



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DA LECTINA DA  
ALGA MARINHA VERMELHA *Amansia multifida* C. LAMOUROX**

**Jacilane Ximenes Mesquita**

**FORTALEZA – CE**  
**2010**

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

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

---

M544c Mesquita, Jacilane Ximenes.

Caracterização estrutural e atividade hipoglicemiante da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* C. lamourox / Jacilane Ximenes Mesquita. – 2010.  
85 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2010.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas.

1. Alga marinha. 2. Lectina de planta. 3. Espectroscopia. I. Título.

CDD 572

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DA LECTINA DA  
ALGA MARINHA VERMELHA *Amansia multifida* C. LAMOUROX**

**Jacilane Ximenes Mesquita**

Dissertação Submetida à Coordenação do Programa de pós-graduação em Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

**Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas**

FORTALEZA-CE

2010

Esta dissertação foi apresentada ao Curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á a disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

**Jacilane Ximenes Mesquita**

Dissertação aprovada em:        /        /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dr. Ana Lúcia Ponte Freitas  
Deptº de Bioquímica e Biologia  
Molecular-UFC  
Orientadora

---

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides  
Deptº Bioquímica e Biologia  
Molecular-UFC  
Examinadora

---

Profa Dra. Samya de Araújo Neves  
Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte  
Examinadora

*É bom louvar ao Senhor e cantar salmos ao Vosso nome ó Altíssimo;  
Proclamar de manhã a vossa misericórdia e, durante a noite a Vossa  
fidelidade, com a harpa de dez cordas e com a lira, com cânticos ao som da  
cítara, pois vós me alegrais Senhor com Vossos feitos;  
exulto com as obras de Vossas mãos.  
Senhor, estupendas são as Vossas obras!  
E quão profundos os Vossos desígnios!  
Não compreende essas coisas o insensato, nem as percebe o néscio.  
Ainda que floresçam os ímpios como a relva, e floresçam os que  
praticam a maldade, eles estão à perda eterna destinados.  
Vós, porém, Senhor, sois o Altíssimo por toda a eternidade.  
Eis que vossos inimigos, Senhor, hão de perecer,  
serão dispersos todos os artesãos do mal.  
Exaltastes a minha cabeça como a do búfalo, e com óleo puríssimo me  
ungistes. Com a palmeira florescerão os justos,  
elevar-se-ão como o cedro do Líbano.  
Plantados na casa do Senhor, nos átrios de Nosso Deus hão de florir.  
Até na velhice eles darão frutos, continuarão cheios de seiva e  
verdejantes, para anunciarem quão justo é o Senhor,  
meu rochedo e como não a Nele injustiça.  
Louvai ao Senhor porque ele é bom e a  
Sua misericórdia dura para sempre.  
Amém!*

**Salmo 91**

Dedico este trabalho

A Deus que é a minha força e alegria maior,  
Aos meus pais que não mediram esforços para  
ajudar em minha formação, sempre  
demonstrando amor e apoio  
incondicionais,  
Aos meus irmãos que sempre estiveram  
dispostos a me ajudar  
Ao meu amor, presente de Deus na  
minha vida.

## FONTES FINANCIADORAS

### **Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:**

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, coordenado pela professora e Dra Ana Lúcia Ponte Freitas, fonte da Pesquisa do trabalho realizado.

Universidade de São Paulo, através do laboratório e Biofísica do Instituto de Física São Carlos, coordenado pela professora Dra Leila Maria Beltrami, que permitiu a realização de experimentos referentes ao trabalho.

Faculdade de Medicina de Juazeiro, através do laboratório de Biofisiologia, coordenado pela professora Dra. Samya de Araújo Neves, que auxiliou na execução deste trabalho.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o Curso de Pós – Graduação em Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e pela bolsa concedida à autora.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP), através de projetos financiados ao laboratório de Algas Marinhas I, e através do Convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus** por me dar saúde e força para vencer as minhas dificuldades, ajudando-me a enfrentá-las com sabedoria e fé. É Dele mais essa vitória alcançada em minha vida. A Ele toda a honra, glória e louvor hoje e sempre.

