

**ATIVIDADE BIOLÓGICA, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA E TOXINA DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea* J. Agardh**

MARIA EDNA PEREIRA LIMA

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM BIOQUÍMICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA – CE
MARÇO - 2003**

Tese de doutorado apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se á disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

Maria Edna Péreira Lima

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

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

Dr. Renato de Azevedo Moreira
Conselheiro
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará

Dr. Genário Sobreira Santiago
Conselheiro
Faculdade de Veterinária
Universidade Estadual do Ceará

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

Dr. André Newton do Monte Negreiros
Conselheiro
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

A Deus

A minha mãe e a memória de meu pai,
criaturas amadas e decisivas em minha vida

Ao Paulo, meu amado companheiro de todas as horas.

Aos meus filhos, razões da minha felicidade.

Aos meus irmãos com carinho.

A todos, o meu sonho de um mundo mais justo e humano.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À professora Norma Maria Barros Benevides que além de orientadora, também uma grande amiga que esteve sempre a minha disposição quando necessitei, o meu muito obrigada por tudo.

Ao prof. Renato de Azevedo Moreira pela compreensão e grande ajuda.

A todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

Aos amigos do laboratório de algas marinhas: Noélia, Edna Nascimento, Luana, Yáskara, Rodrigo, Maria, Márjory, Stélio, Cristiane pela amizade e apoio.

As amigas Eveline Forte e Creusa Oliveira pela amizade e compreensão.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por oferecer este curso.

A secretaria de Educação do Estado do Ceará (SEDUC), na pessoa do Secretário de Educação, pela liberação concedida.

Ao Prof. Benildo Sousa Cavada pela excelente acolhida durante a realização de alguns trabalhos em seu laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

A todos os bolsistas do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial: Niedja, Elisangêla, Daniele, Fernanda, Silvinha e Batista pela amizade e sempre muita ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela amizade e cooperação.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	x
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xiii
<u>RESUMO</u>	xiv
<u>ABSTRACT</u>	xv
1- <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1- ALGAS MARINHAS	2
1.1.1- Considerações Gerais	2
1.1.2- Importância Econômica	3
1.1.3- Atividades Biológicas	6
1.2- LECTINAS	9
1.2.1- Considerações Gerais	9
1.2.2- Lectinas em Algas Marinhas	11
1.2.2.1- <u>Ocorrência</u>	11
1.2.2.2- <u>Isolamento e Purificação</u>	13
1.2.2.3- <u>Características Físico-Químicas</u>	15
1.2.2.4- <u>Propriedades Biológicas</u>	17
1.3- SUBSTÂNCIAS TÓXICAS E/OU ANTINUTRICIONAIS EM PLANTAS	20
1.3.1- Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)	22
1.3.2- Inibidores de Proteases	25
1.3.3- Toxinas	27
1.3.4- Toxinas de Algas	29
1.4 – CARRAPATOS <i>Boophilus microplus</i>	31
2- <u>OBJETIVOS</u>	33
2.1- GERAL	34
2.2- ESPECÍFICOS	34
3- <u>MATERIAIS</u>	35
3.1- ALGA MARINHA	36

3.2- CÉLULAS SANGÜÍNEAS	36
3.3- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	36
3.4- CARRAPATOS <i>Boophilus microplus</i>	37
3.5- REAGENTES	37
4- MÉTODOS	38
4.1- TRATAMENTO DAS ALGAS MARINHAS	39
4.2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ALGA MARINHA VERMELHA <i>Gracilaria</i> <i>cornea</i>	39
4.2.1- Determinação de Umidade	39
4.2.2- Determinação de Cinzas	39
4.2.3- Determinação de Nitrogênio Total	40
4.2.4- Determinação de Lipídios Totais	41
4.2.5- Determinação de Fibras	41
4.2.6- Determinação de Cálcio	42
4.2.7- Determinação de Fósforo	43
4.2.8- Determinação de Ferro	44
4.2.9- Determinação de Magnésio	44
4.2.10- Determinação de Vitamina C	45
4.2.11- Determinação do Valor Calórico Total	46
4.3- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA ALGA MARINHA	46
4.3.1- Preparação do Extrato Total	46
4.4- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	48
4.5 – DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS	48
4.6 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	48
4.7 – DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE SANGÜÍNEA	49
4.8 – ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	49
4.9 – EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	50
4.10 – TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	50
4.11 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA	51
4.12- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE TÓXICA	52

4.13- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE UREÁSICA	52
4.14- CROMATOGRAFIAS	53
4.14.1- Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B	53
4.14.2- Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100	53
4.15- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS E β -MERCAPTOETANOL	54
4.16- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	55
4.17- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO EXTRATO BRUTO, TOXINA E LECTINA DA ALGA <i>G. CORNEA</i> SOBRE O CICLO EVOLUTIVO DO CARRAPATO BOVINO <i>B. microplus</i>	56
4.18- ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	60
5.1- CARACTERIZAÇÃO DA ALGA MARINHA VERMELHA <i>Gracilaria cornea</i>	61
5.2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA	61
5.3- DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE SANGUÍNEA	64
5.5- DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	64
5.6- EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	67
5.7- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	68
5.8- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA	68
5.9- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE TÓXICA	72
5.10- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE UREÁSICA	72
5.11 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS (LECTINA E TOXINA)	72
5.11.1 -Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B	74
5.11.2 - Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 do PI -HIC	74

5.11.3 - Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 do PII -HIC	77
5.12- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LECTINA E DA TOXINA POR FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100	77
5.13- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LECTINA E DA TOXINA POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS E β -MERCAPTOETANOL	83
5.14- DETERMINAÇÃO DO PI DA LECTINA DE <i>G. cornea</i>	86
5.15- DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS DA TOXINA E DA LECTINA	88
5.16- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO EXTRATO BRUTO, DA TOXINA E LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA <i>Gracilaria cornea</i> SOBRE O CICLO EVOLUTIVO DO CARRAPATO BOVINO <i>B. microphilus</i>	88
6. <u>CONCLUSÕES</u>	96
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	98
8. <u>ANEXOS</u>	

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01 - Esquema de purificação das proteínas (lectina e toxina) da alga marinha vermelha <i>Gracilaria cornea</i> .	47
FIGURA 02 - Avaliação da atividade tóxica do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. Cornea</i> sobre o ciclo evolutivo do carrapato bovino <i>B. Microplus</i>	58
FIGURA 03 : Alga marinha vermelha <i>Gracilaria cornea</i> (J. Agardh).	62
FIGURA 04 - Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante presente no extrato concentrado de <i>Gracilaria cornea</i>	69
FIGURA 05 – Gráfico de $\ln A/A_0$ versus tempo de aquecimento da lectina de <i>G. cornea</i> na temperatura de 40°C.	70
FIGURA 06 - Convulsão e morte de camundongos causadas pela toxina de <i>Gracilaria cornea</i> .	71
FIGURA 07 - Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B do extrato bruto concentrado da alga <i>Gracilaria cornea</i> .	75
FIGURA 08 – Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PI da HIC.	76
FIGURA 09 – Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PII da HIC.	79
FIGURA 10 - Massa molecular da lectina da alga marinha <i>Gracilaria cornea</i> por filtração em gel de Sephadex G-100.	81
FIGURA 11 - Massa molecular da toxina da alga marinha <i>Gracilaria cornea</i> por filtração em gel de Sephadex G-100	82
FIGURA 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da fração contendo atividade hemaglutinante obtida por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100.	84

FIGURA 13- Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da fração contendo atividade tóxica obtida por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100.	85
FIGURA 14- Ponto isoelétrico da lectina de <i>G. cornea</i> por Eletroforese Bidimensional.	87
FIGURA 15- Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. cornea</i> sobre os pesos das teleóginas, quenóginas e da massa total de ovos de <i>B. microplus</i> .	91
FIGURA 16- Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. cornea</i> sobre os períodos de postura das teleóginas e períodos de incubação e eclosão dos ovos de <i>B. microplus</i>	92
FIGURA 17- Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. cornea</i> sobre a percentagem de eclosão dos ovos e das eficiências reprodutiva e nutricional de <i>B. microplus</i>	93
FIGURA 18- Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. cornea</i> sobre os períodos de sobrevivência e mortalidade das larvas de <i>B. microplus</i>	94

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 – Principais usos de colóides extraídos de algas marinhas.	5
TABELA 02 - Análise elementar da alga marinha vermelha <i>G. cornea</i> .	63
TABELA 03 - Especificidade da atividade aglutinante do extrato total concentrado da alga marinha <i>G. cornea</i> .	65
TABELA 04 - Inibição da atividade hemaglutinante no extrato concentrado da alga marinha <i>Gracilaria cornea</i> por açúcares simples e glicoproteínas	66
TABELA 05 - Efeito da temperatura sobre a atividade tóxica presente no extrato bruto concentrado da alga marinha vermelha <i>G. cornea</i> .	73
TABELA 06 – Purificação da toxina de <i>Gracilaria cornea</i>	78
TABELA 07 – Purificação da lectina de <i>Gracilaria cornea</i>	80
TABELA 08 - Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos do extrato bruto, toxina e lectina da alga <i>G. cornea</i> sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo I do carrapato bovino <i>B. microplus</i> .	95

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BSA	Albumina Sérica Bovina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletileno de amina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
DL ₅₀	Dose mínima capaz de matar 50% dos animais testados
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes
UH/ml	Unidade de hemaglutinação por ml, definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%
GML	Procedimento do Programa SAS que tem por objetivo a criação e análise de um modelo linear geral (General Linear Model – GLM)
kDa	Quilodaltons (unidade de medição de massa molecular)
SAS	Statistical Analysis System
PT	Peso da teleógina
PQ	Peso da quenógina
PMTO	Peso da massa total dos ovos
PPT	Período de postura da teleógina
PI	Período de incubação dos ovos
PE	Período de eclosão dos ovos
%E	Porcentagem de eclosão dos ovos
IER	Índice (em percentual) da eficiência reprodutiva da teleógina
IEN	Índice (em percentual) da eficiência nutricional da teleógina
PS	Período de sobrevivência larval
PM	Período de mortalidade larval

RESUMO

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foi analisada quanto à sua composição química, apresentando, elevados teores de carboidratos, magnésio e fósforo. O extrato bruto da alga aglutinou preferencialmente eritrócitos de galinha tratados com tripsina e mostrou-se tóxico para camundongos dentro de um período de 24 horas por injeção intraperitoneal (DL50 104mg/kg de peso corpóreo do animal). O tratamento térmico do extrato bruto aboliu completamente a atividade hemaglutinante a 50°C por 5 minutos e a atividade tóxica a 60°C por 5 minutos. O procedimento de purificação da toxina e da lectina foi conduzido por aplicação do extrato bruto em cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Sepharose CL-4B seguido por cromatografia de filtração em gel de Sephadex G-100. A toxina em estudo é uma glicoproteína que apresenta 36,8% de carboidratos na sua estrutura, sendo considerada uma proteína dimérica com massa molecular aparente de 71,56 kDa por filtração em gel de Sephadex G-100 e apresentando uma banda de massa molecular de 35,0 kDa sob condições desnaturantes por PAGE-SDS em presença de β -mercaptoetanol. A lectina também é uma glicoproteína apresentando 52,30% de carboidratos, sendo considerada uma proteína monomérica com massa molecular aparente de 56,4Kda por filtração em gel de Sephadex G-100 e 66,0 kDa em condições desnaturantes em presença de β -mercaptoetanol. A toxina é ativa para camundongos (DL50 5,18mg/kg de peso corpóreo do animal) produzindo convulsões tônico-clônicas e paralisia facial que antecedem a morte do animal. As avaliações preliminares de atividade tóxica do extrato total, da toxina e lectina sobre o ciclo de vida do carrapato bovino *B. microplus* demonstraram que estas frações protéicas afetaram algumas fases do ciclo de vida desse ectoparasita, sendo mais acentuados os efeitos tóxicos produzidos pelo extrato bruto e lectina.

ABSTRACT

The red marine alga *Gracilaria cornea* was analyzed in related to its chemical composition, showing predominance in the carbohydrate, magnesium and phosphorus. The crude extract of the alga agglutinated preferentially chicken erythrocytes treated with trypsin and it showed to be toxic to mice within 24 hours upon intraperitoneal injection (LD 50 104.0 mg/kg body weight). Thermal treatment of the crude extract to 50°C for 5 minutes completely inactivated the haemagglutinating activity and to 60°C for 5 minutes the toxic activity. The purification procedure of the toxin and of the lectin was realized by application of the crude extract in hydrophobic interaction chromatography on column of Phenyl-Sepharose CL-4B followed by gel filtration on Sephadex G-100 column. The carbohydrate content of 36.8% suggests that the toxin is a glycoprotein. It showed an molecular mass 71.56 kDa by gel filtration on Sephadex G-100 column and an molecular mass of 35 kDa by SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoetanol. The lectin exhibited a single proteic band with apparent molecular mass of 56.4 kDa and under desnaturant conditions (SDS-PAGE in the presence de β -mercaptoetanol) also exhibited a single proteic band with molecular mass of 66.0 kDa. Its carbohydrate content of 52.30% suggests that this protein is also a glycoprotein. The toxin is active for mice (LD 50 5.18mg/kg body weight) producing dyspnea, tonic-clônics convulsions and flaccid paralysis prior to death of the animal. The preliminary evaluations of the crude extract, lectin and toxin in the control on the tick *B. microplus* demonstrated that these proteics fractions affected the evolutionary cycle of the ectoparasite. The toxic effects of the crude extract and lectin were shown to be more intense than those of the toxin.

1. INTRODUÇÃO

1.1- ALGAS MARINHAS

1.1.1- Considerações Gerais

As algas são talófitas (plantas sem raízes, caules e folhas) que têm a clorofila *a* como seu pigmento fotossintético principal (LEE, 1997). Em relação ao habitat, as algas são predominantemente aquáticas, sendo encontradas no mar, em águas estuárias, dulcícolas e em superfícies úmidas. Sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas afins (RAVEN *et al.*, 1996).

Em muitos ecossistemas aquáticos, as algas atuam como produtores primários na cadeia alimentar, sintetizando material orgânico a partir de dióxido de carbono e água e também o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (LEE, 1997).

Embora pertencendo a vários grupos taxonômicos, as algas podem ser grosseiramente separadas pelo tamanho em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas) e as algas macroscópicas (macroalgas), com dimensões que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DA AQUICULTURA, maio/junho, 1997).

As algas marinhas, historicamente, vêm sendo denominadas de vegetais inferiores, devido a sua simplicidade de organização, quando comparadas a outros grupos de plantas, principalmente as vasculares (RAVEN *et al.*, 1996).

As algas macroscópicas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: **Chlorophyta** (algas verdes), **Phaeophyta** (algas pardas) e **Rhodophyta** (algas vermelhas) (RAVEN *et al.*, 1996).

Segundo ROUND (1983), evolutivamente, as algas marinhas, por apresentarem um histórico fóssil muito extenso, são consideradas como um grupo a partir do qual todos os outros vegetais fotossintetizantes mais

complexos, Criptógamas e, mais recentemente, Fanerógamas, se originaram. Apesar da sua variedade nos aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos, seus mecanismos básicos e vias metabólicas parecem ser similares aos demais vegetais.

Reconhecidamente, as algas marinhas representam um dos maiores biorecursos, existindo aproximadamente 150.000 espécies, dentre as quais mais de 30.000 se encontram taxonomicamente classificadas (HARVEY, 1988).

1.1.2- Importância Econômica

O valor de algas marinhas para o ambiente marinho é igualado apenas ao seu valor para a sociedade, pelo fato de elas oferecerem um amplo espectro de produtos e benefícios, com aplicações na nutrição, fertilização, cosmética, farmacologia, processamento de alimentos e biotecnologia (MORANO *et al.*, 1991; BLUNDEN, 1991).

Em virtude da persistência e toxicidade ambiental da maioria dos pesticidas sintéticos, vem sendo observado um maior interesse por compostos naturais nas aplicações agroquímicas. As algas marinhas, além de reguladoras do crescimento de plantas, são também utilizadas para aumentar o rendimento da colheita, reduzir a perda de frutos armazenados, melhorar a absorção dos nutrientes e tornar saudável a pastagem do gado através de sua aplicação no tratamento do solo (HARVEY, 1988).

As algas marinhas macroscópicas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar. No entanto, além de seu uso como alimento, as algas têm sido utilizadas como complemento de rações, adubos sólidos ou líquidos e como fontes de produtos químicos diversos, dentre os quais se destacam certas mucilagens conhecidas como ficocolóides, ou colóides de algas. Estas últimas substâncias são classificadas em três grupos básicos em função de sua estrutura química e propriedades reológicas: os ágaros (ágar-ágar) ou agaranas, as carragenanas, e os alginatos.

Na **TABELA 1** são apresentados os usos desses principais ficocolóides (PANORAMA DA AQUICULTURA, maio/junho, 1997).

Em países ocidentais, algas marinhas são utilizadas pela indústria de colóides como fontes de gelantes, espessantes ou aditivos estabilizantes para alimentos (MABEAU *et al.*, 1992).

As algas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar. Em alguns países ocidentais, as algas já são consumidas regularmente como alimento, como é o caso do Chile, onde algumas espécies são encontradas à venda em feiras e mercados (PANORAMA DA AQUICULTURA, maio/junho, 1997).

A população mundial, de acordo com dados estatísticos da ONU (União das Nações Unidas), deverá ultrapassar os seis bilhões de habitantes. Em contraste, o aumento na produção de grãos, que foi de 3% por ano entre 1950 e 1984, tem sido menor que 1% nos últimos anos. Assim, fontes alternativas de alimentos deverão ser usadas para a obtenção de nutrientes para seres humanos e animais domésticos (PIMENTEL *et al.*, 1997)

Algas marinhas podem ser consideradas como uma fonte potencial de nutrientes, visto que elas usualmente contêm grandes quantidades de proteínas e carboidratos (MABEAU *et al.*, 1992; BENEVIDES *et al.*, 1998a; RAMOS *et al.*, 1998). Além disso, elas têm altos teores de iodo, justificando a baixa incidência de hipotireoidismo e bócio nas populações da costa asiática (YAMAGATA & YAMAGATA, 1972; ARASAKI & ARASAKI, 1983). Além disso, algumas algas contêm quantidades significantes de vitaminas A, B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), C e, especialmente, B₁₂ (ERICSON & LEWIS, 1953; CHAPMAN, 1970; DARCY-VRYLLON, 1993; PEREIRA, 2000). Algumas algas marinhas apresentam na sua composição de aminoácidos altos teores de arginina e grandes quantidades de aminoácidos não essenciais, tais como, aspártico, glutâmico, glicina e alanina (MABEAU *et al.*, 1992).

Ao estudarem algas marinhas pertencentes às famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hipneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae, com relação aos seus constituintes elementares, BENEVIDES *et al.*, (1998^a) verificaram que as espécies, *Enantiocladia duperreyi*, *Amansia multifida*, *Hypnea musciformis*,

TABELA 1 – Principais usos de colóides extraídos de algas marinhas.

	Ágar	Carragenana	Alginatos
Microbiologia (meio de cultura)	X		
Indústria alimentícia (gelatina)	X	X	
Indústria têxtil (seda, voil, tule rayon)		X	X
Revestimento filamentosos (tungstênio)		X	
Indústria fotográfica		X	
Couros finos		X	X
Adesivos especiais	X	X	
Espessante de molhos e sopas		X	X
Estabilizante anti-preteamento de alimentos	X		
Geléias	X	X	
Laxantes	X		
Suspensor (chocolate e antibióticos)		X	X
Emulsificantes		X	X
Cosmética (creme e sabão)		X	X
Cervejaria (clarificante, espuma)	X	X	
Vinho (clarificante)	X		
Inseticidas		X	X
Linóleo, couro e sedas artificiais		X	X
Polimento (suspensor)			X
Indústria de papéis	X	X	X
Sorvetes			X
Indústria de tintas			X
Encapsulação (biotecnologia e medicina)			X
Eletroforese (agarose)	X		
Indústria de laticínios		X	
Revestimento de eletrodos			X
Indústria de borracha			X
Medicina (sutura)			X

Tabela adaptada do Panorama da Aqüicultura (maio/junho, 1997)

Solieria filiformis e *Bryothamnion seaforthii* apresentaram níveis protéicos que variaram de 21,8% a 37,2%.

A composição de aminoácidos de algumas espécies de algas marinhas nativas da costa nordeste do Brasil foi avaliada por RAMOS *et al.* (1998). Os autores verificaram que a alga vermelha *Amansia multifida* é rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobre em metionina e cisteína, e que a alga verde *Caulerpa sertularioides* apresenta grande conteúdo de leucina e de alanina, mas baixos níveis de aminoácidos sulfurados.

RAMOS *et al.* (2000), ao estudarem o conteúdo de proteínas e seus aminoácidos constituintes em quatorze espécies de algas marinhas do nordeste do Brasil, observaram grande variação no conteúdo protéico entre as espécies analisadas, variando de 2,3% (*Corallina officinallis*) a 25,6% (*Amansia multifida*). As espécies *Amansia multifida*, *Caulerpa sertularioides*, *Enantiocladia duperreyi*, *Solieria filiformis* e *Vidalia obtusiloba* apresentaram níveis protéicos (acima de 18%) comparáveis aos de algumas sementes de leguminosas. Elas apresentaram altos teores dos aminoácidos aspártico/asparigina, glutâmico/glutamina, fenilalanina, tirosina e treonina e quantidade moderada do resíduo do aminoácido essencial metionina.

1.1.3- Atividades Biológicas

Os registros do uso de substâncias provenientes de organismos marinhos e o conhecimento de suas propriedades datam de tempos remotos. Os povos da Índia já utilizavam estas substâncias com finalidades terapêuticas e selecionavam as espécies tóxicas. Há pelo menos mil anos atrás os chineses já empregavam o extrato da alga *Laminaria japonicum* como condimento para incrementar o sabor e o aroma de certos alimentos. Mais tarde, o agente responsável por estas propriedades foi identificado como sendo o ácido glutâmico, que também é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central (BASLOW, 1969).

Através do aprimoramento dos métodos de "screening" farmacológico, o papel dos produtos naturais na descoberta de novas drogas tem aumentado nos últimos anos. Tal fato pode ser observado principalmente quando se trata de produtos naturais marinhos, os quais mostram uma interessante diversidade de estruturas químicas novas com potentes atividades biológicas (KÖNIG & WRIGHT, 1996).

WIEMER *et al.* (1991) testaram o extrato bruto da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* e verificaram uma potente inibição *in vitro* da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) de abelha. Através de uma posterior purificação e análise química isolaram duas substâncias que foram identificadas como vidalous A e B. Tais substâncias provocavam uma redução significativa de edema quando aplicadas topicamente após um agente indutor de inflamação e, em testes *in vitro*, inibiram 96% da atividade PLA₂ na concentração de 1,6 µg/ml.

Algas marinhas pertencentes a 86 espécies coletadas na Inglaterra, Canadá e Coreia foram estudadas com relação a sua atividade antiviral. Várias concentrações de extratos alcoólicos das algas foram testados contra os vírus do herpes simples tipo 1 (HSV1) e "sindbis" (SINV). Destes, 11 extratos inibiram ambos os vírus e 22 outros foram ativos somente contra um dos vírus, sendo que apenas 2 destes extratos exibiram citotoxicidade nas concentrações testadas (KIM, *et al.*, 1997).

