.], v. 26, p. 100-109, 2016.

SONI, B.; VISAVADIYA, N. P.; MADAMWAR, D. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. **British Journal of Nutrition**, Londres, v. 102, p. 102–109, mar. 2009.

SOUSA, A. A. S. **Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (turner) lamouroux**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Fisiológicas) – Faculdade de Biologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

SOUSA, I. *et al.* Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 20, p. 44-52, jan. 2006.

STANIC-VUCINIC, D., *et al.* Spirulina Phycobiliproteins as Food Components and Complements. **Microalgal Biotechnology**, Wageningen. 129 -149, jun. 2018.

STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein Glycosylation in cancer. **Annual Review of pathology: mechanisms of disease**, [S.l.], v. 10, p. 473-510, jan. 2015.

TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions. **Marine drugs**, Switzerland, v. 9, p. 1101-1118, jun. 2011.

TANIGUCHI, N.; KIZUKA, Y. Glycans and cancer: role of *N*-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. **Adv Cancer Res.**, [S.l.], v. 126, p.11-51, fev. 2015.

TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. **Introduction to Glycobiology**. 3 ed. Oxford: Press, 2009.

THANGAM, R. *et al.* C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 1402, p. 62–272, set. 2013.

TIAN, E.; HAGEN, K. G. T. Recent insights into the biological roles of mucin-type Oglycosylation. **Glycoconjugate Journal**, [S.l.], v. 26, p. 325-334, mar. 2009.

TOSH, C. Agriculture and insects. **Ecologist informed by nature. London**, v. 1, 2019. Disponível em: <https://theecologist.org/2019/may/01/agriculture-and-insects>. Acesso em: 13 mai. 2019.

TRAMPER J. *et al.* What to do in marine biotechnology. **Biomolecular Engineering**, Wageningen, v. 20, p. 467-471, jul. 2003.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H.M. **Algae: An introduction to phycology**. 1 ed. Cambridge: University Press, 1995.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochem. Soc. Trans.**, [S.l.], v. 36, p. 221–247, fev. 2018.

VANDENBORRE, G. *et al.* Diversity in protein glycosylation among insect species. **PLoS One**, [S.l.], v. 6, fev. 2011.

VANDENBORRE, G., VAN DAMME, E.J.M., SMAGGHE, G. *Nicotiana tabacum* agglutinin expression in response to different biotic challengers. **Arthropod Plant Interact**, [S.l.], v. 3, p. 193–202, out. 2009.

WALSKI, T. *et al.* Diversity and functions of protein glycosylation in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 83, p. 21- 34, 2017.

- WANG, G. Isolation and purification of phycoerythrin from red algae *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed- absorption and exchange-chromatography. **Chromatography**, [S.l.], v. 56, p. 509-513, jul. 2002.
- WANG, M. *et al.* Novel fucosylated biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, [S.l.], v. 18, p. 1914–1921, jun. 2009.
- WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M. **Global pesticide resistance in Arthropods**. 1 ed. Oxford: Press, 2008.
- WICKETT, N. J., *et al.* Phylotranscriptomic analysis of the originan dearly diversification of land plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 29, p. 4859-4868, set. 2014.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology Progress, problem and perspectives. **Biochemistry**, [S.l.], v. 78, p. 877-900, 2013.
- WU, M. *et al.* A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food chemistry**, [S.l.], v. 201, p. 7-13, jun. 2016.
- WU, Q. *et al.* The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. **Arch. Toxicol.**, [S.l.], v. 90, p. 1817–1840, mar. 2016.
- YAMAMOTO-HINO, M. *et al.* Structure, function and formation of glycans in *Drosophila*. **Nova Science Publishers, Inc.**, [S.l.], p 165-188. 2012.
- YANG, X. *et al.* Phytochemical and Biological Studies of Abies Species. **Chemistry & Biodiversity**, Switzerland v. 5, p. 56-80, ago. 2008.
- YOON, H. S.; ZUCCARELLO, G. C. Evolutionary History and Taxonomy of Red Algae. **Red Algae in the Genomic Age**, [S.l.], p. 25-42, out. 2010.
- ZHAO, M. *et al.* The 42.1 and 53.7 kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 60, p. 405– 411, ago. 2013.