A **Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas**, por ter me acolhido em seu laboratório. Por toda atenção dispensada, pelo interesse e competência na orientação do trabalho experimental. Agradeço ainda sua paciência frente as minhas dificuldades, os conselhos e a preocupação demonstrada durante todo esse período em que trabalhamos juntas, além da amizade cultivada com muito carinho e respeito.

A **Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides** pela atenção e simpatia demonstradas e por representar um exemplo de docente a ser seguido. Agradeço, também, por aceitar fazer parte desta Banca examinadora.

A **Profa. Dra. Samya de Araújo Neves** pela simpatia e atenção demonstradas, por sua importante contribuição para a realização deste trabalho e por aceitar participar desta Banca examinadora.

A **Profa Dra Leila Maria Beltramini** por me receber tão bem em seu laboratório, e permitir a realização de experimentos cruciais para a realização deste trabalho. Agradeço também, as técnicas, Bel e Gi, que sempre me trataram com muito carinho e atenção, e aos amigos adquiridos no Instituto de Física São Carlos – USP.

Ao **Prof. Francisco de Assis Paiva Campos** por permitir gentilmente a utilização de seu laboratório para realizar experimentos necessários para a conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Enéas e seus alunos** pela utilização de equipamentos necessários nas inúmeras dosagens protéicas realizadas, além da amizade e companheirismo, proporcionando momentos de descontração em etapas exaustivas do trabalho, em especial aos amigos **Valdinéia Soares, Alexiane, Elton , Carlos Eduardo e Talita**.

Ao **Prof. Joaquim Enéas** pela simpatia e amizade em todos esses anos de ótima convivência.

A **todos os professores** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuíram para a minha formação e permitiram a utilização de seus laboratórios para a realização deste trabalho, além da amizade e atenção dispensadas.

Aos **funcionários** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e pela amizade e atenção prestadas.

A **todos os colegas** que fazem parte do curso de Graduação em Ciências Biológicas, que se fizeram presentes, também, durante o Mestrado, pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia. Em especial as minhas amigas, **Camila Barbosa, Carolina de Araújo, Danielle Aragão, Raquel Sombra, Thaís Moura e Diva Tavares** pela amizade e companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus queridos amigos **Bartolomeu Warlene e Fábria Karine** que mesmo longe se fizeram presentes na realização deste trabalho, dando força e mostrando-se a disposição para o que eu precisasse.

As amigas **Thaís, Juliana e Natássia** pelo auxílio e amizade durante esses anos de convivência e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Algas Marinhas I, **Dráulio, Francisco Clark, Luciano, Lídia, Víctor, Víctor César**, pela ajuda nos experimentos realizados, por terem me auxiliado com seus conhecimentos no esclarecimento de dúvidas e principalmente pela amizade e companheirismo demonstrados.

Aos amigos do Laboratório Carbolec pela atenção e amizade, em especial aos amigos **Edfrank, Igor e Luana**.

Aos meus colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, **Márcio Souza, Nelza, Thales, Eliane, Diego, Tiago, Cleverson, Jefferson, Muciana, Fabiano, Emanuel, Nathana, Lady Clarissa, Mirela, Henrique, Maria, Gil, Edilberto, Michella e a todos aqueles** que demonstraram amizade carinho por mim.

Aos meus pais **Raimundo e Benedita** por fazerem parte da minha vida, sendo o motivo de muitas alegrias, além de serem exemplo de força, determinação, honestidade e humildade. Agradeço a eles tudo que sou e tenho até hoje e por me guiarem sempre por caminhos retos, firmados nos ensinamentos de Deus e Nossa Senhora. Agradeço, ainda pela compreensão em momentos difíceis, e até nos felizes, que não pude estar presente, sempre me apoiando incondicionalmente.