Extratos de 13 espécies de algas marinhas coreanas foram estudados e exibiram atividade antiviral. *Codium fragile* foi ativa contra os vírus do herpes simples (HSV), "sindbis" (SINV) e polio. As espécies *Enteromorpha linza*, *Colpomenia bullosa*, *Scytosiphon lomentaria* e *Undaria pinnatifida* foram ativas contra o HSV e SINV, mas não contra o vírus da polio. As outras 8 espécies foram ativas contra o HSV ou o SINV (HUDSON *et al.*, 1998).

SANTOS *et al.* (1999) estudaram a atividade antiviral de extratos aquosos das algas marinhas *Ulva fasciata*, *Codium decortatum*, *Padina gymnospora*, *Laminaria abyssalis*, *Sargassum vulgare*, *Pterocladia capilacea*, *Hypnea musciformis* e *Vidalia obtusiloba*, coletadas na costa do Brasil, pertencentes às classes Phaeophyceae, Rhodophyceae e Chlorophyceae, contra o HSV1, utilizando uma raça resistente ao acyclovir (análogo da guanósina que tem um notável sucesso no tratamento de infecções pelo vírus do herpes) e

observou que todos os extratos foram capazes de inibir a propagação do vírus em concentrações não tóxicas de células HEp-2, sendo o extrato de *Laminaria abyssalis* o mais potente inibidor.

Uma atividade anti-HIV é observada em extratos e compostos isolados de algas marinhas e cianobactérias. Estes compostos anti-HIV são também eficientes contra outros retrovírus, como o do herpes simples (HSV), mas a quantidade de atividade antiviral varia com o composto e com o vírus. A maioria dos estudos tem focalizado os homo e heteropolissacarídeos sulfatados. Sulfoglicolipídios, carragenanas, fucoidan, sesquiterpenos, hidroquinonas e outras classes de compostos com atividade anti-HIV isolados de algas têm recebido menor atenção. Observou-se nesses estudos que os homopolissacarídeos são mais potentes que os heteropolissacarídeos e que o grupo sulfato é necessário à presença de atividade anti-HIV (SCHAEFFER & KRYLOV, 2000).

HIQASHI-OKAJ *et al.* (1999) verificaram que a utilização do extrato de *Enteromorpha prolifera*, anterior ao tratamento com um iniciador ou promotor de tumor, produziu uma significativa supressão contra tumorigênese de pele e, a utilização prévia do extrato seguido do tratamento com iniciador e promotor também induziram uma forte supressão contra a tumorigênese de pele. Como um possível princípio ativo para a atividade anticarcinogênica do extrato, foi proposta a ação de um composto relacionado à clorofila, a pheophytina-a, a qual foi recentemente identificada nos extratos dessa alga como uma substância antigenotóxica e que exibiu significativo efeito supressivo no mesmo experimento de tumorigênese.

Em experimentos *in vitro* com a alga marinha vermelha *Marginisporum crassissimum*, HIROISHI *et al.* (2001) observaram que os extratos desta alga inibiram não somente o crescimento de várias linhagens de células tumorais, como as B16-BL6 (células de melanoma em camundongo), JYG-B (células de carcinoma mamário em camundongo) e JPL-1 (células de carcinoma mamário em humanos), mas também a invasão de células B16-BL6 em um sistema de cultura. Em experimentos *in vivo*, a metástase no pulmão de células B16-BL6 inoculadas pela veia da cauda de camundongos B57BL/6J foi inibida pela administração intraperitoneal de extratos da alga. Uma substância

efetiva, inibidora do crescimento de células B16-BL6 *in vitro*, foi parcialmente purificada por cromatografias em colunas de filtração em gel e de interação hidrofóbica e mostrou-se sensível ao tratamento térmico e à ação enzimática da tripsina. A massa molecular da substância foi determinada como sendo maior que 100 kDa.

Os estudos de detecção e isolamento das substâncias ativas presentes em algas marinhas têm se intensificado nos últimos anos, tendo em vista a enorme diversidade destes compostos e sua comprovada aplicabilidade nas mais diferentes áreas da pesquisa científica. O aproveitamento do potencial biotecnológico destes organismos deverá contribuir para uma verdadeira revolução no que se refere à obtenção de substâncias com propriedades farmacológicas e terapêuticas em geral.

1.2- LECTINAS

1.2.1- Considerações Gerais

Lectinas são encontradas em muitos organismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais, embora a observação de sua larga ocorrência em animais superiores somente seria constatada com a descoberta das selectinas (SHARON & LIS, 2001).

Lectinas (do latim, *legere*, selecionar ou escolher) são proteínas que ligam mono ou oligossacarídeos específica e reversivelmente, mas são destituídas de atividade catalítica e, diferentemente dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (SHARON & LIS, 2001).

PEUMANS & VAN DAMME (1995), dividiram as lectinas em três grupos principais, onde: **merolectinas** - são proteínas pequenas que possuem exclusivamente um único domínio ligante a carboidrato e portanto, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um típico exemplo de merolectina já isolada é a lectina quitina-ligante do látex da seringueira

(*Hevea brasiliensis*) (VAN PARIJS *et al.*, 1991); **hololectinas** - são moléculas protéicas que consistem de, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar. Por serem multivalentes, as hololectinas são capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados e, atualmente, representam um dos grupos mais estudados de lectinas; **quimerolectinas** - são proteínas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos, associado(s) a outro domínio distinto bem definido que possui atividade enzimática ou outra biológica qualquer e sua ação independe do domínio ligante a carboidrato. Como exemplos desse grupo, podemos citar as quitinases pertencentes a classe I e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2.

Posteriormente, VAN DAMME *et al.* (1998) sugeriram a inclusão de mais um grupo a esta classificação, o das **superlectinas**, um tipo especial de quimerolectinas. Estas seriam proteínas de natureza quimérica, possuindo, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, que reconhecem diferentes estruturas de açúcares. Um exemplo da ocorrência de superlectina pode ser observado na lectina isolada de tulipa, TxLCI, que consiste de uma molécula que apresenta um domínio ligante a manose e um domínio ligante a N-acetilgalactosamina (GalNAc) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas também podem apresentar características distintas, como é o caso das lectinas de *Abrus precatorius*, abrina (HELLIN, 1991) e de *Ricinus communis*, ricina (STILLMARK, 1888), que apresentam acentuadas atividades tóxicas, promovidas pela inativação dos ribossomos.

As lectinas formam um grupo heterogêneo de proteínas que apresentam grande variedade em tamanho, estrutura e organização molecular, contudo apresentam em comum a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Além disso, muitas delas pertencem a famílias de proteínas distintas com seqüências e características estruturais similares (LIS & SHARON, 1998)

Consideradas como sendo uma classe especial de proteínas bioativas, principalmente devido à sua capacidade de reconhecimento a carboidratos e glicoconjugados, as lectinas, (também conhecidas como

aglutininas ou hemaglutininas), são atualmente tidas como possíveis ferramentas de elucidação da informação biológica contida nos açúcares, tendo em vista seu importante papel no reconhecimento celular (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.2.2- Lectinas em Algas Marinhas

1.2.2.1- Ocorrência

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

O estudo de hemaglutininas em algas marinhas teve sequência quando BLUNDEN & ROGERS (1975) utilizaram 105 extratos salinos, preparados com algas secas e pulverizadas, oriundas da costa da Inglaterra e pertencentes às classes Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae. Foi observado que 18 espécies continham aglutininas que reconheciam, de forma não específica, eritrócitos humanos dos grupos A, B e O. Entretanto, a espécie *Ptilota plumosa* continha uma aglutinina com atividade anti-B.

Devido à fraca aglutinação contra eritrócitos humanos por parte de extratos de algas, ROGERS *et al.* (1980) utilizaram suspensões de eritrócitos a 2% contendo albumina ou pré-tratados com papaína, com o objetivo de expor carboidratos e glicoconjugados presentes na membrana dos eritrócitos, facilitando a aglutinação. Nesse trabalho, 49 espécies de algas marinhas verdes,

vermelhas e pardas foram utilizadas, contudo detectou-se aglutinação somente em 14 extratos. A adição de albumina ou o pré-tratamento com pronase causou incremento na atividade hemaglutinante de todos os extratos, com exceção do da alga *Diapse ptilota*, cuja aglutinação diminuiu quando eritrócitos pré-tratados com papaína foram utilizados.

HORI *et al.* (1981) encontraram atividade hemaglutinante em 14 extratos de algas marinhas, dentre as 53 espécies estudadas. Os autores utilizaram eritrócitos de coelho, cavalo, ovelha, pato, galinha e do sistema humano ABO.

FÁBREGAS *et al.* (1984), FÁBREGAS *et al.* (1985) e MUÑOZ *et al.* (1985) observaram que 100% dos extratos de algas verdes e vermelhas testadas eram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho, enquanto a aglutinação de eritrócitos de outros animais e de hemácias humanas do sistema ABO era mais fraca. Os autores constataram ainda que algumas das espécies de algas estudadas perdiam sua capacidade de hemaglutinação depois de estocadas a -20°C por um período de seis meses.

Estudando a presença de hemaglutininas em 31 espécies de algas marinhas, HORI *et al.* (1988) observaram que quatro algas pardas, quatro algas verdes e 19 algas vermelhas foram capazes de aglutinar pelo menos um tipo de eritrócito, concluindo que as lectinas estão amplamente distribuídas em algas marinhas. Os autores observaram ainda que tais proteínas demonstraram uma preferência por eritrócitos de coelho e de carneiro e que a aglutinação podia ser incrementada através de um pré-tratamento destas células com pronase ou tripsina.

AINOUZ & SAMPAIO (1991), estudando a ocorrência de lectinas em algas marinhas do Nordeste do Brasil, verificaram que os extratos salinos de dez espécies aglutinaram eritrócitos de coelho, enquanto sete, seis e quatro extratos aglutinaram eritrócitos de galinha, boi e carneiro, respectivamente. Uma aglutinação não específica de hemácias humanas foi observada para extratos de duas algas vermelhas (*Gracilaria ferox* e *Hypnea musciformis*) e de uma alga verde (*Caulerpa cupressoides*).

FREITAS *et al.* (1997) estudaram a ocorrência de lectinas em 30 espécies de algas marinhas do litoral do Nordeste brasileiro, utilizando eritrócitos

nativos e enzimaticamente tratados de coelho, galinha, carneiro e humanos. A maioria dos extratos aglutinou pelo menos um dos eritrócitos testados. Eritrócitos de carneiro e de coelho foram os mais satisfatórios para a detecção da presença de lectinas.

Estudos de variação sazonal da atividade hemaglutinante frente a diferentes eritrócitos (coelho, galinha e humano do sistema ABO) e da composição química de *Gracilaria domigensis* e *Gelidium pusillum* foram realizados recentemente e revelaram que a atividade hemaglutinante para *G. domigensis* foi detectada somente no mês de junho, enquanto que para a lectina de *G. pusillum* foi observada durante o período de fevereiro até junho. A composição química dos níveis de cinzas, carboidratos, lipídios e proteínas apresentaram variações específicas ao longo do ano para ambas as espécies analisadas (BENEVIDES *et al.*, 1999).

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

1.2.2.2- Isolamento e Purificação

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

As cromatografias de troca iônica têm se mostrado de grande utilidade no processo de purificação de lectinas de algas, sendo geralmente

utilizadas de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos. A lectina da alga marinha vermelha *Ptilota serrata* foi purificada pela combinação de processos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Bio Gel P-100 (ROGERS *et al.*, 1990).

AINOUZ *et al.* (1995) purificaram as lectinas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum* pela aplicação da fração protéica de ambas em colunas cromatográficas de DEAE-celulose.

A lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi purificada por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose, seguida de procedimento cromatográfico de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B (BENEVIDES *et al.*, 1996).

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

Atualmente, há uma acentuada tendência no uso das cromatografias de afinidade para a purificação de lectinas de algas marinhas, tendo em vista a maior praticidade por estas dispensadas, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato destas apresentarem uma maior segurança na pureza do material obtido.

Lectinas de algas têm sido purificadas pelo uso de cromatografias de afinidade usando o carboidrato ao qual a lectina se liga mais fortemente, acoplado a uma matriz insolúvel, como a Sepharose 6B (ROGERS *et al.*, 1986).

A lectina presente na alga marinha vermelha *Gracilaria bursa-pastoris* foi isolada por cromatografia de afinidade em gel preparado pelo acoplamento de manana de levedura ao "Formyl-Celulofine" (OKAMOTO *et al.*, 1990).

SAMPAIO *et al.* (1998) utilizaram a galactose presente na goma de guar no processo de isolamento da lectina da alga marinha vermelha *Ptilota filicina*.

BENEVIDES *et al.* (1998a) usaram a α -lactose e COSTA *et al.* (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento de lectinas presentes nas algas marinhas vermelhas *Enantiocladia duperreyi* e *Amansia multifida*, respectivamente.

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi purificada por cromatografia de afinidade em gel de α -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100 (BENEVIDES *et al.*, 2001).

OLIVEIRA *et al.* (2002) isolaram a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* utilizando procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar.

1.2.2.3- Características Físico-Químicas

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

As lectinas das algas verdes *Codium adherens*, *C. effusum*, *C. capitatum* e *C. platylobium*, foram purificadas por ROGERS *et al.* (1994) e os dados obtidos por eletroforese em PAGE-SDS revelaram que todas as quatro lectinas apresentavam massas aparentes entre 11 e 13 kDa e não dependiam de cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *Briothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*, isoladas por AINOUZ *et al.* (1995), mostraram-se não dependentes de cátions divalentes e não foram inibidas por açúcares simples. Estas lectinas apresentaram uma simples banda com mobilidade semelhante por PAGE-SDS e massas moleculares estimadas por filtração em gel de 4,5 kDa e 3,5 kDa para *Briothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*, respectivamente.

BENEVIDES *et al.* (1996) isolaram uma lectina monomérica da alga *Solieria filiformis*, com 1,5 % de sua composição em açúcar. Essa lectina foi inibida pelas glicoproteínas manana de levedura, avidina, "egg white" e

ovalbumina e, quando analisada por cromatografia de filtração em gel de Superose 12-R (FPLC), revelou uma massa de 21,9 kDa, enquanto por PAGE-SDS, apresentou uma massa molecular estimada em 29 kDa.

BENEVIDES *et al.* (1998b) isolaram uma aglutinina presente na alga marinha vermelha *Enantiocladia duperreyi*. A lectina aglutinou preferencialmente eritrócitos humanos do grupo O, sua atividade hemaglutinante apresentou dependência por cátions divalentes e foi inibida na presença dos açúcares simples D-fucose, D-galactose e alguns de seus derivados e da glicoproteína mucina de porco. A lectina apresentou uma massa molecular aparente de 24,7 kDa por filtração em gel e de 16,07 kDa por PAGE-SDS.

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

MELO (2000) estudando a alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* observou que a lectina purificada desta alga dependente do cátion divalente Ca^{++} para exercer sua atividade biológica e foi inibida pelos açúcares simples N-acetilgalactosamina, D-galactosamina, D-galactose e α -lactose e pela glicoproteína mucina. Esta proteína apresentou uma estrutura glicoprotéica (43,16 % de carboidrato), sendo sua massa molecular aparente de 78,9 kDa (filtração em gel de Sephadex G-100), tendo o procedimento de eletroforese realizado em condições nativas (PAGE) e desnaturante (PAGE-SDS) revelado uma única banda protéica com massa molecular de 59,6 kDa. Entretanto, sua redução em presença de β -mercaptoetanol revelou a presença de duas diferentes subunidades protéicas com massas moleculares de 59,6 e 15,2 kDa. A focalização isoelétrica mostrou a presença de uma única banda protéica na faixa ácida de pH com valor de pl entre 4 e 5. A análise da composição de aminoácidos da lectina purificada mostrou uma predominância dos aminoácidos Asp/Asn e Glu/Gln e do aminoácido hidrofóbico leucina. Uma aglutinina dimérica

presente na alga verde *Caulerpa cupressoides*, com 11,05% de carboidrato em sua composição, foi recentemente purificada. A lectina foi inibida por lactose e alguns de seus derivados e pela glicoproteína mucina do estômago do porco. Sua massa molecular, determinada por filtração em gel, foi de 44,7 kDa, enquanto por PAGE-SDS na presença de β -mercaptoetanol foi de 23,2 kDa. Apresentou uma predominância de glicina, dos aminoácidos ácidos glutâmico e aspártico e do aminoácido hidroxilado serina em sua composição (BENEVIDES *et al.*, 2001).

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

HORI *et al.* (2000) determinaram a estrutura primária de duas lectinas, denominadas hypninas A-1 e A-2, isoladas da alga marinha vermelha *Hypnea japonica*, por degradação de Edman. Ambas as aglutininas eram polipeptídeos de cadeia única, compostas de 90 resíduos de aminoácidos, incluindo quatro meia-cisteínas envolvidas em duas ligações dissulfeto intracadeias. A estrutura primária das lectinas diferia com relação à posição de três resíduos sendo: Pro¹⁹, Arg³¹ e Phe⁵² para hypnina A-1 e Leu¹⁹, Ser³¹, Tyr⁵² para hypnina A-2.

1.2.2.4- Propriedades Biológicas

Estudo envolvendo lectinas de algas marinhas têm tido um substancial progresso ao longo dos últimos 15 anos e padrões de características começam a aparecer. A maioria das lectinas de algas marinhas é de pequeno tamanho quando comparadas com aquelas derivadas de plantas terrestres e essa característica pode fazer dessas proteínas moléculas mais apropriadas

para o uso como mísseis biológicos, pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica (ROGERS & HORI, 1993).

É sabido que as características de reconhecimento de estruturas de açúcares e glicoconjugados dessas proteínas, faz delas importantes ferramentas para o reconhecimento e isolamento desses tipos moleculares, sejam eles dissolvidos em soluções ou presentes em membranas biológicas.

A lectina da alga marinha verde *Codium tomentosus* foi usada para diagnosticar poliformismo de glicoproteínas do soro humano, após a focalização isoelétrica (FÁBREGAS *et al.*, 1988). A lectina de *Codium fragile* tem sido usada para estudar do conteúdo de carboidratos presentes nos polissacarídeos da parede celular de *Streptococcus* (CISAR *et al.*, 1995).

Algumas lectinas de algas apresentaram a propriedade de estimular o crescimento celular e também foram capazes de induzir o recrutamento de neutrófilos durante o processo inflamatório. Assim, BIRD *et al.* (1993) verificaram que as lectinas das algas *Gracilaria tikvahiae*, *Ulva rígida* e *Gracilaria verrucosa* estimularam mitogênese em esplenócitos de camundongo, enquanto a aglutininas de *Gracilaria tikvahiae* estimulou mitogênese em linfócitos humanos. DALTON *et al.* (1995) observaram as lectinas das algas marinhas *Chondria dasyphylla*, *Rhodymenia pseudopalmata* e *Gracilaria sp.*, estimularam a mitogênese em esplenócitos murinos, enquanto as lectinas de *Chondria dasyphylla*, *Codium decortiatum*, *Gracilaria sp.*, *Gracilaria tikvahiae* e *Gelidium pusillum* estimularam mitogênese em linfócitos humanos. LIMA *et al.* (1998) estudaram a indução da transformação de linfócitos humanos pela lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. A curva dose-dependente para células mononucleares periféricas do sangue humano (PBMC) foi estimulada pela lectina em concentrações relativamente baixas. Em valores elevados, observou-se uma redução gradual da capacidade mitogênica, com o concomitante aumento na concentração da lectina. O decréscimo na proliferação de linfócitos foi bloqueado por avidina, mas não por IL-2 ou outra lectina (Com Br) a concentrações estimulatórias. NEVES *et al.* (2001) utilizando as lectinas das algas marinhas vermelhas *Amansia multifida*, *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum* e *Gracilaria caudata* verificaram que estas induziram a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. O influxo máximo de neutrófilos foi determinado pela

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

Lectinas de algas marinhas também foram utilizadas por Hori *et al.* (1986), como principal ferramenta para a pesquisa do câncer, para isso foram utilizados os extratos de *Boodlea coacta*, *Codium fragile*, *Carpopeltis flebelata*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Solieria robusta* onde verificaram que estes foram capazes de aglutinar fortemente células do tipo FM3A de tumor de rato.

Lectinas isoladas das espécies de algas *Cystoclonium purpureum*, *Palmaria palmata*, *Monospora* sp. e *Agardhiella tenera*, foram capazes de reagir com células leucêmicas de rato do tipo L5178Y, mas não reconheceram o tipo L1210 (SHIOMI *et al.*, 1979, KAMIYA *et al.*, 1980, KAMIYA 1982a e 1982b).

Ainda com relação a interação de células com lectinas, a aglutinação de alguns tipos de células bacterianas foi observada por HORI *et al.*, (1986), empregando algumas lectinas de algas marinhas, onde células de *Escherichia coli* foram aglutinadas pelas lectinas de *Ulva pertusa*, *Codium fragile* e *Boodlea coacta*; células das bactérias *Pseudomonas putida* reagiram com as lectinas de *Ulva pertusa* e *Codium fragile* e células de *Flavobacterium* sp. somente pela lectina de *Codium fragile*.

A aplicação de lectinas de algas marinhas em testes histoquímicos foi relatada pela primeira vez para a alga *Codium fragile* por GRIFFIN *et al.*, (1995). Os autores sugeriram como sistema modelo, o uso de conjugado lectina-ouro coloidal ligado a membranas de eritrócitos humanos A₁ e prontamente detectados por microscopia eletrônica de transmissão. As pequenas moléculas de lectinas de *C. fragile* utilizadas neste teste apresentaram um fácil acesso em diferentes pontos da superfície das células de vários tecidos.

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

VIANA *et al.* (2002) reportaram uma atividade antinociceptiva, determinada pelos ensaios com formalina e da placa quente em camundongos, presente nos extratos protéicos das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*, precipitados com sulfato de amônio até 60% de saturação (F 0/60) e contendo frações de carboidratos e lectinas. Não somente as F 0/60, mas também as lectinas de ambas as espécies inibiram significativamente as contrações abdominais induzidas por ácido acético após administrações por via ip. e oral. No teste com formalina, as lectinas (1 e 5 mg/kg, por via ip., e 5 a 20 mg/kg, por via oral) inibiram a primeira e segunda fases (5 e 20 minutos, respectivamente) mas o efeito ocorreu predominantemente na segunda fase. Os efeitos das lectinas foram total ou parcialmente revertido com naloxone (2 mg/kg, por via sc.) na primeira e segunda fases, respectivamente. Experimentos conduzidos com as lectinas na ausência e presenças de avidina (1 mg/kg, por via ip.) e D-manose (1 mg/kg, por via ip.), mostraram que a avidina não interfere com o efeito da lectina de *B. seaforthii*, mas parcialmente reverteu o efeito da lectina de *B. triquetrum*, enquanto D-manose reverteu completamente os efeitos de ambas as lectinas.

O papel biológico das lectinas de algas marinhas constitui uma área de pesquisa ainda pouco explorada, onde investigações deverão ser realizadas para que se possa entender a verdadeira função dessas moléculas nesses organismos. A suposição de que sua ocorrência está associada a algum papel comum, foi levantada por HORI *et al.* (1988), embora saibamos que evidências adicionais devam ser obtidas para o total esclarecimento de suas funções.

1.3- SUBSTÂNCIAS TÓXICAS E/OU ANTINUTRICIONAIS EM PLANTAS

Até o final do século XIX, acreditava-se que o efeito tóxico de alguns vegetais era consequência da contaminação de sementes por toxinas bacterianas. Somente após inúmeras investigações, ficou estabelecida a distinção entre uma intoxicação de origem bacteriana daquela induzida por componentes tóxicos presentes nas sementes.

Embora a toxicidade presente em vegetais esteja associada a substâncias de natureza química bastante diversificada, é sabida a ocorrência de compostos de caráter protéico e que ocasionam efeitos biológicos adversos a outros organismos.

WARDEN & WADDEL (1984) demonstraram que a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* era devida a uma fração protéica obtida por precipitação do extrato aquoso com álcool, denominada abrina. DIXSON (1887) obteve, a partir de sementes de *Ricinus comunis*, uma fração altamente tóxica, denominada ricina.

STILLMARK (1888) observou que extratos tóxicos de *Ricinus communis* aglutinavam eritrócitos. Subsequentemente, trabalhos mostraram que outras toxinas de vegetais, crotina (STILLMARK, 1888) e abrina (HELLIN, 1891) também exibiam propriedades hemaglutinantes. Estas observações levantaram a hipótese de que o mecanismo de ação tóxica dessas proteínas estivesse associado às propriedades hemaglutinantes de seus extratos protéicos. Entretanto, é sabido hoje que a atividade hemaglutinante está associada a lectina, enquanto a fração protéica tóxica apresenta fraca ou nenhuma atividade hemaglutinante (OLSNES *et al.*, 1974).

As proteínas tóxicas de plantas existem na natureza como holotoxinas e hemitoxinas. Holotoxinas (também referidas como proteínas inativadoras de ribossomos de classe II) incluem a ricina, abrina e lectina do visco e contêm um domínio ligante unido por ponte dissulfeto a um domínio enzimático. As hemitoxinas, como saporina e gelonina, contêm um único domínio enzimático (KREITMAN & PASTAN, 1998).

Além da ricina e da abrina, várias proteínas tóxicas de vegetais são conhecidas como proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) em decorrência da atividade inibitória sobre a síntese protéica em células eucarióticas. Algumas destas proteínas podem ligar-se e penetrar nas células, comportando-se como uma das substâncias mais tóxicas conhecidas. Entretanto, a maioria delas é incapaz de penetrar em células sadias, sendo, portanto, fracamente citotóxicas (HARTLEY & CHADDOCH, 1996).

Alguns vegetais contêm, ainda, outros fatores protéicos que são potentes inibidores de enzimas digestivas como a tripsina, quimiotripsina, α -

amilase ou lipase (LIENER, 1989; BELITZ & WEDER, 1990; NORTON, 1991; WHITAKER, 1997). Se consumidos esses inibidores de enzimas têm o potencial para reduzir ou prevenir a digestão de nutrientes e, possivelmente, prejudicar o metabolismo do corpo, o crescimento e a saúde (LIENER, 1989; GRANT *et al.*, 1998).

Pelo fato das proteínas serem nutrientes essenciais aos organismos animal e humano, deve-se levar em consideração, além de seu conteúdo e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, sua toxicidade e/ou propriedades antinutricionais (CARNOVALE *et al.*, 1990; SGARBIERI, 1996).

A distinção entre componentes tóxicos e antinutricionais é que os tóxicos agem de forma aguda, produzindo lesões nos órgãos e tecidos, bem como alterações fisiológicas que resultam em enfermidades, podendo, inclusive, causar a morte de pessoas ou animais que os ingerem. Os componentes antinutricionais, por sua vez, são considerados aqueles que embora não causem alterações teciduais e fisiológicas evidentes, atuam diminuindo a eficiência metabólica, interferindo com a utilização dos nutrientes (SGARBIERI, 1996).

Além disso, o potencial de aplicações farmacológicas destas proteínas tem estimulado contínuos estudos envolvendo seu isolamento e caracterização. As investigações bioquímicas e biológicas desses compostos fornecem dados para o melhoramento das espécies, bem como a utilização de tais constituintes nas mais diversas áreas tais como agricultura, medicina, imunologia e toxicologia, entre outras (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

1.3.1- Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são um grupo de proteínas cujo mecanismo de ação consiste em inativar a síntese protéica eucariótica, interferindo em seu mecanismo de tradução. Muitas RIPs de plantas e bactérias exercem seus efeitos através de ligação a subunidade ribossômica 60S, na qual ela age como uma *N*-glicosidase, clivando especificamente a base

adenina A-4324, resultando na incapacidade do ribossomo de se ligar ao fator de alongação 2 e assim terminar a tradução (AU *et al.*, 2000).

As RIPs são classificadas em dois grupos denominados tipo 1 e tipo 2, embora alguns pesquisadores reconheçam uma terceira classe formada por RIPs do tipo 4, as quais são consideradas dímeros das RIPs tipo 2 (STIRPE *et al.*, 1992).

As RIPs do tipo 1 são proteínas monoméricas, geralmente glicoproteínas, de massa molecular em torno de 30 kDa e pI freqüentemente maior que 9,5. São consideravelmente mais numerosas que as RIPs do tipo 2 e possuem apenas uma subunidade catalítica, apresentando, portanto, menor citototoxicidade (HARTLEY & CHADDOCK, 1996).

STIRPE & BARBIERI (1986) estudaram várias espécies pertencentes à família Curcubitaceae e observaram que a maioria delas inibia a síntese protéica. Uma delas foi a *Bryonia dióica* L., cuja RIP, denominada de briodina, é uma glicoproteína com massa molecular de 30 kDa, inibe a síntese de proteínas em reticulócitos lisado de coelho e possui atividade contra o vírus do mosaico do fumo em folhas de *Nicotiana glutinosa*. A PAP ("pokeweed"), primeira RIP do tipo 1 purificada e parcialmente caracterizada (IRVIN, 1975), preveniu a replicação, em células humana, de polivírus, citomegalovírus, vírus influenza, vírus do herpes simples e vírus da AIDS (IRVIN & UCKUN, 1992). A tricosantina, uma RIP do tipo 1, isolada das raízes de *Trichosantes kirilowii* Maxim, inibiu a replicação do vírus da AIDS em células H9 e CEM-SS (FERRARI *et al.*, 1991) e apresentou atividade antitumoral em trofoblasto (SHAW *et al.*, 1994; LAM *et al.*, 1996).

As RIPs do tipo 1 isoladas das raízes de *Mirabilis expansa*, nomeadas ME1 e ME2, foram ativas contra vários fungos, incluindo *Pythium irregulare*, *Fusarium oxysporum solani*, *Alternaria solani*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*. Uma atividade antibacteriana de ambas ME1 e ME2 também foi observada contra *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, e outros (VIVANCO *et al.*, 1998).

AU *et al.* (2000) verificaram que a saporina, RIP do tipo 1 isolada de *Saponaria officinalis* é uma potente inibidora do vírus da AIDS. O mecanismo de ação desta proteína parece ser a inibição da enzima HIV-1 integrase.

As RIPs do tipo 2 são proteínas contendo duas subunidades diferentes (cadeias A e B), ligadas por ponte dissulfeto, com massa molecular em torno de 60 kDa e pI entre 4,8 e 8,0. A cadeia A (efetômero) é responsável pela inativação enzimática dos ribossomos, enquanto a cadeia B (haptômero) se liga à superfície das células através de interações com carboidratos. Cataliticamente inativa, a cadeia B possui a capacidade de ligar-se a glicídios (galactose) presentes na superfície celular, estando envolvida no processo de internalização da molécula ativa na célula, de modo a atingir seu alvo (ENDO *et al.*, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

A despeito das evidências de que aplicações exógenas de RIPs em plantas e sua expressão em plantas transgênicas, conferem a estas uma resistência a infecções por fungos e vírus, o papel fisiológico destas proteínas não está ainda esclarecido. Várias plantas que produzem grandes quantidades de RIPs do tipo 1, que são ativas contra ribossomos e conferem resistência a infecções virais em outras plantas quando aplicadas exogenamente, são elas próprias susceptíveis a ataques por esse mesmos vírus (SHEPHERD *et al.*, 1969).

LEAH *et al.* (1991) propuseram que a RIP da semente da cevada, que é produzida após o desenvolvimento do endosperma, pode ser a responsável por programar da senescência até a maturidade da semente.

O acúmulo das lectinas tóxicas ricina e abrina em grandes quantidades no endosperma, bem como a sua toxicidade específica, têm sugerido funções defensivas para estas moléculas, onde sua presença possivelmente impediria que mamíferos forrageiros, pássaros e insetos se alimentassem das sementes (OLSNES & PIHL, 1981).

Vários atributos das RIPs estão sendo explorados em aplicações clínicas e na agricultura (HARTLEY *et al.*, 1996). Várias RIPs têm sido usadas na construção de moléculas tóxicas ou imunotoxinas direcionadas a antígenos tumorais (BLAKEY *et al.*, 1988). O potencial de aplicabilidade destas moléculas cresce à medida que aumenta o entendimento de suas funções fisiológicas e de suas características bioquímicas. Portanto, estudos envolvendo estas proteínas possibilitarão uma melhor compreensão de seu papel na natureza e um melhor aproveitamento de seu potencial biotecnológico.

1.3.2- Inibidores de Proteases

Proteínas inibidoras de tripsina e quimiotripsina estão presentes em diversas espécies vegetais. Elas estimulam a excreção de nitrogênio endógeno, prejudicam a utilização de nutrientes e reduzem a razão de crescimento quando ingeridas em grandes quantidades por animais jovens. Entretanto, elas parecem ter um pequeno efeito sobre animais adultos, incluindo ruminantes (GRANT, 1999)

Inibidores de protease também promovem a liberação de colecitocininas e o crescimento do pâncreas em ratos e isto pode levar a um aumento na incidência de neoplasia de pâncreas (GRANT, 1999).

A natureza e concentração dos inibidores de enzimas presentes em vegetais variam significativamente com a espécie, estação do ano, estado fisiológico e parte da planta. Esses inibidores diferem expressivamente entre as partes (raízes, folhas etc.) da planta. Inibidores de proteases tendem a estar presentes em quantidades nutricionalmente significantes na maioria das plantas, em particular em sementes de legumes, batatas e cereais (WHITAKER, 1997). Em contraste, os outros inibidores parecem ocorrer, geralmente, a níveis moderados em cereais, mas em pequenas quantidades em outros vegetais. Uma exceção a isso é o feijão roxo, que contém concentrações muito altas de inibidores de α -amilase (GRANT *et al.*, 1995a; WHITAKER, 1997).

Os inibidores de protease possuem múltiplas funções, entre as quais estão a regulação de proteínas endógenas, reserva protéica e defesa. Algumas plantas contêm inibidores de proteases com função reguladora, por apresentarem proteínas que são insensíveis a inibidores endógenos. Os inibidores de proteases que atuam como reserva protéica, em sementes e raízes tuberosas, são mobilizados ao longo da germinação e do brotamento (D'MELO *et al.*, 1991).

Os inibidores de proteinases serínicas, dos quais fazem parte os inibidores de tripsina são os mais estudados. Estes, em leguminosas, são divididos em dois tipos: Bowman-Birk e Kunitz. Os inibidores protéicos do tipo Bowman-Birk se caracterizam por apresentar massa molecular relativamente

baixa, 8 a 9 kDa, e elevado conteúdo de cisteína, formando sete pontes dissulfeto intracadeias. Este inibidor é considerado de dupla-cabeça, por apresentar capacidade de formar complexos estequiométricos com enzimas, inibindo diferentes proteinases, usualmente tripsina e quimiotripsina. Os inibidores da família Kunitz são geralmente de cadeia monomérica, com massa molecular em torno de 21 kDa, contendo quatro resíduos de cisteína, os quais formam duas pontes dissulfeto. Este inibidor protéico é considerado de cabeça única, sendo específico para a tripsina, mesmo apresentando capacidade de inibir fracamente a quimiotripsina (NORTON, 1991).

Durante a última década, várias proteínas de plantas capazes de inibir o crescimento de fungos *in vitro* têm sido isoladas e caracterizadas. Entre essas proteínas estão as glucanases e quitinases, genericamente chamadas de proteínas antifúngicas (PAFs), (MAUCH *et al.*, 1995), proteínas "taumatina-like" (HEJGAARD *et al.*, 1991; VIGERS *et al.*, 1991; WOLOSHUK *et al.*, 1991), vários peptídeos básicos ricos em cisteína (BROEKAERT *et al.*, 1996), proteínas ligantes a quitina (RAIKHEL *et al.*, 1993), proteínas inativadoras de ribossomos (LEAH *et al.*, 1991) e inibidores de proteinase (TERRAS *et al.*, 1993).

As proteínas PAFs podem constituir parte das barreiras de defesa pré-formadas ou induzidas por microorganismos e algumas evidências acumuladas sugerem que estas proteínas podem ter uma atividade antimicrobiana direta *in vivo*, acentuando a resistência a micróbios patogênicos de plantas transgênicas que expressam algumas dessas proteínas antimicrobianas (DIXON *et al.*, 1986).

Uma proteína com massa molecular de 16 kDa, isolada das flores de girassol (*Helianthus annuus*), inibiu a germinação de esporos de fungos. Esta proteína, denominada SAP16, exibiu também uma inibição da enzima tripsina. A SAP16 causou uma completa inibição da germinação de *Sclerotinia sclerotiorum* a uma concentração de 5 µg/ml (0,31 µM) e também reduziu o crescimento dos micélios a baixas concentrações, indicando uma potente ação antifúngica contra este patógeno natural do girassol (GIUDICI *et al.*, 2000).

O uso de genes que codificam inibidores de proteases para conferir resistência a plantas contra insetos vem sendo estudado a bastante tempo (JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998). A habilidade desses inibidores

em interferir com o crescimento e desenvolvimento de insetos vem sendo atribuída a sua capacidade de se ligar às proteases inibindo sua ação no trato digestório de insetos (JONGSMA & BOLTER, 1997).

ISHIHARA *et al.*, (1968) reportaram a presença de inibidores de tripsina em duas espécies de algas marinhas japonesas, os quais foram estáveis a altas temperaturas e capazes de exercer sua atividade inibidora em um intervalo de pH entre 2 e 9.

PEREZ-LORENZO *et al.*, (1998), ao estudarem a presença de lectinas, taninos e inibidores de protease em algas marinhas da costa venezuelana, observaram a presença de inibidores de tripsina nas algas marinhas *Padina gymnospora* e *Acantophora spicifera*.

1.3.3- Toxinas

Uma outra classe de proteínas tóxicas ainda pouco estudada, cujo mecanismo de ação difere daquele das RIPs, é a das neurotoxinas, cuja ação envolve o sistema nervoso central (SNC). Algumas destas toxinas já foram estudadas, como é o caso da canatoxina (CARLINI & GUIMARÃES, 1981) e da soyatoxina (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

CARLINI & GUIMARÃES (1981) isolaram e caracterizaram parcialmente uma proteína tóxica convulsivante presente nas sementes de *Canavalia ensiformis*, diferente da concanavalina A (Con A). A semente desta planta possui um princípio tóxico que, administrado em animais de experimentação por diversas vias, produz convulsão e morte, com uma $DL_{50} = 2,0$ mg/kg de peso corpóreo do camundongo por via ip. A manifestação do fenômeno convulsivo é dependente da integridade da medula espinhal, provavelmente modulado por centros superiores do encéfalo e, precede, invariavelmente, a morte. A proteína tóxica, entretanto, não apresenta qualquer atividade sobre preparações farmacológicas de músculos isolados, mostrando que os efeitos tóxicos têm, provavelmente, origem central. Este agente tóxico apresenta propriedades de uma macromolécula, caracterizando-se como uma

proteína termolábil, solúvel em água e em soluções salinas diluídas, altamente instável sob diversas condições experimentais e com peso molecular variando entre 85 e 170 kDa, de acordo com o seu estado de pureza. A canatoxina apresentou, ainda, variações farmacológicas, como indução de hipertensão, bradicardia, hipotermia e redução dos níveis cerebrais dos neurotransmissores, noradrenalina e serotonina.

A proteína tóxica presente nas sementes de soja (*Glycine max* L.), soyatoxyna, foi purificada e caracterizada por VASCONCELOS *et al.* (1994). O procedimento de purificação consistiu basicamente de fracionamento com sulfato de amônio sólido, seguido de cromatografias de troca iônica e de afinidade em coluna de goma de guar e de Sepharose 4B-anidrotipsina, sendo as últimas para a remoção da lectina e de inibidores de tripsina da soja, respectivamente. Esta toxina é uma proteína acídica de uma única cadeia, com pI entre 4,4 e 4,6, massa molecular em torno de 21 kDa e dependente de grupos sulfidríla livres para manter sua solubilidade e atividade biológica. A soyatoxina é uma metaloproteína que contém ferro, cálcio, zinco e magnésio, e sua estabilidade é influenciada pela temperatura de estocagem e pH do meio. Esta proteína é altamente tóxica para camundongos ($DL_{50} = 7-8$ mg/kg de peso corpóreo) por via ip., mostrando-se também ativa pelas vias iv., im. e sc., produzindo dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas que precedem a morte do animal. Esta toxina está imunologicamente relacionada a canatoxina e algumas propriedades biológicas, incluindo ensaios de toxicidade em camundongos, barbeiros, microcrustáceos (*Artemia* sp.) e bactérias, reação de secreção em macrófagos, mitogenicidade, efeito inibitório sobre a síntese protéica em células de câncer de laringe, imunorreatividade "canatoxin-like", hemaglutinação, atividade inibitória de tripsina e indução da secreção e agregação plaquetária, permitiram diferenciá-la da toxina e dos inibidores de tripsina da soja.

VASCONCELOS *et al.* (1997) estudaram os efeitos tóxicos de cinco cultivares brasileiros de soja (Bays, BR-10, Rio Balsas, Seridó e Tropical) e observaram que os extratos brutos das sementes de Bays, BR-10, Seridó e Tropical foram altamente tóxicos para camundongos entre 1 e 12 horas,

dependendo da via de administração (ip., im. ou sc). Os efeitos agudos foram muito similares àqueles produzidos pela soyatoxina.

Uma proteína neurotóxica e também exibindo propriedades lectínicas foi isolada da folha da salsa (*Ipomoea asarifolia*) e estudada com relação aos seus aspectos bioquímicos e funcionais. Esta proteína foi altamente tóxica para camundongos por via iv. ($DL_{50} = 0,2$ mg/kg de peso corpóreo), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida que precederam a morte dos animais, sendo esta atividade dependente de grupos sulfidrila livres. A fração contendo esta toxina exibiu ação inseticida contra larvas de gorgulho (*Callosobruchus maculatus*), que ataca o feijão-de-corda ou caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), particularmente quando armazenado, sugerindo um possível papel fisiológico de defesa (SANTOS, 2000).

1.3.4- Toxinas de Algas

A presença de substâncias tóxicas em algas está relacionada com a função de proteção contra a ação destruidora de uma gama de predadores naturais, os quais competem entre si por alimentos e por outros fatores de sobrevivência. As algas marinhas, assim como os vegetais, produzem metabólitos secundários (terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifenóis), diferindo somente na incorporação de halogênios em seus compostos e por produzirem alcalóides contendo nitrogênio. Esses metabólitos, freqüentemente, são espécie ou gênero-específicos, podendo ser utilizados como critérios quimitaxonômicos na separação de espécies morfológicamente semelhantes dentro de um mesmo habitat (HAY *et al.*, 1987; FENICAL, 1982; HAY & FENICAL, 1988).

Estudos de detecção, isolamento e caracterização de proteínas que exibem atividade tóxica para células e/ou animais, através de diferentes mecanismos, vêm sendo intensificados devido não só à sua possível presença em alimentos vegetais (frutas, legumes, cereais, algas etc.) e conseqüente interferência do ponto de vista antinutricional e/ou letal, mas também pela

crescente utilização dessas proteínas acopladas a outras moléculas, de modo a atuarem como mísseis biológicos específicos voltados para a destruição de células defeituosas.

Os estudos de detecção dessas proteínas em algas marinhas foram iniciados por SILVA (1997), onde uma proteína tóxica para camundongos por via ip., presente na alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba*, foi parcialmente purificada, mostrando-se distinta da lectina, apresentando uma banda protéica em torno de 40 kDa por PAGE-SDS.

BENEVIDES *et al.* (1998a), analisaram dez espécies de algas pertencentes às famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hipneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae e observaram que nove das dez espécies de algas vermelhas testadas tiveram seus extratos fortemente tóxicos para camundongos quando injetados por via ip., no período de 8 a 20 horas. Por outro lado, todas as frações protéicas precipitadas até 60% de saturação com sulfato de amônio sólido (F 0/60) exibiram toxicidade para camundongos.

Ao realizar estudos com a alga marinha vermelha *Amansia multifida*, SILVEIRA (2001) observou que o extrato bruto obtido desta alga era altamente tóxico para camundongos dentro do período de 24 horas por via ip. ($DL_{50} = 2,4$ mg/kg de peso corpóreo do animal). A toxina foi purificada por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio até 80% de saturação (F 0/80), seguida de cromatografia de afinidade em coluna de manana-Sepharose 4B e filtração em gel com Sephadex G-100. A toxina obtida é uma glicoproteína que apresenta 43,3% de açúcar em sua estrutura e mostrou-se distinta da lectina atóxica, exibiu uma estrutura monomérica com massa molecular aparente de 19 kDa por filtração em gel com Sephadex G-100. Esta proteína não mostrou dependência por grupos sulfidrilas livres para manter sua solubilidade e atividade biológica, mantendo-se estável durante o processo de liofilização. A toxina mostrou-se fortemente ativa para camundongos ($DL_{50} = 2,4$ mg/kg de peso corpóreo do animal por via iv.), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, que precederam a morte do animal.

Embora algumas das espécies estudadas possam ser consideradas como promissoras fontes de proteínas, a presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais nas mesmas torna necessária a obtenção de mais informações

concernentes ao valor nutricional e alternativas para a eliminação de qualquer efeito detrimental à saúde dos que a consumirem.

1.4 - **CARRAPATOS** *Boophilus microplus*

Boophilus microplus é a denominação do carrapato comum dos bovinos, podendo entretanto, parasitar outros mamíferos. É originário da Ásia, precisamente da Índia e Ilha de Java. Este carrapato vem causando grandes prejuízos à pecuária brasileira, principalmente nas regiões de criação e cruzamento das raças taurinas. Os principais problemas causados pelo *B. microplus* são: 1) ingestão de sangue, que dependendo da infestação, pode comprometer a produção de carne e leite; 2) inoculação de toxinas no hospedeiro promovendo diversas alterações e consequências fisiológicas; 3) transmissão de agentes infecciosos, principalmente anaplasma e babesias, responsáveis pela tristeza bovina e 4) redução de qualidade do couro do animal e possibilidade de resíduos de pesticidas na carne.