Aos meus irmãos, **Jacleiton** por seu apoio, presteza e carinho dispensados sempre em todos os momentos que precisei, e **Jacleno** por acreditar em mim, pelo carinho e por me dar muita alegria com meus sobrinhos queridos, **Caik, Carine e Cauê**.

A minha amiga **Elane** que me ajudou na realização deste trabalho, sendo como uma irmã pra mim, se dispondo a me ajudar com carinho e dedicação.

As minhas cunhadas, **Gardênia e Wanessa** pela atenção e amizade.

Aos meus **tios e tias** que estando perto ou longe sempre estão presentes em meu coração, sendo fonte de ensinamentos importantes na minha vida.

Aos meus **primos e primas** pelo carinho e momentos de descontração proporcionados. Pela amizade, brincadeiras e por me trazer felicidade através de seus filhos, **sobrinhos** queridos.

A minha avó **Maria** que não está mas entre nós, mas que foi um grande incentivo para que chegasse até aqui, já que demonstrava sempre felicidade e satisfação com tudo que já havia conquistado.

Ao meu amado namorado **Anderson Leitão**, pelo amor, compreensão e apoio. Sempre presente em **todos** os momentos, sendo a minha inspiração e alegria, Graça de Deus na minha vida. Fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os meus **parentes e amigos** que contribuíram direta e indiretamente para a concretização desse trabalho, além de serem orientadores, ensinando com experiência a lidar com as situações impostas. Agradeço, ainda, pelo carinho e companheirismo dispensados.

## SUMÁRIO

---

Item	Título	Página
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xiii
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	xv
	<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	xvi
	<b>RESUMO</b>	xvii
	<b>ABSTRACT</b>	xviii
	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	xix
	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	xix

### **CAPÍTULO 01 – Caracterização Físicoquímica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *A.***

#### ***multifida***

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	2
1.1	Algas Marinhas	2
1.1.1	Classificação	2
1.2	Lectinas	4
1.2.1	Definições e Considerações Gerais	4
1.2.2	Estudos de Isolamento e Caracterização de Lectinas de Algas Marinhas	6
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	9
2.1	Obtenção da alga	9
2.2	Eritrócitos	9
2.3	Reagentes	9
2.4	Preparação da Fração protéica	9
2.5	Determinação de Proteínas	10
2.6	Determinação da Atividade Hemaglutinante	10

2.7	Purificação da lectina por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel	10
2.8	Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol	11
2.9	Eletroforese Bidimensional	11
2.9.1	Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)	11
2.9.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Segunda Dimensão)	11
2.9.3	Análise do Gel	12
2.10	Seqüência de aminoácidos	12
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	14
3.1	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida	14
3.2	Eletroforese Bidimensional	17
3.3	Seqüenciamento da lectina	18
<b>CAPÍTULO 02 - Estudos Biofísicos da Lectina da Alga Marinha <i>A. multifida</i></b>		
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
1.1	Análise Estrutural de Proteínas por Dicroísmo Circular (CD)	23
1.2	Análise Componentes Estruturais de Proteínas por Fluorescência	24
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	25
2.1	Dicroísmo Circular (CD)	25
2.1.1	Composição estrutural da lectina de <i>Amansia multifida</i> em condições nativas	25
2.1.2	Avaliação da estabilidade térmica da lectina de <i>Amansia multifida</i>	25
2.1.3	Estudo estrutural da proteína submetida a extremos de Ph	25
2.2	Fluorescência	25
2.2.1	Análise da composição da proteína sob condições nativas	25
2.2.2	Avaliação de mudanças estruturais da lectina frente a extremos de pH	26

<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
3.1	Análise da estrutura secundária da proteína por Dicroísmo Circular (CD)	27
3.1.1	Análise da Estrutura frente a extremos de pH	27
3.1.2	Avaliação da Estabilidade Térmica da lectina de <i>Amansia multifida</i>	31
3.2	Análise da Composição Estrutural da lectina de <i>Amansia multifida</i> por Fluorescência	34
3.2.1	Análise da Estrutura da lectina frente a extremos de pH	34