O *B. microplus* é um parasito que só utiliza um hospedeiro em seu ciclo evolutivo apresentando duas fases: a fase de vida livre (não parasitária), que se realiza no solo e na vegetação, e a fase parasitária, realizada no corpo do hospedeiro. A fase não parasitária é iniciada com a fêmea fecundada e ingurgitada, se desprendendo do hospedeiro para realizar a postura no solo que resultará em uma das alternativas:

a) a fêmea do *B. microplus* pode morrer antes da postura ou produzir ovos inférteis, ou ainda, suas larvas podem morrer sem alcançar um hospedeiro adequado ou larvas oriundas de ovos dessa fêmea conseguem alcançar um hospedeiro suscetível.

A fase parasitária, com duração média de 23 dias, inicia-se com a fixação das larvas em hospedeiro suscetível e termina quando os adultos, incluindo as fêmeas fecundadas e ingurgitadas, desprendem-se desse hospedeiro. O início e o término do ciclo dão-se quase sempre no pasto, onde geralmente se integram o parasita, o hospedeiro e o ambiente comum a ambos.

Neste ambiente, vários são os fatores (clima, vegetação, densidade animal, raça, etc) que influenciam na sobrevivência do carrapato em cada segmento de seu ciclo. Devido ao pouco conhecimento, em especial, de sua biologia e dos componentes do seu ecossistema, o controle tem sido feito na maioria das vezes, de forma inadequada, restringindo-se quase que exclusivamente a sua fase parasitária.

Com relação ao controle do carrapato sabe-se que uma associação de métodos alternativos de acordo com cada situação, permite obter excelentes resultados e até mesmo reduzir o uso e prolongar a vida útil dos carrapaticidas.

O combate ao carrapato torna-se necessário tanto em áreas onde se verificam grandes infestações durante todo o ano quanto em áreas com baixa infestação mesmo em algumas épocas do ano. Nas áreas com grandes infestações, os danos diretos e indiretos produzidos pelo carrapato levam a grandes prejuízos e, nas áreas com baixa infestação e restrita a algumas épocas do ano, os prejuízos causados pela "tristeza parasitária" assumem grandes proporções.

2. OBJETIVOS

2.1- GERAL

Purificar e caracterizar as proteínas lectina e toxina da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* e, avaliar os efeitos tóxicos dessas proteínas sobre camundongo e o ciclo vital do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

2.2- ESPECÍFICOS

- Caracterizar os componentes químicos da alga através da determinação da composição centesimal .
- Purificar e caracterizar as proteínas lectina e toxina.
- Avaliar os efeitos tóxicos do extrato bruto, da lectina e toxina sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

3. MATERIAIS

3.1- ALGA MARINHA

Os exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* pertencente a divisão Rhodophyta, ordem Gracilariales e família Gracilariaceae foram coletados em rochas do meso-litoral durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0), na Praia de Flexeiras, município de Trairi, estado do Ceará. Após a coleta, foram acondicionados em sacos plásticos e transportados ao laboratório em recipiente isotérmico.

3.2- CÉLULAS SANGÜÍNEAS

Os eritrócitos de galinha e coelho foram obtidos de animais sadios, criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

As hemácias humanas do sistema ABO foram obtidas de doadores sadios junto ao Centro de Hemoterapia do Ceará da Universidade Federal do Ceará.

3.3- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Camundongos albinos (*Mus musculus*), fêmeas, pesando de 18 a 25 g foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

3.4- CARRAPATOS *Boophilus microplus*

Foram utilizados carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) – teleóginas retiradas de bovinos adultos livres de resíduos de carrapaticidas (período de adaptação de 60 dias para retirada total dos carrapaticidas), pertencentes ao rebanho da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

3.5- REAGENTES

Acrilamida, N,N metileno bis-acrilamida, Ibumina sérica bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250, marcadores de massa molecular, Sephadex G-100, Sepharose CL-4B, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA; β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck) e tripsina (Pharmacia, Upsala, Suécia); Os demais reagentes, obtidos comercialmente, foram de grau analítico.

4. MÉTODOS

4.1- TRATAMENTO DAS ALGAS MARINHAS

Os exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, uma vez no laboratório, foram lavados com água destilada e separados de epífitas e outras algas, sendo então estocadas em sacos plásticos e armazenados a -20 °C.

4.2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea*

4.2.1- Determinação de Umidade

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

4.2.2- Determinação de Cinzas

Foram pesados aproximadamente 2,0 g da alga seca em cadinhos de porcelana, previamente tarados, e submetida à incineração em mufla a 550°C por 6 horas. As amostras foram deixadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até

obtenção do peso constante das amostras incineradas. O teor de cinzas foi calculado por diferença entre os pesos inicial e residual e expresso em porcentagem. Às cinzas obtidas foram adicionados 3,0 ml de uma solução de ácido clorídrico 6 M, filtradas em papel de filtro (filtração média) e transferidas para um balão volumétrico, completando o volume para 100 ml com água destilada. A solução clorídrica foi reservada para as determinações posteriores de cálcio, magnésio, fósforo e ferro (A. O. A. C., 1975).

4.2.3- Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total presente na alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foi determinado pelo método de Kjeldahl (HILLER *et al.*, 1948).

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

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

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

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

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

PA = peso da amostra usado na digestão

4.2.4- Determinação de Lipídios Totais

Os lipídios totais foram determinados segundo a metodologia de TRIEBOLD (1946), sendo o hexano usado como solvente. Em um cartucho de papel de filtro foram pesados 1,5 g da amostra previamente seca e colocada no extrator de Soxhlet, ao qual estava adaptado um balão de 250 ml desengordurado, seco e previamente tarado. A extração dos lipídios foi procedida com hexano, durante 6 horas. Depois de eliminado o solvente, por evaporação em banho maria rotatório, o balão com a gordura foi colocado em estufa a 105°C para evaporação total do solvente. Depois de resfriado em dessecador à temperatura ambiente, o balão foi pesado. O procedimento de aquecimento (6 horas na estufa) e resfriamento foi repetido até obtenção do peso constante. O teor de lipídios foi calculado através da relação entre o peso do lipídio extraído e o peso inicial da amostra sendo expresso em porcentagem.

4.2.5- Determinação de Fibras

O teor de fibras foi determinado segundo a metodologia da A. O. A. C. (1975), consistindo na pesagem de aproximadamente 1 g da amostra previamente delipidada com hexano. O resíduo obtido foi transferido diretamente para um erlenmeyer de 500 ml com auxílio de 200 ml de ácido sulfúrico (1,25%) previamente aquecido. Esse material foi fervido em refluxo por 30 minutos, efetuando-se após este tempo uma filtração em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi lavado com água quente, até não haver mais reação ácida (testando

com papel indicador de pH). O resíduo contido no papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer de 500 ml, com auxílio de 200 ml de hidróxido de sódio (1,25%) quente, o qual foi submetido a refluxo por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma segunda filtração em papel de filtro quantitativo (faixa preta), previamente aquecido em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. A seguir, o material foi lavado com água quente até não haver reação básica (testando com o papel indicador de pH), e lavado por 3 vezes com álcool etílico e 2 vezes com éter etílico. O solvente foi deixado evaporar e o papel contendo o resíduo levado para a estufa a 105°C para secagem total, até obtenção de peso constante. O mesmo (papel e resíduo) foi colocado em um cadinho de porcelana, previamente tarado, em mufla a 550°C, queimado em bico de Bunsen e incinerado em mufla a 550°C, efetuando-se pesagens até a obtenção de peso constante. O teor de fibras foi determinado pela fórmula:

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

Onde:

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

P = peso do papel

F = fibra

C = cinza, conforme determinado no item 4.2.2

PA = peso da amostra

4.2.6- Determinação de Cálcio

Para determinação de cálcio (A. O. A. C., 1975), foram pipetados 25 ml da solução clorídrica (item 4.2.2.) em um erlenmeyer e a esta foi adicionado 20 ml da solução de molibdato de amônio 6% e 5 ml de ácido clorídrico 10%. Em seguida,

a mistura foi levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do fósforo, deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado recolhido em erlenmeyer, adicionou-se 20 ml de solução tampão pH 10,0 para elevar o pH da solução que passou de uma coloração levemente amarela para incolor. Acrescentou-se 20 ml de NaOH 4 M, 5 ml de KCN 0,1M e 5 ml de trietanolamina 20%. O volume da solução foi elevado até aproximadamente 300 ml com água destilada e, em seguida, foi adicionado pequena porção de indicador Calcon, sendo a titulação realizada com EDTA 0,02 M até a passagem da cor vermelha para azul intenso. O cálculo para a determinação em equivalentes grama do cálcio, foi realizado usando-se a fórmula:

$$\% \text{ Ca} = \frac{\text{V} \cdot \text{F} \cdot \text{M} \cdot 40 \cdot 100}{\text{P} \cdot 100}$$

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V = volume de EDTA gasto na titulação

P = peso referente à alíquota

M = 0,02

4.2.7- Determinação de Fósforo

A metodologia utilizada foi segundo A. O. A. C. (1975), consistindo na transferência para um balão volumétrico (50 ml) de 5 ml ou mais (dependendo da amostra) da solução clorídrica (item 4.2.2.). À esta solução foram adicionados 1 ml de hidróxido de amônio (1:1, p/v), 2 ml de ácido nítrico (1:2) e 20 ml de solução de molibdato de vanadato de amônio (molibdato de amônio 2% e vanadato de amônio 0,1%). Para a solução de referência (controle) foram adicionados os

reagentes mencionados acima, com exceção da amostra. A leitura foi feita após 30 minutos em espectrofotômetro (FEMTO 432) a 470 nm e os resultados comparados a uma curva padrão obtida a partir de soluções padrões de fósforo.

4.2.8- Determinação de Ferro

O método utilizado foi segundo A. O. A. C. (1975). A determinação foi feita tomando-se 10 ml da solução clorídrica (descrita no item 4.2.2.) para um balão volumétrico de 50 ml, sendo adicionados 1 ml de HCl concentrado, 1 ml de cloridrato de hidroxilamina 10%, 5 ml de acetato de amônio 3 M e 2 ml da solução de fenantrolina 0,1%. O volume foi completado com água destilada para 50 ml e a leitura de absorbância feita em espectrofotômetro a 510 nm (FEMTO 432), sendo o resultado comparado a uma curva padrão obtida a partir da solução padrão de ferro.

4.2.9- Determinação de Magnésio

Para determinação de magnésio (A. O. A. C., 1975), foram pipetados 20 ml da solução clorídrica (item 4.2.2.) e a esta adicionados 20 ml da solução de molibdato de amônio 6%, 5 ml de ácido clorídrico 10%, sendo a mistura levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do fósforo. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado foram adicionados 20 ml de uma solução tampão constituída de hidróxido de amônio (NH₄OH) 11,4 M e cloreto de amônio (NH₄Cl) 1,2 M, pH 10, para elevar o pH da solução, cuja coloração passou de levemente amarela para incolor. Foram, então, adicionados 5 ml de KCN 0,1 M, 5 ml de trietanolamina 20% e 5 gotas de eriocromo negro T como

indicador. A titulação foi realizada com EDTA 0,02 M até viragem de cor vermelha para azul.

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

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V' = volume de EDTA gasto na titulação

V = volume de EDTA gasto na titulação de cálcio

P = peso referente à alíquota

M = 0,02

4.2.10- Determinação de Vitamina C

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

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

Onde:

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

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

PA = peso da amostra utilizada na determinação

4.2.11- Determinação do Valor Calórico Total

Os valores obtidos de carboidratos (C), proteínas (P) e lipídios (L) para a alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foram utilizados para determinação do valor calórico total, utilizando-se a fórmula descrita abaixo (FAE, 1985):

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

4.3- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA ALGA MARINHA

4.3.1- Preparação do Extrato Total

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* fresca foi macerada em presença de nitrogênio líquido. O material triturado foi deixado em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 na proporção de 1:6 (p/v, alga: meio de extração), sob agitação por 4 horas a 4°C. O homogenato foi filtrado em tecido de nylon e, em seguida, centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante obtido, denominado de extrato bruto, submetido aos ensaio das atividades hemaglutinante e tóxica, dosagem de proteínas e concentração por liofilização parcial. A fração protéica assim obtida foi avaliada quanto ao teor de proteína, atividades hemaglutinante e tóxica, para dar prosseguimento à purificação da proteína. O esquema geral de purificação está representado na **FIGURA 01**.

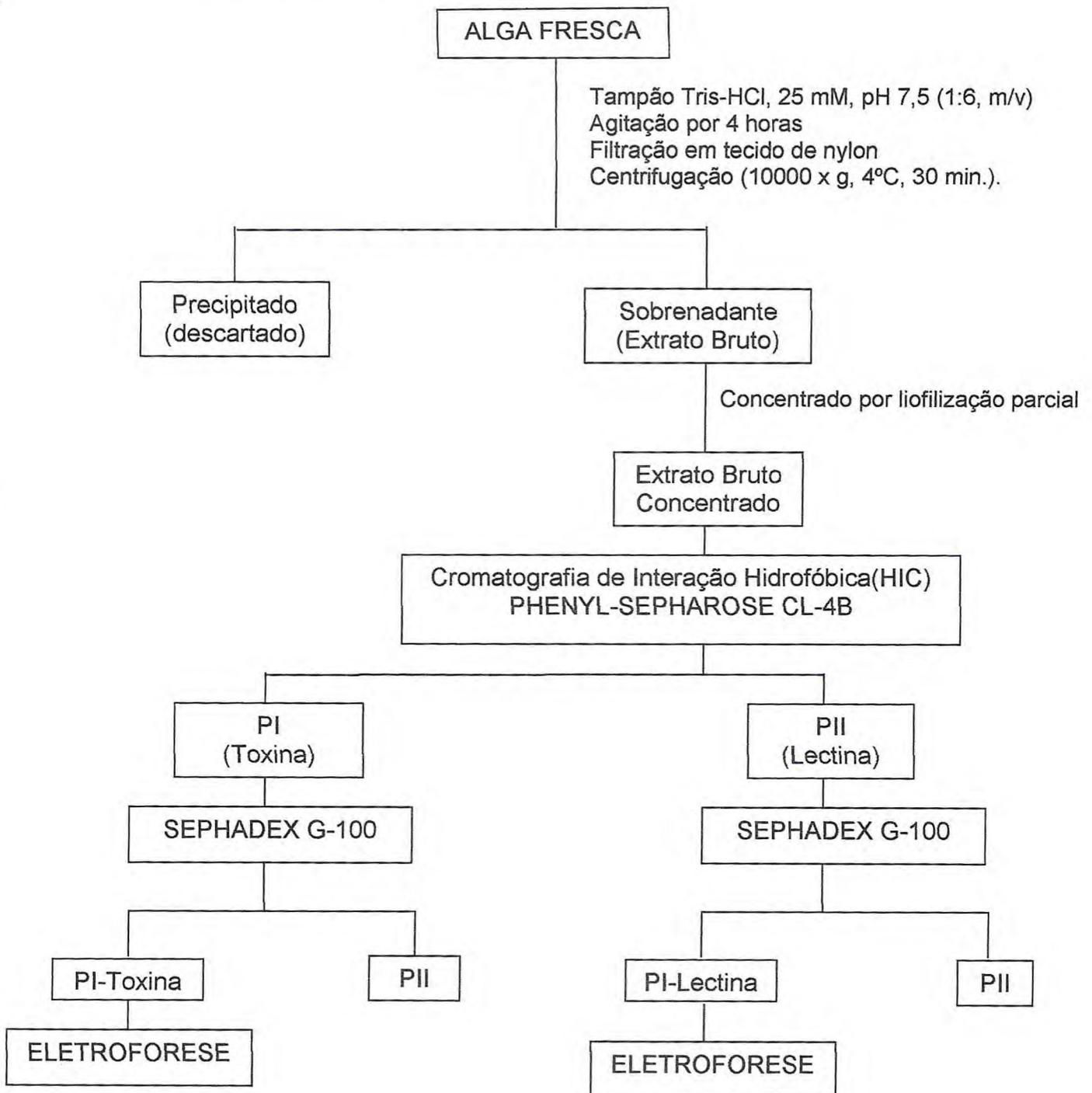


FIGURA 01 - Esquema de purificação das proteínas (lectina e toxina) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*

4.4- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

As concentrações de proteínas solúveis no extrato bruto concentrado e nas etapas de isolamento das proteínas (lectina e toxina) foram realizadas segundo o método de BRADFORD (1976). Após 10 minutos de contato das amostras com o reagente Coomassie G-250, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm (espectrofotômetro Spectronic 20). A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA). Para estimativa das concentrações de proteínas nos eluatos das cromatografias foi utilizada a leitura de absorbância a 280 nm.

4.5 - DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O teor de carboidratos foi determinado seguindo o método de DUBOIS *et al.* (1956). Para 1 ml da amostra, adicionou-se 1 ml de fenol a 5% e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação, a amostra permaneceu em repouso por 15 minutos e as leituras feitas a 490 nm (espectrofotômetro Spectronic 20). A concentração de carboidratos foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com glucose.

4.6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram feitos através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100 µl de NaCl 150 mM. No primeiro tubo foram adicionados 100 µl da amostra e uma série

de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100 µl de eritrócitos a 2% e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por MOREIRA & PERRONE (1997). Posteriormente, o material foi centrifugado a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/ml), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

4.7 - DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE SANGÜÍNEA

Com o objetivo de se determinar a especificidade sanguínea da(s) hemaglutinina(s) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, foram feitos ensaios de hemaglutinação utilizando-se eritrócitos de coelho, galinha e humanos do sistema ABO, nativos e tratados enzimaticamente com tripsina, de acordo com a metodologia descrita por AINOUZ *et al.* (1992).

4.8 - ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Para os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, uma alíquota da fração contendo a(s) hemaglutinina(s) de *G. cornea*, encerrando 32 UH/ml, foi diluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, na proporção de 1:4 (v/v; amostra:tampão) e da solução resultante foram retiradas alíquotas de 100 µl que foram transferidas para tubos de ensaio contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) a partir de soluções estoque de açúcares simples na concentração de 100 mM e de glicoproteínas na concentração de 5 mg/ml. Os tubos permaneceram 60 minutos à temperatura

ambiente e após este período foram adicionados 200 µl de suspensão de eritrócitos de galinha a 2% tripsinizados. Os tubos foram deixados em repouso por mais 60 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos.

A especificidade da lectina foi determinada observando-se os açúcares ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar inibição.

4.9 - EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Amostra da fração de *G. cornea* foi submetida a desmetalização através de diálise contra solução de EDTA 5 mM por 18 horas sob agitação constante, a 4 °C. Alíquotas da fração dialisada foram utilizadas em ensaios de hemaglutinação, na ausência e presença de cátions divalentes (Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM). Ensaios utilizando a fração não dialisada contra EDTA e/ou soluções de NaCl 150 mM com EDTA 5mM e com Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM foram efetuados.

4.10 – TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A estabilidade térmica da atividade hemaglutinante presente na lectina de *G. cornea* foi determinada pela sua incubação em banho-maria, nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C nos intervalos de 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Após cada período de incubação, as amostras foram imediatamente transferidas para um banho de gelo e centrifugadas, sendo então realizados os ensaios de atividade hemaglutinante.

Na determinação do ΔG° de ativação do processo de desnaturação foi calculada, inicialmente, a constante de velocidade da reação (k_1), determinada através da inclinação da reta obtida de acordo com a expressão:

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

Sendo:

A – atividade hemaglutinante residual,

A_0 – atividade hemaglutinante inicial,

T - tempo em segundos.

A constante de velocidade da reação está relacionada com a energia livre padrão do estado ativado pela fórmula (DAWES, 1972):

$$\Delta G^\circ = RT \times \ln kT/k_1h$$

Onde:

R – constante de gases ($8,315 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{°K}^{-1}$),

T – temperatura absoluta (°K),

k – constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{°K}^{-1}$),

k_1 – velocidade da reação (s^{-1})

h – constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$).

4.11 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA

A toxicidade para a alga em estudo foi estimada através de injeção pelas vias ip. e iv. em camundongos, pesando entre 20-25 g, alimentados com dieta

peletizada comercial (4 animais/dose). No caso da toxicidade por via ip. foram considerados positivos apenas os resultados no intervalo de 24 horas. Para aqueles avaliados por via iv. foram levados em conta os decorrentes até 6 hora de administração. A DL₅₀ foi calculada onde uma unidade foi definida como a quantidade de proteína (mg de proteína/kg de peso corpóreo do animal) necessária para causar convulsão e morte em 50% dos animais testados (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

4.12- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE TÓXICA

A estabilidade da atividade tóxica da fração de *G. cornea* foi determinada pela incubação da fração em banho-maria nas temperaturas de 50 e 60°C, nos intervalos de 2,5, 5, 10, 20 e 30 minutos. Alíquotas de 2,5 ml foram retiradas, resfriadas em banho de gelo, centrifugadas e submetidas à dosagem de proteína e testes de atividade tóxica.

4.13- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE UREÁSICA

A determinação da atividade ureásica foi feita como descrito por KAPLAN (1969), com algumas modificações. Alíquota de 0,1 ml de uma solução de uréia 500 mM foi misturada com 0,7 ml de EDTA 2% e tamponada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,5. Após adição de 0,2 ml do extrato bruto (preparado com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM, usando o mesmo protocolo previamente descrito. A mistura foi incubada a 37 °C, por 15 min. A seguir, foram adicionados à mistura 1 ml da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitroprussiato de sódio/l), sendo, então, deixado a 37 °C por mais 5 min. Passado esse tempo, foram adicionados 7 ml de água deionizada aos tubos, sendo estes

cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorvâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva padrão obtida com urease comercial (urease 41H7008-870000 U/g).

4.14- CROMATOGRAFIAS

4.14.1- Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B

O extrato concentrado, obtido por liofilização parcial, foi submetido a cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. A coluna medindo 11,0 x 1,1 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 4 M. Após a eluição da fração não retida no gel, foi aplicado à coluna tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e, em seguida, água deionizada. Durante este procedimento foi mantido um fluxo constante de 30 ml/hora, coletadas frações de 3 ml, sendo as absorvâncias lidas a 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados contra água deionizada, concentrados por liofilização parcial e estocados para posterior utilização.

4.14.2- Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100

Os picos I e II obtidos na cromatografia de interação hidrofóbica foram submetidos à cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100. A coluna medindo 85,5 x 1,3 cm, foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Durante todo o processo manteve-se um fluxo constante de 24 ml por hora, sendo

coletadas frações de 2 ml que tiveram suas absorvâncias monitoradas a 280nm. Na calibração prévia da coluna foram utilizados os seguintes padrões protéicos: albumina sérica bovina (66,0 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa) e citocromo C (14,4 kDa).

4.15- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS E β -MERCAPTOETANOL

Os picos obtidos por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol, segundo o método descrito por LAEMMLI (1970) adaptado para o uso em sistema Multiphor Eletrophoresis II Pharmacia LKB 2117.

Para montagem das placas, foi usado um gel de concentração (3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3×10^3 mM, pH 8,8) e um gel de separação (acrilamida 12,5% dissolvida em tampão TRIS-HCl 3×10^3 mM, pH 8,8). As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, contendo glicerol a 26 %, SDS 1%, β -mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol. Em seguida, a amostra foi incubada a 100 °C por 10 minutos. Alíquotas de 15 μ l foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de concentração. A corrida eletroforética realizada a uma corrente constante de 40 mA por um período aproximado de 180 minutos. As bandas protéicas obtidas, foram reveladas mediante coramento com solução Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25 % em metanol, ácido acético e água (4,0:0,7:5,3; v/v/v) por um período de 18 horas. O descoramento foi realizado em uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1,0:8,0; v/v/v). Proteínas de massas moleculares aparentes conhecidas (lactoalbumina, 14,4 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa;

ovalbumina, 43,0 kDa e albumina sérica bovina, 66,0 kDa) foram usadas como marcadores de massa molecular.

4.16- ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A lectina purificada de *G. cornea* foi submetida à eletroforese bidimensional para a determinação do seu ponto isoelétrico seguindo a metodologia descrita por SOUSA (1999). A focalização isoelétrica da lectina (1ª dimensão-horizontal) foi realizada utilizando-se uma tira de gel de poliacrilamida (IPG) contendo um gradiente de pH imobilizado (pH variando de 3 a 10) e comprimento de 110,0 x 3,0 x 0,5 mm (Pharmacia). No experimento de eletroforese (2ª dimensão-vertical) foi utilizado um gel de separação contendo 15% do monômero de poliacrilamida. Para a focalização isoelétrica foi realizada uma reidratação prévia da tira de IPG através da adição de uma solução de reidratação (Uréia 7 M, Tiouréia 2 M, DTT 65mM, Triton X-100 1%, Pharmalyt 3-10 0,5% e traços de Azul de Bromofenol). Em seguida 200 µL da solução de lectina (1mg/250 µL da solução de reidratação) foram colocados em contato com o gel (tira de IPG) na cuba do sistema de Reswelling Tray (Pharmacia) que foi posteriormente coberto com 500 µL de óleo mineral a fim de evitar a cristalização da uréia e incubado "over night". Passado este período, a tira de IPG foi removida da cuba e lavada com água milli-Q para eliminar o excesso do óleo mineral. A focalização isoelétrica da lectina (corrida em 1ª dimensão - horizontal) foi então realizada no gel de IPG utilizando-se o sistema Multiphor II (Pharmacia) onde, foi inicialmente aplicada uma voltagem de 300V/2mA por 1 minuto, seguida de uma voltagem de 3500V/2mA por 4 horas. Após a corrida de focalização isoelétrica a tira de IPG foi removida do sistema, equilibrada com uma solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2% e traços de azul de bromofenol) contendo DTT (19,2 mg/ml) por 15 minutos para a manutenção da lectina focalizada na forma desnaturada. A tira de IPG foi então colocada sobre o gel de poliacrilamida a 15%

para a transferência da lectina focalizada e corrida eletroforética em 2ª dimensão (vertical) que foi iniciada a uma voltagem de 500V/10mA durante 15 minutos e seguida de uma voltagem de 500 V/20mA por mais 4,30 horas. Após a corrida eletroforética o gel foi removido da placa e a lectina revelada mediante tratamento com nitrato de prata, seguindo método descrito por BLUN *et al.* (1987).

4.17- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO EXTRATO BRUTO, TOXINA E LECTINA DA ALGA *G. CORNEA* SOBRE O CICLO EVOLUTIVO DO CARRAPATO BOVINO *B. microplus*

Os ensaios foram conduzidos sob condições controladas de temperatura e umidade (28 °C e 80%, respectivamente) em estufa BOD, utilizando-se fêmeas ingurgitadas, de bovinos leiteiros infestados naturalmente conforme demonstrado na **FIGURA 2**. As teleóginas foram pesadas e reunidas em grupos homogêneos de 15 indivíduos (n= 15). Em seguida, foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente. O grupo controle foi imerso em água destilada, enquanto os demais foram submetidos a imersão nas frações protéicas (extrato total, toxina e lectina) durante 5 minutos.

Posteriormente, as teleóginas foram fixadas com fita dupla face em placas de petri, permanecendo com o dorso voltado para cima e mantidas na estufa BOD nas condições já descritas. Iniciada a oviposição (postura), os ovos foram coletados diariamente de cada teleógina, pesados e transferidos para seringas descartáveis de 5 ml, sendo estas então, seladas com algodão e mantidas na estufa BOD. Ao término da oviposição (ca. 3000 ovos/teleógina), o peso das quenóginas, fêmeas após postura (PQ), e o peso da massa total dos ovos (PMTO) foram utilizados para os cálculos dos índices das eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEN).

A eclosão dos ovos e a mortalidade das larvas foram acompanhadas com o auxílio de lupa, sendo os dados obtidos em percentual (1, 5, 10, 20, 30,

60%, etc.) de ovos e de larvas, utilizados para a avaliação dos períodos de postura da teleóginas (PPT), incubação (PI) eclosão (PE) dos ovos, seguidos da percentagem de eclosão (%E) e dos períodos de sobrevivência (PS) e mortalidade (PM).

Nos cálculos das eficiências reprodutiva, nutricional e do produto foram empregadas as fórmulas de DRUMMOND et al. (1973) conforme descritas a seguir:

$$ER = \frac{PMOT \times \%E \times 20.000}{PQ}$$

$$EN = \frac{PMOT}{PI - PQ}$$

Onde:

PI = peso inicial da teleógina

PQ = peso da quenógina

$$EP = \frac{(ER_C - ER_E) \times 100}{ER_C}$$

Onde:

EP = eficiência do produto

ER_C = eficiência reprodutiva do grupo controle

ER_E = eficiência reprodutiva do grupo experimental

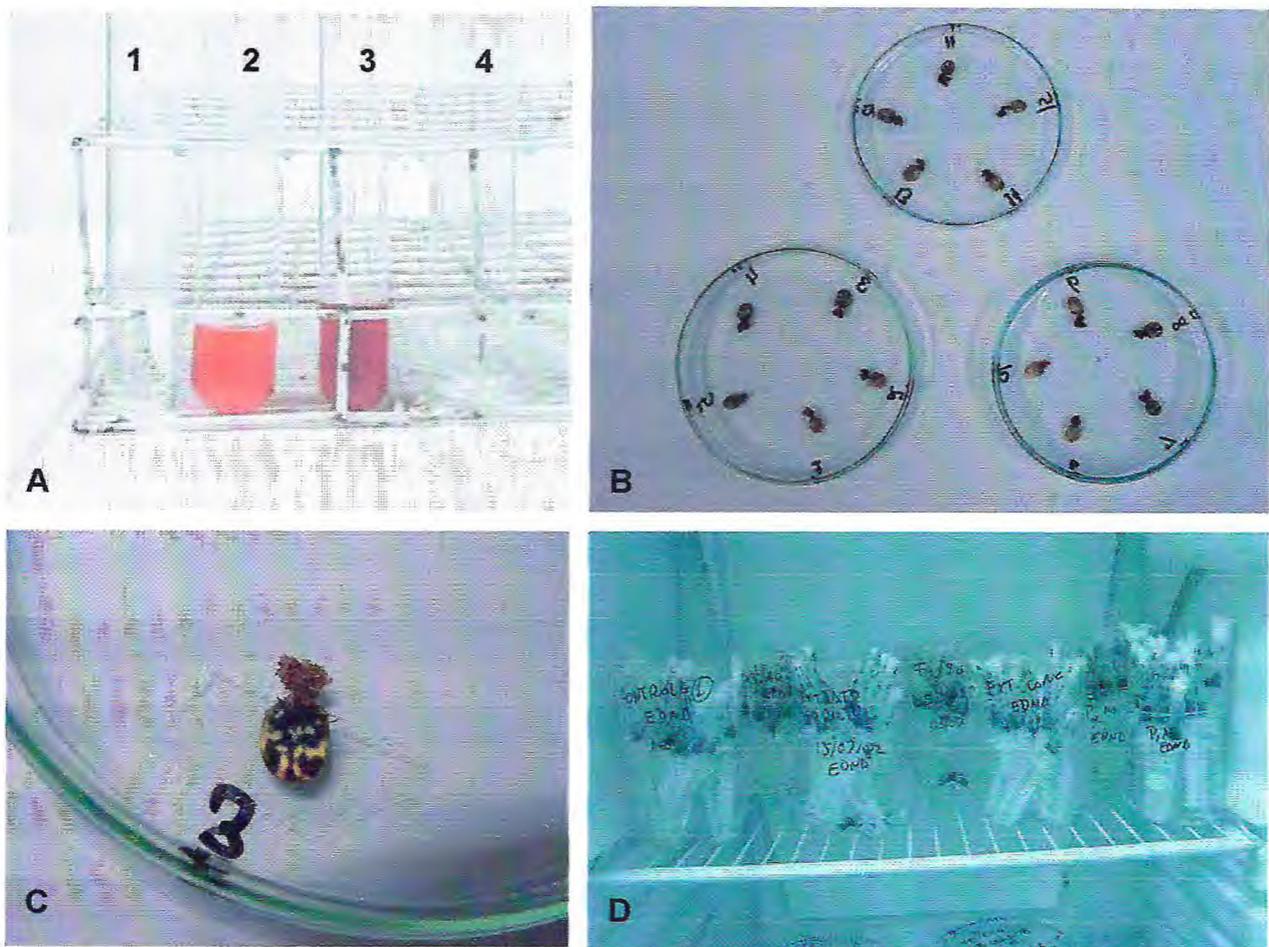


FIGURA 02- Ensaio de avaliação da atividade tóxica do extrato bruto, toxina e PII-lectina da alga *G. cornea* sobre o ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*. A- Imersão das teleóginas: 1- Água (controle), 2- Extrato bruto, 3- toxina e 4- Lectina; B e C- Oviposição e D- Eclosão até a morte das larvas.

4.18- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas análises estatísticas de variância e significância dos resultados obtidos com os experimentos utilizou-se o procedimento GLM do sistema SAS, versão 6.11. O teste de DUNNET foi utilizado para comparar as médias obtidas com os tratamentos em relação ao controle ($p < 0,05$) e o teste de TUKEY para comparação entre as médias dos tratamentos ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- CARACTERIZAÇÃO DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea*

A alga marinha vermelhas *Gracilaria cornea* pertencente a divisão Rhodophyta, ordem Gracilariales e família Gracilariaceae possui talo ereto crescendo em tufos ou isoladamente, fixo ao substrato por nítido apressório achatado ou cilíndrico ramificado, com margens dissecadas por numerosos ramos curtos ou não, com ramificações predominantemente em um só plano. Organização multiaxial. Corpósporos numerosos originados da maioria das células (FIGURA 03).

5.2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A alga vermelha *G. córnea*, em relação à sua composição química (TABELA 02) apresentou elevados teores de carboidratos, umidade cinzas e fibras (68,35%, 56,33%, 19,74% e 8,5%, respectivamente). Estes resultados são comparáveis com os obtidos para algumas algas vermelhas (BENEVIDES *et al.*, 1998a). É bom salientar que esses componentes químicos podem sofrer alterações em suas concentrações, dependendo das variações sazonais relacionadas ao habitat e fatores ambientais (salinidade, temperatura, intensidade da luz solar e concentração de nutrientes), conforme foi demonstrado para as espécies *Gracilaria domingensis* e *Gelidium pusillum* (BENEVIDES *et al.*, 1999). A alga *G. cornea* também foi analisada em relação a sua composição química de alguns minerais (ferro, fósforo, cálcio e magnésio) e ao conteúdo de vitamina C. Os teores encontrados foram: cálcio (3,80 mg/100g), magnésio (140,20 mg/100g), ferro (3,85 mg/100g) e fósforo (31,30 mg/100g). Os resultados obtidos para estes minerais evidenciaram teores mais elevados para o magnésio (140,20 mg/100g) e cálcio (3,80 mg/100g). O teor de cálcio diverge do obtido para a alga *Amansia*

Divisão: Rhodophyta

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: Gracilaria

Espécie: *Gracilaria cornea* (J. Agardh)



FIGURA 03: Alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (J. Agardh).

TABELA 02 - Análise elementar da alga marinha vermelha *G. cornea*

Constituinte	Teor na amostra (%)
Umidade	56,33
Base Seca	
Cinzas	8,50
*Proteína Total	3,28
Lipídio	0,13
**Carboidrato total	68,35
Fibra	19,74
	Minerais (mg/100g de amostra)
Cálcio	3,80
Magnésio	140,20
Fósforo	31,30
Ferro	3,85
Vitamina C	8,60
Valor calórico total (Kcal/100g)	287,69

* Nitrogênio total x 6,25.

** Obtido por diferença.

multifida (SILVEIRA, 2001), que apresentou um elevado teor deste mineral (800 mg/100g). Com relação à vitamina C, a alga marinha *G. cornea* apresentou um teor de 8,60 mg/100g, considerado baixo quando comparado ao obtido para a alga marinha verde *Ulva fasciata* (165,8 mg/100g) (PEREIRA, 2000), que sugeriu ser a mesma considerada uma rica fonte em vitamina C. O valor calórico total obtido foi de 287,69 Kcal/100g da amostra. Esse resultado é menor que o obtido para as algas vermelhas *Amansia multifida* (387,8 mg/Kg de alga) por SILVEIRA 2001 e *Gracilaria ornata* (380,45) por LEITE (2003).

5.3- DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE SANGUÍNEA

A atividade hemaglutinante do extrato total concentrado de *G. córnea* contra diferentes eritrócitos (coelho, galinha e de humanos do sistema ABO) tratados enzimaticamente com tripsina é mostrada na **TABELA 03**. O extrato concentrado não aglutinou os eritrócitos de coelho e humanos do sistema ABO mostrando especificidade por eritrócitos de galinha e apresentando uma atividade hemaglutinante de 64 UH/ml.

5.5- DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Os ensaios referentes à inibição da atividade hemaglutinante (**TABELA 04**) mostraram que no extrato concentrado da alga marinha *G. cornea*, a atividade foi inibida pelo açúcar simples D-xilose, na concentração de 25 mM e pelas glicoproteínas mucina e fetuína, nas concentrações de 6,25 µg/ml e 3,12 µg/ml, respectivamente. Dados encontrados na literatura têm revelado que as lectinas de algas marinhas necessitam de estruturas maiores e mais complexas para

TABELA 03 - Especificidade da atividade aglutinante do extrato total concentrado da alga marinha *G. cornea*.

Enzima	Eritrócitos				
	Coelho	Galinha	Humano		
			A	B	O
Tripsina	-	64*	-	-	-

* UH/ml - inverso da maior diluição ainda capaz de causar aglutinação de eritrócitos a 2%.

- Não detectado.

TABELA 04- Inibição da atividade hemaglutinante no extrato concentrado da alga marinha *Gracilaria cornea* por açúcares simples e glicoproteínas

Açúcar / Glicoproteína	Concentração Mínima
Açúcares Simples	(mM)*
D – Xilose	25,0
D – Glucose	-
L – Fucose	-
D – Fucose	-
D – Celobiose	-
D- Melibiose	-
D- Rafinose	-
β - Lactose	-
L – Arabinose	-
D – Galactose	-
D – Glucosamina	-
D – Frutose	-
Lactulose	-
Glicoproteínas	(μg/ml)**
Mucina de porcina	6,25
Fetuína	3,12
Manana	-
Egg White	-
Avidina	-
Ovalbumina	-

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

** Concentração mínima (μ g/ml) da glicoproteína capaz de inibir a atividade hemaglutinante.

(–) Não inibiu

estabelecerem a ligação lectina-carboidrato (RINUI, 1995). Observa-se que a atividade hemaglutinante no extrato concentrado foi inibida por somente um açúcar simples, fato comum entre muitas lectinas isoladas de algas marinhas (SHIOMI *et al.*, 1980; ROGERS & TOPLISS, 1993).

5.6- EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

No ensaio com o objetivo de demonstrar os efeitos de cátions divalentes na atividade hemaglutinante, observou-se que os cátions divalentes Ca^{+2} e Mn^{+2} não influenciaram na atividade hemaglutinante da alga marinha *G. cornea*, quando o extrato foi dialisado contra EDTA 5 mM. De acordo com dados existentes na literatura, a atividade hemaglutinante presente em algas vermelhas não requer cátions divalentes para exercer a aglutinação de células. Conforme observado por ROGERS *et al* (1980), dentre as algas vermelhas analisadas, somente as lectinas do gênero *Ptilota* apresentaram dependência. ROGERS & HORI (1993) posteriormente relataram que lectinas de algas marinhas que interagem com glicoproteínas sem reconhecerem monossacarídeos, não dependem de cátions divalentes. Ainda, conforme outros dados posteriores relatados na literatura, algumas lectinas de algas vermelhas como as de *Ptilota filicina* (SAMPAIO *et al.*, 1998a), *Enantioladia duperreyi* (BENEVIDES *et al.*, 1998b) *Vidalia obtusiloba* (MELO, 2000) e verdes *Ulva lactuca* (SAMPAIO *et al.*, 1998b) e *Ulva fasciata* (PEREIRA, 2000), tiveram suas atividades abolidas após diálise em presença de quelante .

5.7- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante presente no extrato concentrado de *Gracilaria cornea* apresentou-se estável ao aquecimento por 20 minutos à temperatura de 40 °C, tornando-se inativa a 50 °C por 5 min (**FIGURA 04**).

Algumas lectinas de algas marinhas podem ser consideradas termolábeis, como as de *Agardhiella tenera* (SHIOMIO *et al.*, 1989), *Cystoclonium purpureum* (KAMIYA *et al.*, 1980), *Carpopeltis flabelata* (HORI *et al.*, 1987) e *Solieria filiformis* (BENEVIDES *et al.*, 1996), com perda total ou quase total de atividade quando aquecidas a temperaturas inferiores ou iguais a 60 °C, confirmando ainda o estudo de COSTA *et al.* (1999), que mostraram que a atividade hemaglutinante da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* foi completamente inativada a 50 °C por 20 min.

O $\Delta G'$ de ativação do processo de desnaturação da lectina da lectina de *G. cornea* foi de 97,148 kJ.mol⁻¹ (23,24 kcal/mol) a 40 °C. O cálculo foi obtido a partir da **FIGURA 05**. Esse resultando é concordante com os obtidos para algumas algas marinhas e para a alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* (106,87 kJ . mol⁻¹) por OLIVEIRA *et al.* (2002).

5.8- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA

O extrato concentrado da alga marinha *G. cornea* mostrou-se tóxico para camundongos quando injetado por via ip. dentro de um período de 24 horas, apresentando uma DL₅₀ de 104 mg de proteína/ Kg de peso do animal. Os efeitos observados incluíram depressão respiratória, xeroftalmia e convulsões tônico-clônicas que antecederam a morte dos animais (**FIGURA 06**). SILVEIRA (2001), trabalhando com a alga vermelha *Amansia multifida*, também observou que a toxina na alga citada, quando injetada por via ip. em camundongos, os mesmos

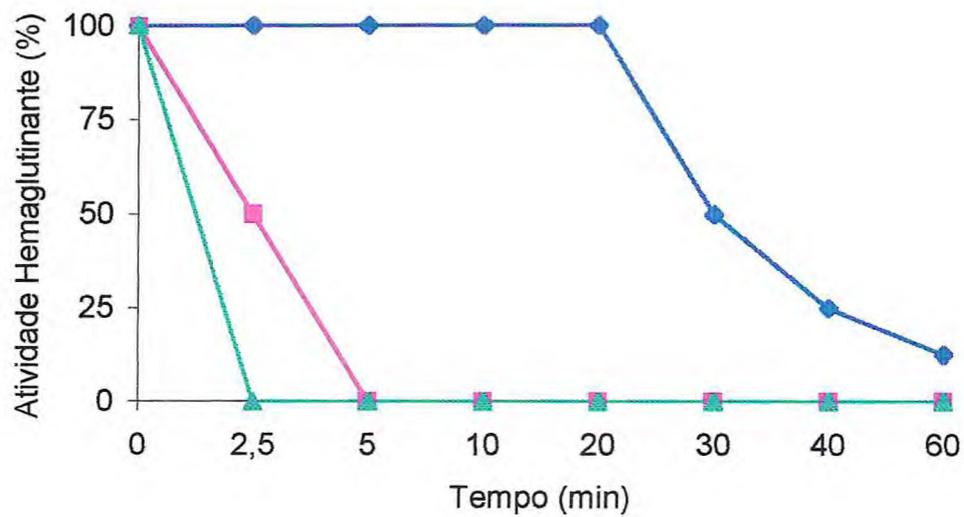


FIGURA 04- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante presente no extrato concentrado de *Gracilaria cornea.*; (◆—◆) 40°C; (■—■) 50°C e (▲—▲) 60 °C.

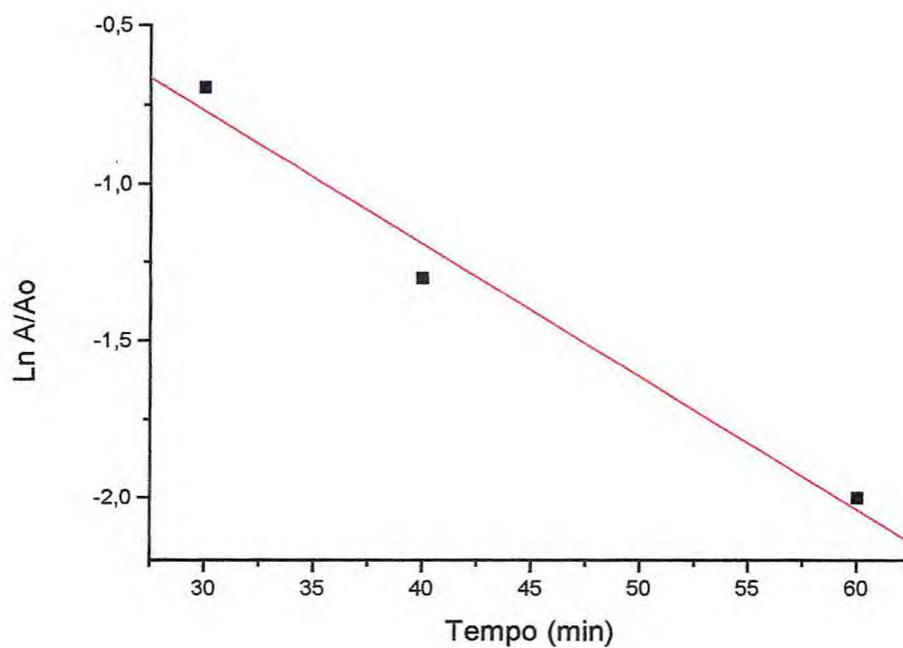


FIGURA 05 – Gráfico de $\ln A/A_0$ versus tempo de aquecimento da lectina de *G. cornea* na temperatura de 40°C.



FIGURA 06 - Convulsão e morte de camundongos causadas pela toxina de *Gracilaria cornea*.

apresentavam depressão respiratória, xeroftalmia, convulsão tônico-clônica, além de ataxia locomotora.

5.9- TERMOESTABILIDADE DA ATIVIDADE TÓXICA

A estabilidade térmica da atividade tóxica foi realizada e verificou-se que quando alíquotas de extrato concentrado foram submetidas ao aquecimento a 50°C até 30 min, a atividade tóxica permaneceu estável. No entanto, a 60°C por 5 min, tornou-se totalmente inativada (**TABELA 05**).

5.10- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE UREÁSICA

A atividade ureásica foi realizada no extrato concentrado e de acordo com os resultados não foi detectada nenhuma atividade desta enzima no extrato analisado.

5.11 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS (LECTINA E TOXINA)

Tendo em vista a presença das atividades hemaglutinante (eritrócitos de galinha) e tóxica (camundongo, via ip.) no extrato protéico bruto concentrado e aos experimentos preliminares de estabilidade da toxina e da atividade hemaglutinante, deu-se prosseguimento aos estudos de purificação das proteínas lectina e toxina da alga marinha vermelha *G. cornea*. A toxicidade e a atividade hemaglutinante foram avaliadas em cada etapa de purificação, sendo a atividade tóxica, dependendo das frações protéicas obtidas, avaliada por via ip. ou via iv.

TABELA 05- Efeito da temperatura sobre a atividade tóxica presente no extrato bruto concentrado da alga marinha vermelha *G. cornea*.

Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Atividade Tóxica ^a
50	2,5	++++
	5	++++
	10	++++
	20	++++
	30	++++
60	2,5	+ - - -
	5	- - - -
	10	- - - -
	20	- - - -
	30	- - - -

(a) Atividade tóxica (n=4) expressa em percentagem de animais mortos, após injeção ip. do extrato concentrado (dose de 0,42 mg de proteína/10 g de peso corpóreo de camundongo, capaz de matar 100% dos animais testados). (++++) 100% e (+) 25%.

(-) Não detectada.

5.11.1 -Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B

O perfil cromatográfico obtido por aplicação do extrato concentrado da alga *G. córnea* em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B mostrou a existência de três picos cromatográficos (**FIGURA 07**). No primeiro pico (PI), não retido na coluna, de coloração marrom, eluído com tampão tris-HCl 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 4 M, encerrando 3,08% das proteínas introduzidas na coluna, foi observada a presença de atividade tóxica para camundongos por via ip. e isento de atividade hemaglutinante. No segundo pico (PII), levemente pigmentado, eluído com tampão tris-HCl 25 mM, pH 7,5, correspondendo a 5,1% das proteínas introduzidas na coluna, contendo toda a atividade hemaglutinante e isento de atividade tóxica para camundongo por vias ip. e iv. No terceiro pico, isento de pigmento, eluído com água destilada e livre de atividades hemaglutinante e tóxica. Assim, o emprego desse procedimento foi decisivo para estabelecer a separação de proteínas com atividades hemaglutinante e tóxica.

5.11.2 - Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 do PI -HIC

O pico PI resultante da cromatografia de interação hidrofóbica, e contendo atividade tóxica quando submetido a cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100, apresentou um perfil cromatográfico contendo dois picos protéicos (**FIGURA 08**). O primeiro pico (PI), levemente pigmentado, apresentou atividade tóxica e o segundo pico (PII) apresentou-se despigmentado e livre de atividade tóxica. A toxina obtida por este procedimento (DL_{50} 5,18 mg/Kg de peso do animal por via ip.) apresentou um rendimento de atividade tóxica de

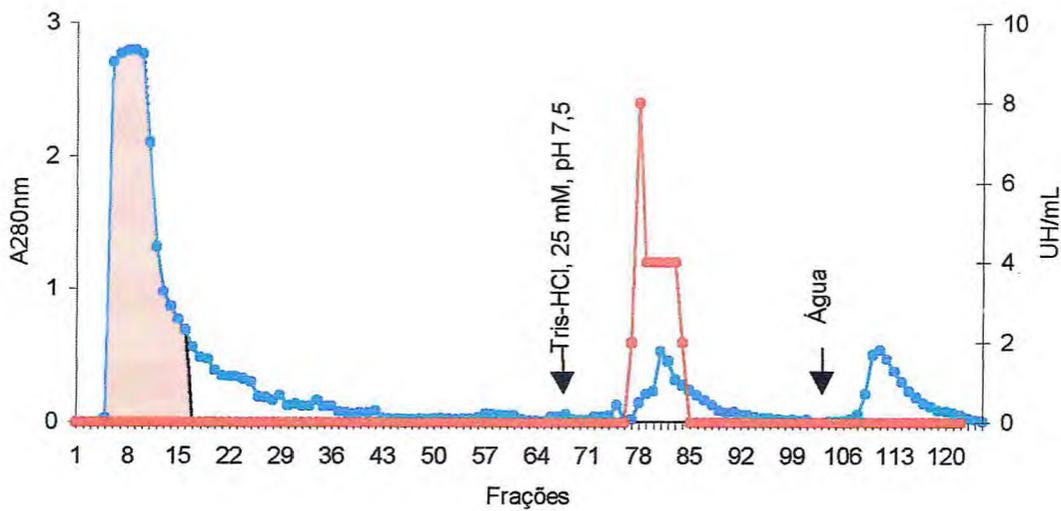


FIGURA 07- Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B do extrato bruto concentrado da alga *Gracilaria cornea*. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 4M. (●—●) A₂₈₀ ; (●—●) UH/ml e  Atividade tóxica.

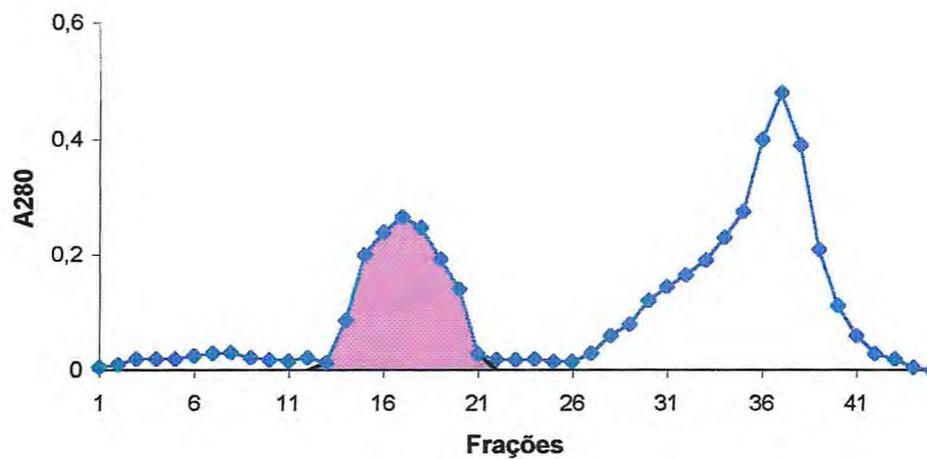


FIGURA 08 – Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PI da HIC. A coluna foi previamente equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Coluna: 85 x 1,6 cm, frações 3,0 mL/tubo. (●—●) A₂₈₀ e ■ Atividade tóxica.

4,98% com índice de purificação de 20,1 vezes em relação ao extrato concentrado (TABELA 06).

5.11.3 - Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 do PII -HIC

O pico PII resultante da cromatografia de interação hidrofóbica, e contendo atividade hemaglutinante quando submetido a cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100, apresentou um perfil cromatográfico contendo dois picos protéicos (FIGURA 09). O PI encerrando toda atividade hemaglutinante e o PII livre de atividade hemaglutinante. A lectina obtida por este procedimento apresentou um rendimento de atividade hemaglutinante de 27,2% e um índice de purificação de 10,5 vezes em relação ao extrato bruto concentrado (TABELA 07).

5.12- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LECTINA E DA TOXINA POR FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100

A determinação das massas moleculares aparentes da toxina e da lectina nas formas nativas de *G. cornea*, obtidas através do mesmo procedimento cromatográfico utilizado na purificação, foram estimadas em 66,0 kDa para a lectina e 71,56 para a toxina (FIGURAS 10 e 11), tendo sido estabelecidas por regressão linear em relação aos padrões protéicos de calibração da coluna.

TABELA 06 – Purificação da toxina de *Gracilaria cornea*

Frações	Proteína		Atividade Tóxica		
	(mg/mL)	Total	DL ₅₀ ^a (mg/Kg)	Rendimento ^b (%)	Índice Purificação ^c (x)
Extrato concentrado	0,928	139,2	104	100	1,0
PI-HIC	0,476	4,53	10,7	10,2	9,7
PI-Sephadex	0,054	0,33	5,18	4,98	20,1

^a Miligramas de proteína capaz de matar 50% dos animais testados por via ip. ou iv.

^b O rendimento indica a recuperação da atividade tóxica em cada etapa de purificação.

^c O índice de purificação foi calculado através da relação da DL₅₀ de cada passo de purificação.

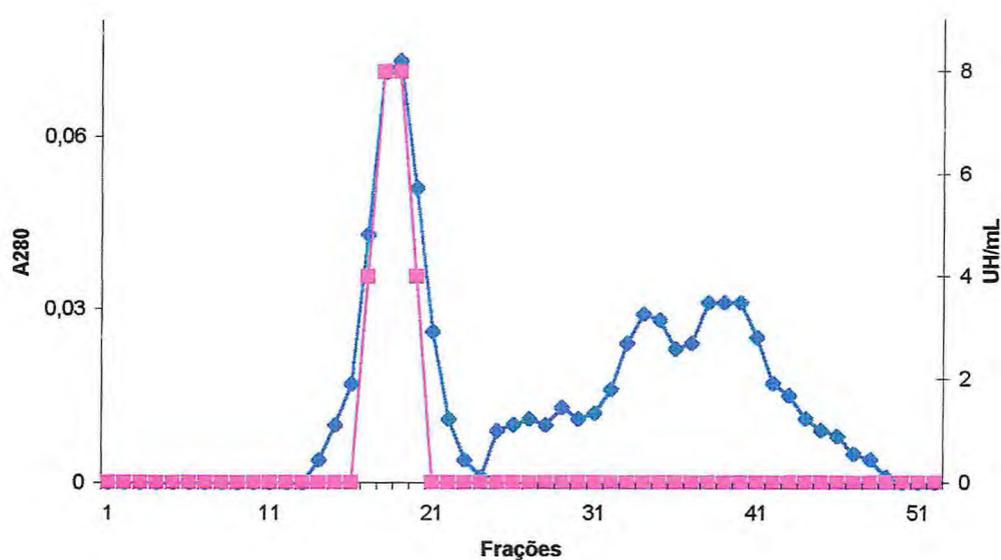


FIGURA 09 – Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PII da HIC. A coluna foi previamente equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Coluna: 85 x 1,6 cm, frações 3,0 mL/tubo. (●—●) A280 e (●—●)UH/mL.

TABELA 07 – Purificação da lectina de *Gracilaria cornea*

Frações	Proteína (mg)	Rendimento %	Atividade Hemaglutinante		Purificação (x)
			UH Total *	Específica**	
Extrato concentrado	139,2	100	5632	49,0	1,0
PII-HIC	7,10	6,18	1536	216,3	4,4
PI-Sephadex	0,25	0,21	128	516,1	10,5

* U.H. Total – Unidades de hemaglutinação Total

** U.H./mg de proteína

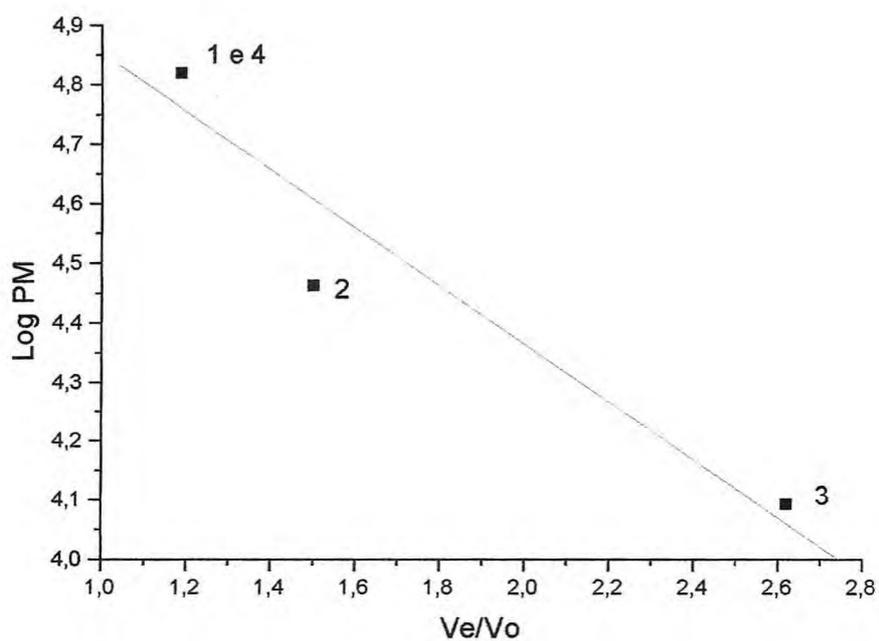


FIGURA 10- Massa molecular da lectina da alga marinha *Gracilaria cornea* por filtração em gel de Sephadex G-100. 1-Albumina sérica bovina (66,0 kDa); 2- anidrase carbônica (29,0 kDa); 3- citocromo C (14,4 kDa); 4- Lectina (66,0 kDa).

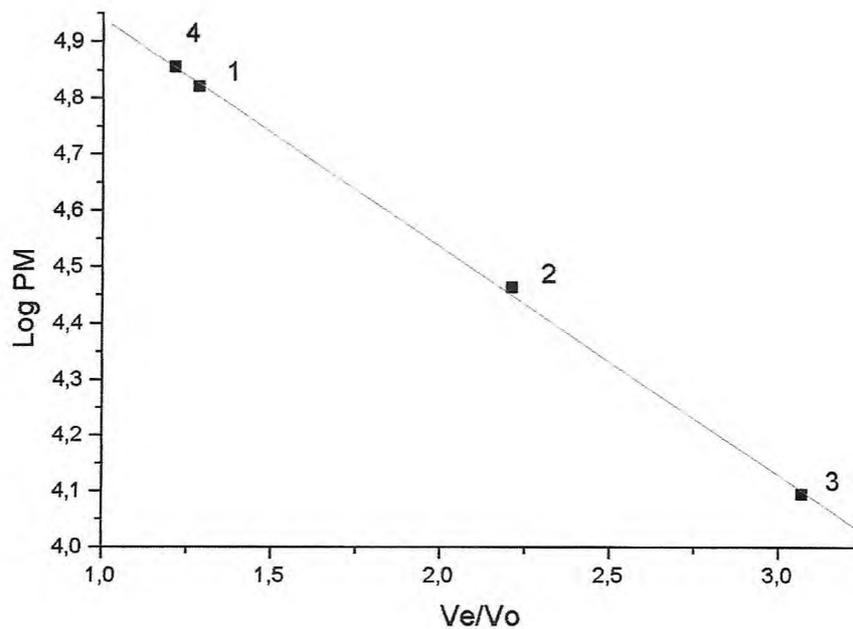


FIGURA 11- Massa molecular da toxina da alga marinha *Gracilaria cornea* por filtração em gel de Sephadex G-100. 1-Albumina sérica bovina (66,0 kDa); 2- anidrase carbônica (29,0 kDa); 3- citocromo C (14,4 kDa); 4- Toxina (71,6 kDa).

5.13- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LECTINA E DA TOXINA POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS E β -MERCAPTOETANOL

O pico PI-Sephadex G-100, contendo atividade hemaglutinante ao ser avaliado com relação a homogeneidade da lectina e ao seu grau de pureza, por eletroforese em PAGE-SDS na ausência e presença de β -mercaptoetanol, apresentou uma única banda protéica de massa molecular na faixa de 56,48 kDa, sugerindo ser a lectina uma proteína monomérica (**FIGURA 12**).

Com relação ao pico PI-Sephadex G-100, contendo atividade tóxica, quando avaliado quanto ao grau de pureza e homogeneidade por eletroforese em PAGE-SDS em ausência e presença de β -mercaptoetanol, este apresentou uma única banda protéica de massa molecular na faixa de 35,0 kDa, sugerindo ser a toxina uma proteína dimérica, quando este resultado é comparado com o obtida para a sua forma nativa (**FIGURA 13**).

O valor da massa molecular obtido para lectina da alga *G. cornea* (66,0 kDa) contraria a afirmação de HORI *et al.* (1986) de que as lectinas de algas marinhas geralmente apresentam baixa massa molecular (4,2 kDa a 43,0 kDa). No entanto este valor é concordante com a massa molecular obtida para lectina da alga *P. serrata* (64,5 kDa) por ROGERS *et al.* (1990) e com o obtido para a lectina da alga *Palmaria palmata* (62,0 kDa) por ROGERS E FISH *et al.* (1991). O resultado encontrado na alga *G. cornea* será analisado levando em consideração algumas lectinas purificadas de algas marinhas. A lectina isolada da alga marinha vermelha *Agardhiella tenera* apresentou massas moleculares de 12 kDa por filtração em gel e de 13 kDa por eletroforese em gel de Poliacrilamida em presença de SDS. Trata-se de uma glicoproteína monomérica presente na forma β , encerrando 27% de glucose (SHIOMI *et al.*, 1979). Entre espécies do gênero *Gracilaria*, encontra-se a lectina de *Gracilaria bursa-pastoris*, purificada por OKAMOTO *et al.* (1990), denominada de "Granin-BP", com massa molecular de 15,5 kDa, obtida por filtração em gel e 30 kDa em SDS-PAGE.

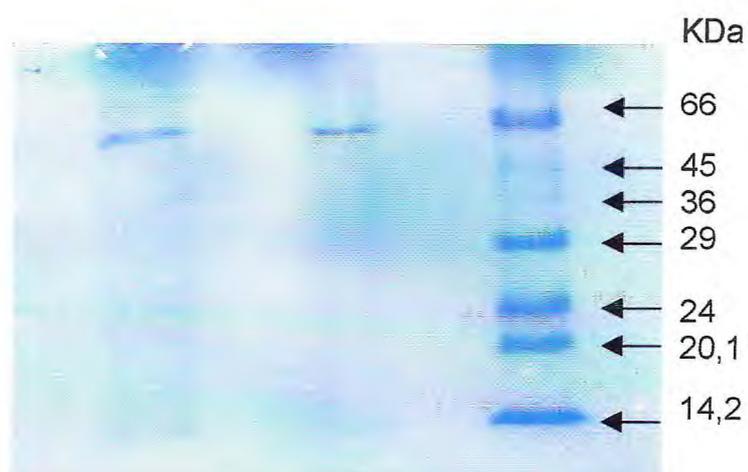


FIGURA 12- Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da fração contendo atividade hemaglutinante obtida por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100.

1 – PI da Sephadex G-100 na presença de β -mercaptoetanol

2 - PI da Sephadex G-100 na ausência de β -mercaptoetanol

3 – Marcadores - Lactoalbumina, 14,4 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovalbumina, 45,0 kDa e BSA, 66,0 kDa.

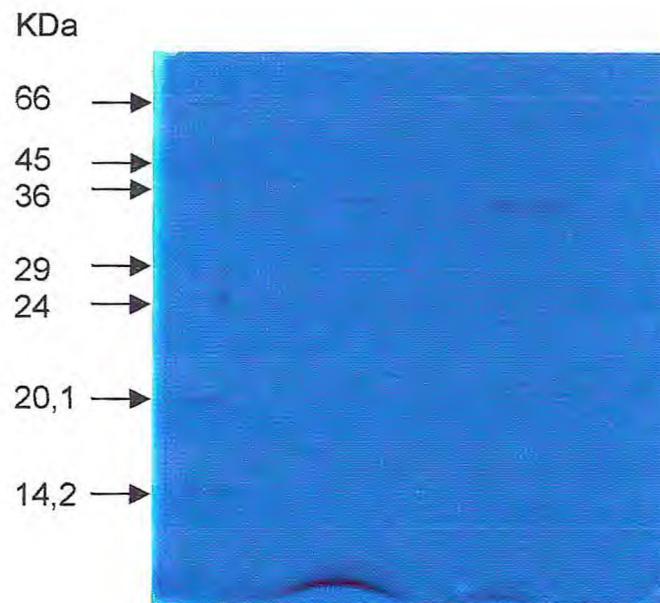


FIGURA 13- Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da fração contendo atividade tóxica obtida por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100.

- 1 – PI da Sephadex G-100 na presença de β -mercaptoetanol
- 2 - PI da Sephadex G-100 na ausência de β -mercaptoetanol
- 3 – Marcadores - Lactoalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovalbumina, 45,0 kDa e BSA, 66,0 kDa.

CHILES & BIRD (1990) isolaram uma lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria tikvahiae*. Curiosamente esta proteína apresentou uma elevada massa molecular de 150 kDa por filtração em gel, quando valores de 29,7 e 24,9 kDa foram obtidos para suas subunidades por PAGE-SDS, sugerindo que a proteína de 150 kDa será um aglomerado formado por várias subunidades.

O valor encontrado para alga *G. cornea* por PAGE-SDS, como foi mostrado, comparado com a maioria das lectinas de algas é duas vezes superior às mostradas e chega a ser seis vezes o valor calculado por filtração em gel de Superose 12R para a lectina de *Gracilaria caudata*, correspondente a 10 kDa (NEVES *et al.*, 2001).

5.14- DETERMINAÇÃO DO PI DA LECTINA DE *G. cornea*

O ponto isoelétrico da lectina de *G. cornea*, determinado por eletroforese bidimensional (**FIGURA 14**) evidenciou a presença de uma banda protéica de pI na faixa ácida com pH de 4,3. Esse resultado está de acordo com o sugerido por SHIOMI *et al.* (1981), KAMIYA *et al.* (1982) e HORI *et al.* (1990), que relatam ser as lectinas de algas, moléculas com pIs compreendidos entre pH 3,8 e 6,9.

COSTA *et al.* (1999) também avaliando o valor do pI para a lectina da alga vermelha *Amansia multifida* encontraram cinco isolectinas com pontos isoelétricos variando de 5,45 a 6,25. MELO (2000) também avaliando o pI da lectina da alga *Vidalia obtusiloba* encontrou uma única banda na faixa ácida de pI com valor de pH compreendido entre 4 e 5.

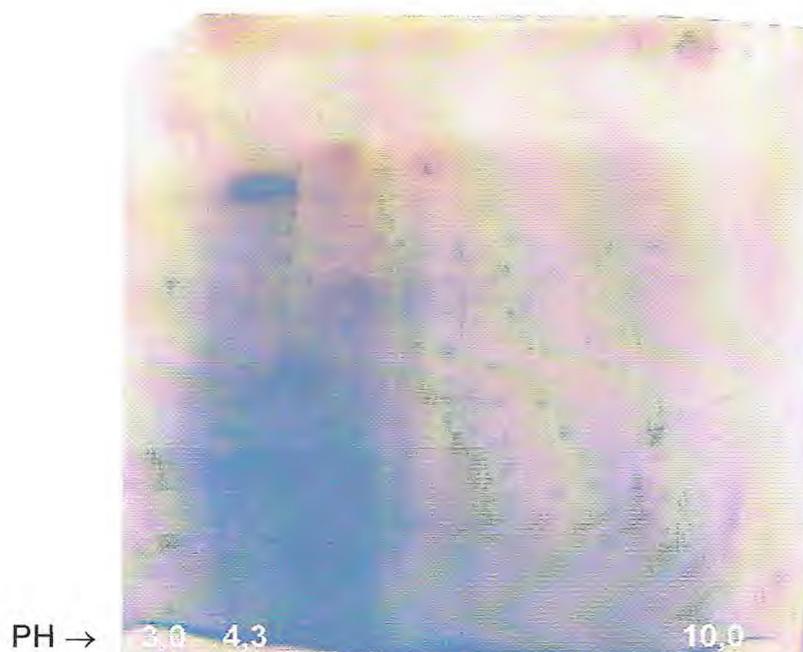


FIGURA 14- Ponto isoelétrico da lectina de *G. cornea* por Eletroforese Bidimensional.

5.15- DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS DA TOXINA E DA LECTINA

As frações ativas obtidas por filtração em gel de Sephadex G-100 dos picos I e II provenientes da cromatografia de interação hidrofóbica, quando avaliadas com relação a seus possíveis conteúdos estruturais em carboidratos, revelaram ser a toxina e a lectina glicoproteínas constituídas por 36,8% e 52,3% de carboidratos, respectivamente. A literatura mostra que FERREIROS & CRIADO (1983) isolaram uma lectina da alga parda *Fucus vesiculosus* com 90% de carboidrato, enquanto que KANOH *et al.* (1992) isolaram a lectina de *Gracilaria verrucosa* com 92% de carboidrato.

5.16- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DO EXTRATO BRUTO, DA TOXINA E LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea* SOBRE O CICLO EVOLUTIVO DO CARRAPATO BOVINO *B. microphilus*

Os resultados da avaliação de toxicidade das frações protéicas, extrato bruto, toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo de vida do carrapato bovino *B. microphilus* foram comprovadas estatisticamente pela análise das médias obtidas dessa avaliação em relação ao controle (água) e estão mostrados nas FIGURAS 15 a 18.

Na análise dos dados obtidos para essas frações protéicas sobre as variáveis peso das teleóginas (PT), peso das quenóginas (PQ) e peso da massa total dos ovos (PMOT), demonstradas na figura 15, foram obtidos uma redução significativa da variável PT somente para os tratamentos com o extrato bruto e com a lectina (14,3 e 34,8%, respectivamente), onde a redução foi mais efetiva para o tratamento com a lectina. A avaliação do peso das quenógenas (PQ) demonstrou que esta variável apresentou um aumento de peso para o tratamento com o extrato bruto (11,0%) e uma redução para o tratamento com a lectina (17,2%), não

havendo variação significativa para a toxina. Com relação a variável PMOT foram obtidos uma redução para os três tratamentos, onde a lectina mostrou-se mais tóxica (17,8, 11,1 e 42,2 %, respectivamente). Vale salientar, que o aumento da variável PQ, obtido para o tratamento com o extrato bruto é função da retenção dos ovos nas mesmas ocasionada pelo efeito tóxico produzido por outro(s) componente (s) presente(s) na alga *G. cornea*. De maneira análoga, a redução da variável PMOT, obtida para o tratamento com o extrato bruto também pode ser justificada pela retenção de ovos nas quenóginas.

A avaliação dos períodos de postura das teleóginas (PPT), de incubação (PI) e eclosão (PE) dos ovos (FIGURA 16) demonstrou um efeito tóxico de redução para a variável PPT somente para o tratamento com o extrato bruto (9,5 dias), não havendo portanto, variações significativas para os tratamentos com a toxina e lectina em relação ao controle (12 dias). Com relação a avaliação das variáveis PI e PE, foi demonstrado uma toxicidade sobre o PI que foi comprovado com seu aumento com os três tratamentos, onde a lectina apresentou uma maior toxicidade (24 dias) em relação ao controle (20 dias). Enquanto, o efeito tóxico sobre o PE foi obtido através da sua redução também com os três tratamentos (25,9, 38,2 e 57,3%, respectivamente), também para os três tratamentos onde, a lectina também apresentou maior toxicidade (9,4 dias) em relação ao controle (22 dias).

Dando continuidade a esse estudo de avaliação da influência desses tratamentos sobre as variáveis percentagem de eclosão (%E) e os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN), mostradas na FIGURA 17, foi obtido uma redução significativa de 19,5% da %E para o tratamento com o extrato bruto, não havendo portanto, nenhuma variação significativa para os outros tratamentos (toxina e lectina). Os efeitos tóxicos de redução das IER e IEN também foram evidenciados somente para o tratamento com o extrato bruto (14,6 e 15,5%, respectivamente).

Ainda, com relação aos estudos de atividade tóxica desses tratamentos sobre as variáveis períodos de mortalidade (PM) e de sobrevivência (PS) larval, demonstrados na FIGURA 18, foi demonstrado que o PM foi reduzido

significativamente somente para o tratamento com o extrato bruto (48 dias), quando comparado ao controle (67 dias), sugerindo assim, a presença de outros componentes tóxicos neste tratamento. A avaliação da variável PS, demonstrou uma redução mais significativa para o tratamento com a lectina (67,3 dias), também avaliada em relação ao controle (98 dias), sugerindo portanto, ser a lectina o componente mais tóxico presente na alga *G. cornea*.

A TABELA 8 mostra a comparação entre as médias dos tratamentos extrato bruto, toxina e lectina, onde foi verificada uma variação significativa para as variáveis PT, PQ, PMOT, PE, %E, IEN, PM e PS. A lectina mostrou-se mais tóxica que os outros tratamentos, visto que ocasionou uma maior redução da oviposição (massa total de ovos), do período de eclosão dos ovos e da sobrevivência larval, comprovando desta maneira sua maior eficiência. Além disso, o extrato bruto mostrou uma maior redução do período de mortalidade larval, sugerindo a existência de outros componentes tóxicos na alga *G. cornea*

Portanto, diante desses resultados preliminares de atividade tóxica, podemos concluir que o extrato bruto e a lectina da alga marinha *G. cornea* poderão ser empregados como uma ferramenta importante no estudo das diferentes fases do ciclo de vida do carrapato bovino *B. microplus*, assim como, contribuir com dados para estudos posteriores de utilização de algas marinhas no controle de ectoparasitas, visto a inexistência de trabalhos relacionados a esta atividade presente em algas na literatura.

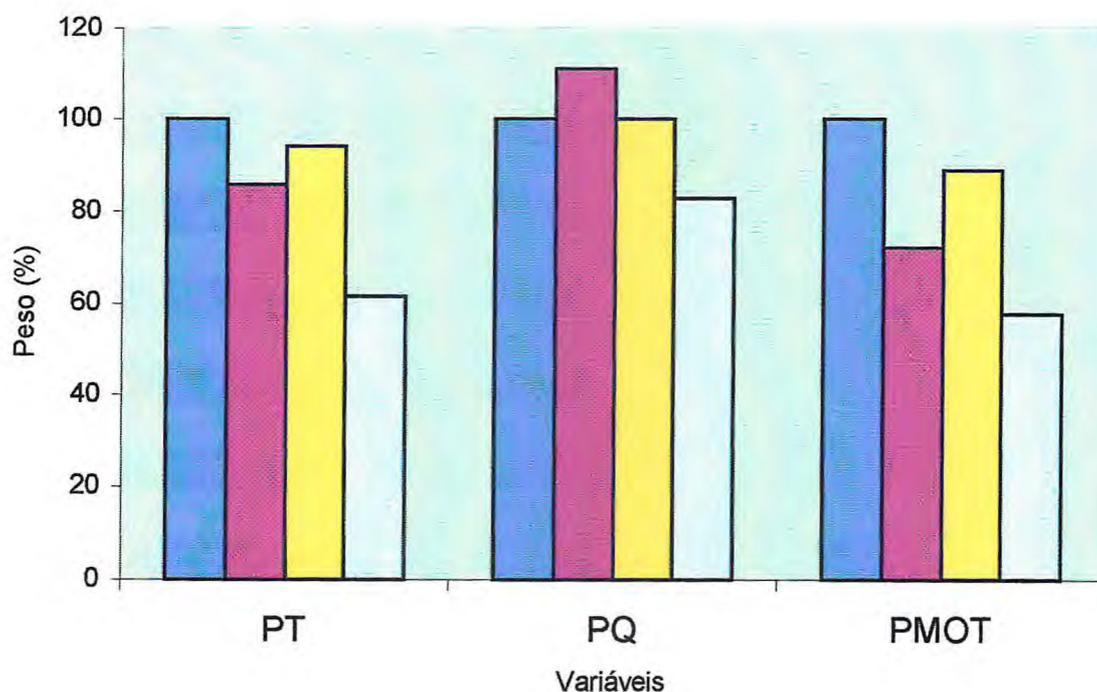


FIGURA 15 – Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre os pesos das teleógenas e quenógenas e sobre a massa total de ovos de *B. microplus*, considerando-se o controle como valor padrão de referência. ■ Controle; ■ extrato bruto; ■ toxina, ■ lectina.

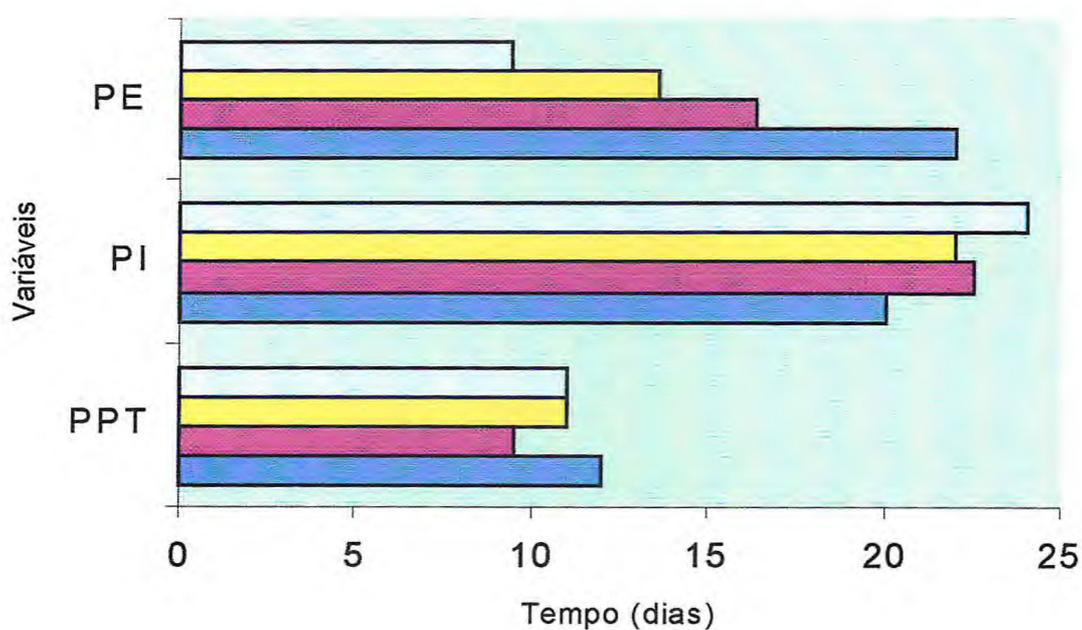


FIGURA 16 – Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre os períodos de postura das teleógenas, incubação e eclosão dos ovos de *B. microplus*. ■ Controle; ■ extrato bruto; ■ toxina, ■ lectina.

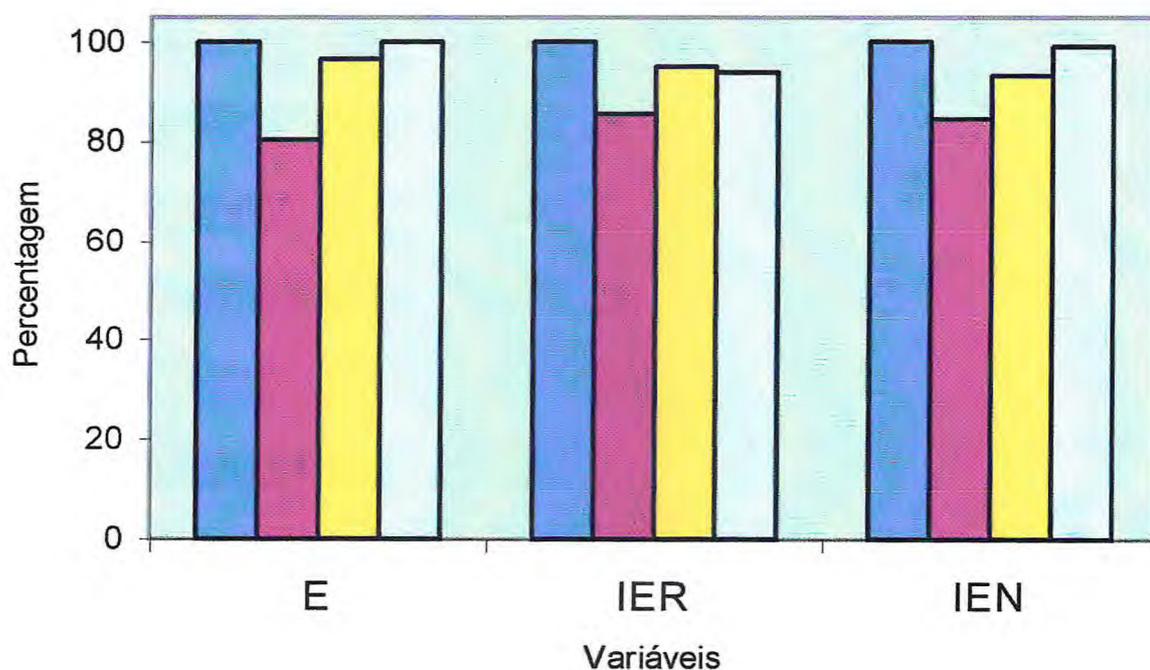


FIGURA 17 – Efeitos do extrato bruto, da toxina e da lectina da alga *G. cornea* sobre a percentagem de eclosão dos ovos e sobre as eficiências reprodutiva e nutricional de *B. microplus*. ■ Controle; ■ extrato bruto; ■ toxina, ■ lectina.

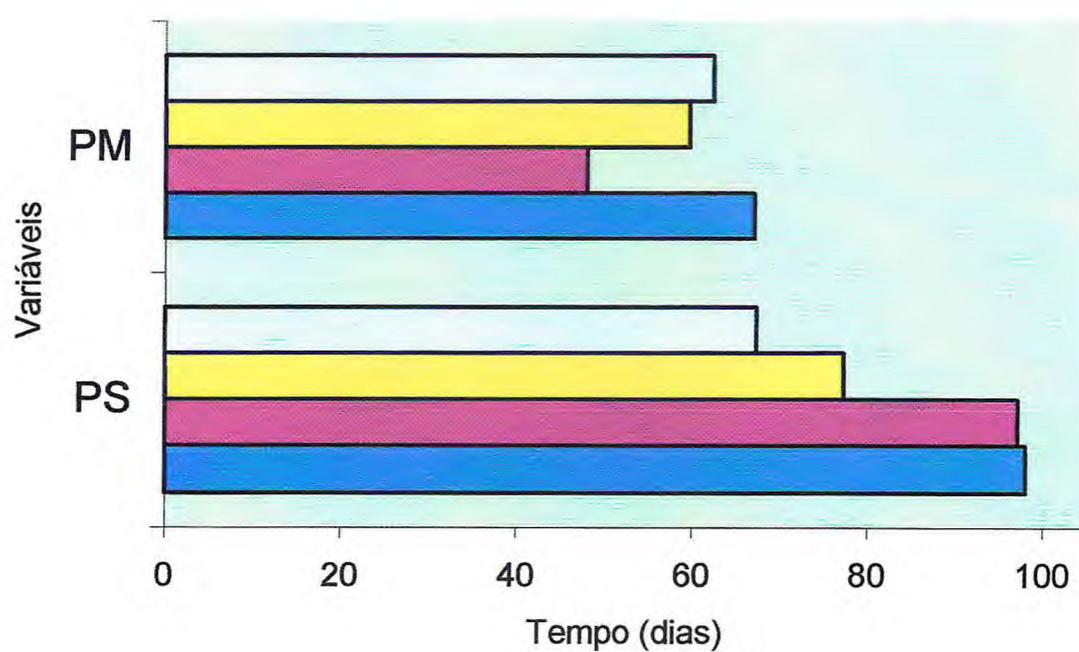


FIGURA 18 – Efeitos do extrato bruto, toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre os períodos de sobrevivência e mortalidade das larvas de *B. microplus*.

■ controle; ■ extrato bruto; ■ toxina, ■ lectina.

TABELA 08- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos do extrato bruto, da toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS		
	Extrato Bruto	Toxina	Lectina
PT	232,7 ^a	255,3 ^b	167,3 ^c
PQ	66,0 ^{ab}	54,8 ^{ab}	44,2 ^c
PMOT	125,3 ^a	154,2 ^b	100,4 ^c
PE	16,3 ^{ab}	13,6 ^{ab}	9,4 ^{bc}
%E	77,3 ^a	92,7 ^{bc}	96,7 ^{bc}
IEN	75,6 ^a	74,0 ^a	84,0 ^{abc}
PM	48,2 ^a	59,6 ^{bc}	62,3 ^{bc}
PS	97,0 ^a	77,3 ^b	67,3 ^c

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem entre si para os três tratamentos ($p < 0,05$). PT: peso das teleóginas, PQ: peso das quenóginas, PMOT: peso da massa total de ovos, PE: período de eclosão dos ovos, %E: percentagem de eclosão dos ovos, IEN: índice de eficiência nutricional, PS: período de sobrevivência e PM: período de mortalidade larval.

6. CONCLUSÕES

- A lectina presente na alga marinha vermelha *G. cornea* dentre os eritrócitos testados aglutinou somente eritrócitos de galinha tratados enzimaticamente com tripsina tendo sido considerada estruturalmente uma glicoproteína de forma monomérica constituída de 52,3% de carboidratos, com massa molecular na forma nativa de 56,4 kDa e sob forma desnaturada, em presença de agente redutor, de 66 kDa e, com caráter ácido de pI 4,3.
- A toxina também é considerada uma glicoproteína distinta da lectina de forma dimérica, constituída de 36,8% de carboidratos, de massa molecular na forma nativa 71,56 kDa e na forma desnaturada constituída de duas subunidades de 35 kDa. Ela possui um DL₅₀ de 5,18 mg/kg de peso corpóreo por via ip. cuja sintomatologia inclui depressão respiratória, ataxia locomotora, xeroftalmia, convulsões tônico-clônicas que precedem a morte dos animais.
- A lectina mostrou-se tóxica ao ciclo evolutivo do ectoparasita bovino *Boophilus microphilus*. No entanto, o efeito carrapaticida causado pelo extrato bruto concentrado sobre a variável período de sobrevivência das larvas, sugere que este efeito se deve a presença de outro(s) componente(s) tóxicos no referido extrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L. & SAMPAIO, A. H. Screening of brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, p. 211-214, 1991.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N. M. B., FREITAS, A. L. P., COSTA, F. H. F., CARVALHO, M. R., PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica Marina**, v. 35, n. 11, p. 475-479, 1992.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H., FREITAS, A. L. P., BENEVIDES, N. M. B. & MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryotamnion seafrothii* and *Bryotamnion triquetrum*, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 15-19, 1995.

A.O.A.C - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 12th Ed. Washington D.C., 1094 pp. 1975.

ARASAKI, S. & ARASAKI, T. **Low calorie, high nutrition vegetables from the sea**. Zurich, Japan Publication, Inc & Tóquio Boserbooks Inc. Limmastrasse III, p. 86-173, 1983.

AU, T. K., Chick, W.S.H., Leug, P.C. Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin Ophiobolin A. **Main group met. Chem.**, v. 23, n. 5, p. 291-297, 2000.

BASLOW, M. H. **A study of toxins and other biological active substances of marine origin**. In: **Marine Pharmacology**. Baltimore, Wiliams & Wilkins. Co; 286 pp, 1969.

BELITZ, H.D. Eletron microscopic studies on protein films from wheat and other sources at the air-water interface. **Z. Lebensm Unters For.** v. 190, n. 3, p. 217-222, 1990.

BENEVIDES, N.M.B., LEITE, A. M., FREITAS, A.L.P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.

BENEVIDES, N. M. B., SILVA, S. M. S., OLIVEIRA, S. R. M., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P & VASCONCELOS, I. M. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 31-36, 1998^a.

BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P. & SAMPAIO, A. H. Purification and partial characterisation of the lectin from the marine red alga *enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Faalkenberg. **Botanica marina**, v. 41, p. 521-525, 1998^b.

BENEVIDES, N. M. B., OLIVEIRA, S. R. M., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P. & SAMPAIO, A. H. Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red marine algae *Gracilaria domigensis* and *Gelidium pusillum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 2, p. 91-95, 1999.

BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., MONTEIRO, A. C. O. & FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v. 44, p. 12-22, 2001.

BIRD, K. T., CHILES, T. C., LONGLEY, R. E., KENDRICK, A. F. & KINKEMA, M. D. Agglutinins from marine macroalgae of the southeastern United states. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 213-218, 1993.

BLAKEY, D. C., WAWRZYNOZAC, E. J., WALLACE, P. M., THORPE, P. E. Antibody toxin conjugates: a perspective. **Progress in Allergy**, v. 45, p. 50-90, 1988.

BLUNDEN, G. Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. In: **Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential**. MD Guiry and G. Blunden (eds.). John Wiley and sons. England., p. 65-94, 1991

BLUN, H., BEIER, H., GROSS, J. K. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA. **In gels electroforesis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BLUNDEN, G. & ROGERS, D. J. Survey of british seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**, v. 38, n. 2, p. 162-168, 1975.

BOYD, W. C., ALMODOVAR, L. R. & BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 6, p. 82-83, 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, T.P.E., RANDALL, J.N., BEAM, E.A., JOVANOVIC, D., SEABAUGH, A.C., SMITH, B.D.. Functional InP/InGaAs lateral double barrier heterostructure resonant tunneling diodes by using etch and regrowth **Applied Physics Letters**, v. 69, n. 13, p. 1918-1920, 1996

CALVETE, J. J., COSTA, F. H. F., SAKER-SAMPAIO, S., MURCIANO, M. P. M., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., BLOCH Jr., C., SILVEIRA, S. B., FREITAS B. P. & SAMPAIO, A. H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines

a novel lectin structure. CMLS, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 343-350, 2000.

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**. v. 19, p. 667-676, 1981.

CARNOVALE, E., MARLETTA, L., MARCONI, E., BROSIO, E. Nutritional and hydratation properties in cowpea. In: NG, N. Q., MONTI, L. M. (ed.) **Cowpea Genetic Resorces**. Thailand: Amarin Printing Group Co. Ltd., cap. 3, p. 11-113, 1990.

CHAPMAN, V. J. **Seaweeds and their uses**. London, Chapman and Hall, 135 pp., 1970.

CHILES, T.C., BIRD, K.T. *Gracilaria tikvahiae* agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity. **Carbohydrate Research**, v. 207, p. 319-326, 1990.

CISAR, J. O., SANDBERG, A. L., ABEYGUNAWARDANA, C., REDDY, G. P. & BUSH, C. A. Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharide. **Glycobiology**, v. 5, p. 655 - 662, 1995.

COSTA, F.H.F. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina mitogênica presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida* Lamouroux**. Dissertação de mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC. 112 pp., 1995.

COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S. A., ROCHA, M. L. A., BENEVIDES, N. M. B. & FREITAS, A. L. P. Purification and characterisation of a lectin from the

red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 5, p. 53 - 61, 1999.

DALTON, S. H.; LONGLEY, R. E.; BIRD, K. T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 2, p. 149-155, 1995.

DARCY-VRYLLON. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. **Journal of the Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 523-535, 1993.

DIXSON, T.(1887) **Australas. Med. Gaz.**, v. 6, n. 137, citado por KOCOUREK, 1986.

D'MELLO, J.. P. F., DUFFUS, C. M. , DUFFUS, J. H. Toxic substances in crop plants. **Ed. The Royal Society of Chemistry**, cap. 4, 104 pp., 1991.

DONG, T. X., NG, T. B., YEUNG, H. W., WONG, R. N. S. Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein, β -kirilowin, from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 199, p. 387-393, 1994.

DOWD, P. F., MEHTA, A. D., BOSTON, R. S. Relative toxicity of the maize endosperm ribosome-inactivating protein to insects **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3775-3779, 1998.

DUBOIS, M., GILLERS, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

- ENDO, Y., GLUCK, A., WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for Ricin A-chain recognition and catalysis. **Journal Molecular Biology**, v. 221, p. 193-207, 1991.
- ERICSON, L. E. & LEWIS, L. On the vitamin B₁₂ factors in marine algae. **Arkiv for Kemi**, v. 6, p. 427-442, 1953.
- FÁBREGAS, J., MUÑOZ, A., LLOVO, J. & ABALDE, J. Agglutinins in marine red algae. **J. R. C.S. Medical Science**, v. 12, p. 298-299, 1984.
- FÁBREGAS, J., LLOVO, J. & MUÑOZ, A. Hemagglutinins in red seaweeds. **Botanica Marina**, v. 28, n. 12, p. 517-520, 1985.
- FABREGAS, J., MUNOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A. Tomentine: a lectin for the detection of glycoprotein polymorphisms. **Medical Science Research**, v. 16, p. 819-820, 1988.
- FENICAL, W. Natural products chemistry in the marine environment. **Science** v. 215, n. 4535, p. 923-928, 1982.
- FERRARI, P., TRABAUD, M. A., ROMMAIN, M. MANDINE, E., ZALISZ, R., DESGRANGES, C., SMETS, P. Toxicity and activity of purified trichosanthin. **AIDS**, v. 5, n. 7, p. 865-870, 1991
- FERREIROS, C.M. & CRIADO, M.T. Purification and partial characterization of a *Fucus vesiculosus* agglutinin. **Revista Española de Fisiologia**, v. 39, p. 51-60, 1983.
- FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D. I. A., COSTA, F. H. F., FARIAS, W. R. L., LOBATO, A. S. C., SAMPAIO, A. H. & BENEVIDES, N. M. B. A new survey of

Brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 495-501, 1997.

GIUDICI, A.M., REGENTE, M.C., DE LA CANAL, L.. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 881-888, 2000.

GRANT, G., EWEN, S.W.B., BARDOCZ, S., BROWN, D.S., DOWRARD, P.M., WATT, W.B., PUSZTAI, A. Local (gut) Sistemic responses of rats to dietary soyabean (*Glycine Max*) proteins in: Huisman, J., Vander Poel T.F.B., Liener, I.E. (eds) **Recent Advances of Research in Legume Seeds**. Wageningen, Nether Lands, Pudoc., p. 34-38, 1989.

GRANT, G., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., MURRAY, S., ATKINSON, T., FARNINGHAM, D. A. H., PUSZTAI, A. Secretion of pancreatic digestive enzymes induced in rats by first-time oral exposure to kidney bean E₂L₂ lectin is mediated only in part by cholecystokinin (CCK). **Pancreas**. v. 19, p. 382-389, 1999.

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

GOMES, Albert. n.º 31. Agosto, 1998, citado no site: www.Cnpqg.embrapa.br/prblicasões/divulga/GCD31.htm acesso: 20/02/03

GUEDES, E.C., MACEDO, S.J., PEREIRA, S.M.B. Variação sazonal na composição química de algumas espécies de algas betônicas da praia de jaguaribe (Itamaracá-Pe).(1). **Boletim de estudos da ciência do mar**. v. 7, p. 7-14, 1988.

HARTLEY, M. R., CHADDOCK, J. A. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 8, p.254-260, 1996.

HARVEY, W. Cracking open marine algae. **Biological Treasure Chest. Bio/Technology**, v. 6, n. 5, p. 487-492, 1988.

HAY, M. E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. **Ecology**, v. 68, n. 6, p. 1581-1591, 1987.

HAY, M.E., FENICAL, M. Marine plant-herbivore interactions: The Ecology of chemical defense. **Ann. Ver.Ecol.Syst.** v. 19, p. 11-45, 1988.

HEJGARD, J., JACOBSEN, S., SVENDSEN, I. Two antifungal Thaumatin-Like proteins from barley grain. **Federation of European Biochemical Society Letters**. v. 291, n. 1, p. 127-131, 1991.

HELLIN, H.. Thesis University of Dopart, Dopart (Tartu). Quoted according to: KOCOUREK, J. (1986) Historical background. In: The lectins, properties, functions and applications in biology and medicine. (LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. eds.), **Academic Press Inc.**, New York, p. 1-32, 1991.

HEJGAARD, J., JACOBSEN, S., SVENDESN, I.. Two antifungal Thaumatin-like proteins from barley grain. Federation of european. **Biochemical Societies Lettes**, v. 291, n. 1, p. 127-131, 1991.

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

HIQASHI-OKAJ, K., OTANI, S. & OKAI, Y. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and

promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 140, p. 21-25, 1999.

HIROISHI, S., SUGIE, K., YOSHIDA, T., MORIMOTO, J., TANIGUCHI, Y., IMAI, S. & KUREBAYASHI, J. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (rhodophyceae), a marine red alga. **Cancer Letters**, v. 167, p. 145-150, 2001.

HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, n. 6, p. 793-798, 1981.

HORI, K., KEISURE, M. & ITO, K. Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algae species. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 52, n. 2, p. 323-331, 1986.

HORI, K., MATSUDA, H., MIYAZAWA, K., ITO, K. A mitogenic agglutinin from red algae *Carpopeltis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1335-1338, 1987.

HORI, K., OIWA, C., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Evidence for wide distribution of agglutinins in marine algae. **Botanica Marina**, v. 31, n. 2, p. 133-138, 1988.

HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 561-566, 1990.

HORI, K., MATSUBARA, K. & MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, p. 226-236, 2000.

HUDSON, J. B., KIM, J. H., LEE, M. K., DeWREEDE, R. E. & HONG, Y. K. Antiviral compounds in extracts of korean seaweeds: Evidence for multiplies activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 5, p. 427-434, 1998.

IRVIN, J. D. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukariotic protein synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 169, p. 522-528, 1992

IRVIN, J.D. AND UCKUN, F.M. Pokeweed antiviral Protein: ribosome inactivation and therapeutic applications, **Pharmacol. Ther**, v. 55, p. 279-302, 1992.

ISHIHARA, T., YASUDA, M., SUCHIMOTO, T. Protease inhibitors contained in algae (1): trypsin inhibitors in Purple Laver, **J. Jap Soc. Food and Nutrition**, v. 21, p. 445-448, 1968.

JONGSMA, M. A., BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors **Journal of insect physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant science**, v. 131, n. 1, p. 1-11, 1998.

KAKITA, H., FUKUOKA, S., OBIKA, H., LI, Z. F. & KAMISHIMA, H. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Botanica Marina**, v. 40, p. 241-247, 1997.

KAMIYA, H., SHIOMI, K. & SHIMIZU, Y. Marine biopolymers with cell specificity-III- Agglutinins in the red alga *Cystoclonium purpureum*: isolation and characterization. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 136-139, 1980.

KAMIYA, H. Properties of the hemagglutinins in the red alga *Monospora* sp **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 48, p. 1365, 1982^a.

KAMIYA, H., OGATA, K. & HORI, K. Isolation and characterization of a new agglutinin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Botanica Marina**, v. 25, n. 11, p. 537 - 540, 1982^b.

KANO, H., KITAMURA, T. & KOBAYASHI, Y. A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102B, p. 445-449, 1992.

KAPLAN, A.. The determination of urea, ammonia and urease. In: GLICK, D. (ed). *Methods of Biochemical Analysis*. New York: John Wiley & Sons, , p. 311-314, 1969.

KIM, J. H., HUDSON, J. B., HUANG, A. M., BANNISTER, K., JIN, H., CHOI, T. J., TOWERS, G. H. N., HONG, Y. K. & DeWREEDE, R. E. Biological activities for seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. 1. Antiviral activity. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v. 75, n.10, p. 1656-1660, 1997.

KÖNIG, G. M. & WRIGHT, A. D. Marine natural products research: current directions and future potential. **Planta Medica**, v. 62, p. 193-211, 1996

KREITMAN, R. I., PASTAN, I. Immunotoxins for targeted cancer therapy. I **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 31, p. 53-88, 1998.

LAM, Y. H., WONG, Y. S., WANG, B., WONG, R. N. S., YEUNG, H. W., SHAW, P. C. Use of trichosantin to reduce infection by turnip mosaic virus. **Plant Science**, v. 114, p. 111-117, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I., MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1564-1573, 1991.

LEE, R. E. **Phycology**. 2th Ed. Cambridge University Press, New York, NY 10011-4211, USA, 1997.

LE GUEN, M. P. & BIRK, Y. In: **Recent Advances of Research in Antinutritional factors in legume seeds**. Edited by Van der Poll, A F.B., Huisman, J. and Saioui, H.S. Wageningen, the Netherland Wageningen Pers. p. 157-171, 1993.

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

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LORD, J.M., ROBERTS, L.M., ROBERTUS, J.D. RICIN: struture, mode of action, and some current applications. **FASEB Journal**, v. 8, p. 201-208, 1994.

MABEAU, S., CAVALOC, E., FLEURENCE, J. & HAYE, M. New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, p. 38-44, 1992.

MATSUBARA, K., SUMI, H. & HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia**, v. 52, p. 540-543, 1996

MAUCH, F.; HADWIGER, L. A.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3 glucanases differentially regulated during developments in response to fungal infection. **Plant Physiol.**, v. 87, p. 325-333, 1995.

- MELO, F. R. **Purificação, caracterização parcial e variação sazonal de uma lectina presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Martens, C. Agardh) J. Agardh.** Fortaleza, CE. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC, 92 pp, 2000.
- MORANO, P.E. & BRIAND, X. Excessive Growth of Macroalgae: a symptom of environmental disturbance. **Botanica Marina**. v. 39, 1991.
- MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C.. Purification and partial characterisation of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1977.
- MUÑOZ, A., LLOVO, J. & FÁBREGAS, J. Hemagglutinins of the green algae . **Acta Científica Compostelana**, v. 22, p. 873-878, 1985
- NEVES, S. A., DIAS-BARUFFI, M., FREITAS, A. L. P. & ROQUE-BARREIR, M. C. Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* by marine algal lectins. **Inflammation Research**, v. 50, n. 10, p. 486-490, 2001.
- NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELO, J. P. F., DUFFUS, C. M. (ed.) **Toxic Substances in Crop Plants**. Edinburg: The Scottish Agricultural College, cap. 4, p. 69-106, 1991.
- OLSNES, S., REFSNES, K., PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v. 249, p. 627-631, 1974.
- OLSNES, S. STIRPE F., SANDVIG, K. & PIHL, A. Isolation and characterization of viscumim, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). **Journal of Biological Chemistri**. v. 257, p. 13263-13270, 1982.

- OKAMOTO, R., HORI, K., MIYAZAWA, K. & ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia** v. 46, p. 975-977, 1990.
- OLIVEIRA, S. R. M., NASCIMENTO, A. E., LIMA, M. E. P., LEITE, Y. F. M. M. & BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 397-403, 2002.
- OLSNES, S., PIHL, A.. Chimeric toxins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 355-381, 1981.
- PANORAMA DA AQUICULTURA. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. v. 7, n. 42, p. 42-45, 1997.
- PEREIRA, M. G. **Isolamento e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha verde *Ulva fasciata***. Fortaleza, CE, Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC, 108 pp. 2000.
- PEREZ-LORENZO, S., LEVY-BENSHIMOL, A., GOMEZ-ACEVEDO, S., Presencia de lectinas, taninos e inibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. **Acta Científica Venezolana**, v. 49, p. 141-151, 1998.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PIMENTEL, D., WILSON, C., McCULLUM, C., HUANG, R., DWEN, P., FLACK, J., TRAN, Q., SALTMAN, T. & CLIFF, B. Economic and environmental benefits of biodiversity. **Bioscience**, v. 47, p. 747-757, 1997.

RAIKHEL, N.V., LEE, H.I., BROEKAERT, W.F..Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology** , v. 44, p. 591-615, 1993.

RAMOS, W.V., FREITAS, A.L.P., MELO, V.M.M. & CARVALHO, F.F.U. Protein Content and amino acid composition in some Brazilian Marine Algae Species. **Physiol Mol.Biol. Plants**. v. 4, p. 165-169, 1998.

RAMOS, M. V., MONTEIRO, A. C. O., MOREIRA, R. A., CARVALHO, A. F. F. U. Amino acid composition of some brazilian seaweed species. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 33-39, 2000.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHOM, S. E. **Biology of plants**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 735 pp., 1996.

RIBEAU-GAYON, J., PEYNAUD. E. **Traite d'ampelologie, sciences et techniques de la vigne** / J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud. Paris: Dunod., 719 pp., 1971.

RINUI, J.M., **Annu. Rev. Biophys Biomol.Struct.**, p. 244-551, 1995.

ROGERS, D. J., BLUNDEN, G. TOPLISS, J. A. & GUIRY, M. D. A survey of some marine organisms for haemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 23, n. 9, p. 569-577, 1980.

ROGERS, D. J. & TOPLISS, J. A. Purification and characterization of an anti-sialic acid agglutinin from the red alga *Solieria chordalis* (C. Ag.) J. Ag. **Botanica Marina**, v. 26, n.6, p. 301-305, 1983.

ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W. & BALDING, P. Isolation and characterization of the lectins from sub-species of *Codium fragile*. In **Lectins: Biology**,

Biochemistry, Clinical Biochemistry (T.C. Bog-Hansen, & J. Breborowicz eds. Walter de Gruyter Berlin-New York), v. 5, p. 155-160, 1986.

ROGERS, D. J., FISH, B. & BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (J. Kocourek & D.L.J. Freud eds). Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, v. 7, p. 49-52, 1990.

ROGERS, D.J. & FISH, B.C. Marine algal lectins. In D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche & T.C. Bog-Hansen (Eds). **Lectins Reviews. Proceedings of the first Lectin Meeting**, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA, v.1, p.129-142, 1991.

ROGERS, D.J. & HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 589-593, 1993.

ROGERS, D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G. & CRITCHLEY, A.T. Binding of N-acetyl- α -D-galactosamine by lectins from species of the green marine alga genus, *Codium*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (Van Driessche, E., Fisher, J., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C. eds). v. 10, p. 162-165, 1994.

ROUND, F. E. **Biologia das Algas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, S.A., 262 pp., 1983

SAMPAIO, A. H. **Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species**. Tese de Doutorado apresentada no Division of Biomedical Science, University of Portsmouth, Inglaterra, 191 pp., 1997.

SAMPAIO, A. H., HOGERS D. J. & BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina**, v.41, p.

427-433, 1998^a.

SAMPAIO, A. H., HOGERS D. J. & BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998^b.

SANTOS, M. G. M., LAGROTA, M. H. C., MIRANDA, M. M. F. S., YONESHIGUE-VALENTIN, Y. & WIGG, M. D. A screening for the antiviral effect of extracts from brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, v. 42, p. 227-230, 1999.

SANTOS, A. A. dos, FREIRE-FILHO, F. R., MESQUITA, R.C.M. & SILVA, P.H.S. da. Controle de mosaico do caupi (*Vigna sinensis* (L.) Savi) por resistência varietal. Teresina, EMBRAPA-UEPAE. Comunicado técnico, 10. 1978. 10 p. Citado por: FREIRE FILHO, F.R., RIBEIRO, V.Q., SANTOS, A.A. Cultivares de Caupi para a Região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M.J. (Org.). A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, Cap. 3, p. 67-88, 2000

SCHAEFFER, D. J. & KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 3, p. 208-227, 2000.

SHEPHERD, R.J., FULTON, J.P. AND WAKEMAN, R.J. Properties of a virus causing pokeweed mosaic, **Phytopatology**, v. 59, p. 219-222, 1969.

SCHULER, T.H., POPPY, G.M., KERRY, B.R., DENHOL, M.I. Insect resistant transgenic plants. **Tibiotech**, v.16, p. 68-175, 1998.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. (ed.). **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradação e Modificações**. São Paulo: Livraria Varela Ltda., cap. 2, p. 139-257, 1996

*SHARON, N. & LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-9, 2001.

SHAW, P. C., CHAN, W. L., YEUNG, H. W., NG, T. B. A protein with multiple pharmacological properties. **Life Science**, v. 55, p. 253-262, 1994.

SHIOMI, K., KAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 576, p. 118-127, 1979.

SHIOMI, K., YAMANAKA, H. & KIKUCHI, T. Biochemical properties of hemagglutinin in the red alga *Serraticardia maxima*. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v. 46, p. 1369 - 1373, 1980.

*SHIOMI, K., YAMANAKA, H. & KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, n. 8, p. 1079-1084, 1981.

SHIOMI, K., RAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. Purification and characterization of na agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 576, p. 118-127, 1989.

SILVA, S. M. S. **Composição química e detecção de toxicidade em algas marinhas vermelhas, purificação e caracterização parcial de uma toxina presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Mertens ex. C. Agardh) J. Agardh**. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC. 75 pp, 1997.

SILVEIRA, V. C. N., **Toxina da Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* Lamouroux. Purificação e Caracterização.** Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 78 pp. Fortaleza, 2001.

SOUSA, P. A. S. **Efeito da salinidade na expressão gênica de plântulas de feijão de corda *Vigna unguiculata* (L) Walp.** Dissertação de mestrado apresentada a coordenação do curso de Pós Graduação em Bioquímica da UFC, 1999.

STILLMARK, H. **Uben ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und einigen anderen euphorbiaceen.** Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Dorpat (Tartu), 1888.

STIRPE, F., BARBIERI L. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS Lett.** v. 195, p. 1-8, 1986.

STIRPE, F., BARBIERI, L., BATTELLI, M. G., SORIA, M., LAPPI, D. A. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects Review. **Bio/Technology.** v. 10, p. 405-412, 1992.

TERRAS, F.R.G., SCHOOF, H.M.E. THEVISSSEN, K. OSBORN, R.W. VANDERLEYDEN, J. CAMMUE, B.P.A. and BROEKAERT, W.F., Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oil seed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors, **Plant Physiol.**, p 103-131, 1993.

TRIEBOLD, H. O. **Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products.**, D. Van Nostrand Co., New York, 331 pp, 1946.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. **Handbook of Plant Lectin: Properties and Biochemical Applications**. John Wiley & Son, Chichester, UK, 452pp, 1998.

VAN PARIJS, J. V., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta** v. 183, p. 258-264, 1991.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans *Glycine max*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, n. 2, 1994.

VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, A. F., CAMPELO, G. J. A., OLIVEIRA, J. T. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419-426, 1997.

VIANA, G. S.; A. L. P. FREITAS; M. M. LIMA; L. ^a VIEIRA; M. C. ANDRADE & N. M. B. BENEVIDES. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seforthii*(turner) Kutz. And *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.

VIGERS, A. ROBERTS, W.K.E., SELITRENNIKOFF, C. P. A new family of plant antifungal proteins. **Mol. Plant.Microb. Int**, v. 4, n. 4, p. 315-323, 1991

VIVANCO, J. M.E., SAVARY, B.J. & HECTOR, E. F. Characterization of two novel type I Ribosome-Inactivating Proteins from the storage roots of the andean crop mirabian *expansa*. **Plant Physiology**, v.119, p. 1447-1456. 1998.

WARDEN, C. J. H., WADDEL, L. A. In "The nature of abrus poison with observations on its chemical and physiological properties". **Bengal Secretarial Press**, Calcuta, citado por KOCOUREK, 1984.

WHITAKER, J. R. Protease and alpha-amylase inhibitors of higher plants. **Antinutrients and phytochemicals in food ACS symposium series**, v. 662, p. 10-30, 1997

WIEMER, D. F., IDLER, D. D. & FENICAL, W. Vidalous A e B, new anti-inflammatory bromophenols from the Carribean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. **Experientia**, v. 47, p. 851-853, 1991.

WOLOSHUK, C.P., MEULENHOF. J.S., SELABUURLAGE, M., VANDENELZEN, P.J.M., CORNELISSEN, B.J.C.. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward phytophthora-infestans, **Plant Cell**, v. 3, n. 6, p. 619-628, 1991.

YAMAGATA M. & YAMAGATA, N. Iodine content of thyroid glands of normal Japanese. **Journal or Radiate Research**, v. 13, p. 81-90, 1972.

8. ANEXOS

TABELA A1- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos do extrato bruto da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS	
	Controle	Extrato Bruto
PT	271,0 ^a	232,7 ^b
PQ	59,4 ^a	66,0 ^a
PMOT	173,5 ^a	125,3 ^b
PPT	12,0 ^a	9,5 ^a
PI	20,0 ^a	22,5 ^a
PE	22,0 ^a	16,3 ^b
%E	96,0 ^a	77,3 ^b
IER	63,7 ^a	54,4 ^a
IEN	84,7 ^a	71,6 ^b
PS	98,0 ^a	97,0 ^a
PM	67,0 ^a	48,0 ^b

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem em relação ao controle ($p < 0,05$).

TABELA A2- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da toxina da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS	
	Controle	Toxina
PT	271,6 ^a	255,3 ^c
PQ	59,4 ^a	54,8 ^a
PMOT	173,5 ^a	154,2 ^c
PPT	12,0 ^a	11,0 ^a
PI	20,0 ^a	22,0 ^a
PE	22,0 ^a	13,6 ^c
%E	96,0 ^a	92,7 ^a
IER	63,7 ^a	60,5 ^a
IEN	84,7 ^a	79,0 ^a
PS	98,0 ^a	77,3 ^c
PM	67,0 ^a	59,6 ^a

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem em relação ao controle ($p < 0,05$).

TABELA A3- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da lectina da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*.

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS	
	Controle	Lectina
PT	271,6 ^a	167,3 ^d
PQ	59,4 ^a	44,2 ^a
PMOT	173,5 ^a	100,4 ^d
PPT	12,0 ^a	11,0 ^a
PI	20,0 ^a	24,0 ^a
PE	22,0 ^a	9,4 ^d
%E	96,0 ^a	96,7 ^a
IER	63,7 ^a	59,8 ^a
IEN	84,7 ^a	84,5 ^a
PS	98,0 ^a	67,3 ^d
PM	67,0 ^a	62,3 ^a

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem em relação ao controle ($p < 0,05$).

TABELA A4- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos do extrato bruto, da toxina e lectina da alga *G. cornea* sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS		
	Extrato Bruto	Toxina	Lectina
PT	232,7 ^a	255,3 ^b	167,3 ^c
PQ	66,0 ^{ab}	54,8 ^{ab}	44,2 ^c
PMOT	125,3 ^a	154,2 ^b	100,4 ^c
PPT	9,5 ^a	11,0 ^a	11,0 ^a
PI	22,5 ^a	22,0 ^a	24,0 ^a
PE	16,3 ^{ab}	13,6 ^{ab}	9,4 ^{bc}
%E	77,3 ^a	92,7 ^{bc}	96,7 ^{bc}
IER	54,4 ^a	60,5 ^a	59,8 ^a
IEN	75,6 ^a	74,0 ^a	84,0 ^{abc}
PS	97,0 ^a	77,3 ^b	67,3 ^c
PM	48,2 ^a	59,6 ^{bc}	62,3 ^{bc}

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem entre si, para os três tratamentos ($p < 0,05$).