### **CAPÍTULO 03 - Atividade Hipoglicemiante da Fração Protéica de *Amansia multifida***

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>38</b>
1.1	Usos e Propriedades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas	38
1.2	Diabetes	40
1.2.1	Considerações Gerais	40
1.2.2	Indução do diabetes na experimentação animal	43
1.2.3	Utilização de plantas e algas no tratamento do Diabetes	44
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
2.1	Ensaio de Atividade Hipoglicemiante	48
2.1.1	Drogas e reagentes	48
2.1.2	Animais	48
2.1.3	Indução do diabetes	48
2.1.4	Administração da droga	49
2.1.5	Análise e interpretação dos dados	49
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
3.1	Ensaio de Atividade Hipoglicemiante	50
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS</b>	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
<b>CAPÍTULO 01 – Caracterização Físicoquímica da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>A. multifida</i></b>		
1.	Alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>	3
2.	Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i> .	13
3.	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F (0/70) da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i> .	15
4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do PI total e da lectina purificada de <i>Amansia multifida</i>	16
5.	Eletroforese Bidimensional da lectina de <i>Amansia multifida</i> , mostrando a presença de isoformas	20
6.	Seqüência N-terminal da lectina isolada da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>	21
<b>CAPÍTULO 02 - Estudos Biofísicos da Lectina da Alga Marinha <i>A. multifida</i></b>		
7.	Espectro de CD da lectina de <i>Amansia multifida</i> em condições nativas comparado a espectros proteínas conhecidas utilizando-se diferentes programas.	28
8.	Espectro da estrutura secundária da lectina de <i>Amansia multifida</i> em condições nativas pelo programa Contin	29
9.	Efeito do pH na estrutura secundária da lectina de <i>Amansia multifida</i> .	30

10	Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de <i>Amansia multifida</i> por dicroísmo circular.	32
11	Temperatura média de desnaturação da lectina de <i>Amansia multifida</i> a pH 7,0. Os espectros das diferentes temperaturas de CD foram medidos a 205 nm.	32
12	Espectro de CD da lectina de <i>Amansia multifida</i> após aquecimento por 10 min e incubação a 25° C por 30 min.	33
13	Espectro de emissão de fluorescência da lectina de <i>Amansia multifida</i> em condições nativas, pH7,0, quando excitada a 280 e 295 nm.	35
41	Espectro de fluorescência da lectina de <i>Amansia multifida</i> incubada em diferentes pHs, excitada a comprimentos de onda de 280 nm (A) e 295 nm (B).	36

### **CAPÍTULO 03 - Atividade Hipoglicemiante da Fração Protéica de *Amansia multifida***

15	Efeito da F (0/70) da alga marinha <i>Amansia multifida</i> (AM) sobre a glicemia dos ratos diabéticos.	52
16	Porcentagem de redução dos níveis glicêmicos dos ratos tratados com a fração F(0/70) de <i>A.multifida</i> .	53

## LISTA DE TABELAS

Número	Título	Página
<b>CAPÍTULO 01 – Caracterização Físicoquímica da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>A. multifida</i></b>		
1.	Classificação da alga marinha estudada ( <i>Amansia multifida</i> )	3
<b>CAPÍTULO 03 - Atividade Hipoglicemiante da Fração Protéica de <i>Amansia multifida</i></b>		
2.	Efeito da fração protéica F(0/70) da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i> na mortalidade dos ratos diabéticos induzido por aloxano	54

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Dithiothreitol
F (0/70)	Fração protéica 0/70
KDa	Kilodaltons
nm	Nanômetro
PI	Pico I
PII	Pico II
pI	Ponto isoelétrico
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N', tetremetiletilenodiamino
Tris	Tris-hidroxiaminometano
U.H.	Unidade de Hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que é ainda capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos 2 – 3%
µg	Micrograma

## RESUMO

A função de uma proteína é determinada pela sua estrutura. Em decorrência, o estudo estrutural de biomoléculas potencialmente ativas pode levar a uma melhor compreensão de seu mecanismo de ação, quanto as suas atividades biológicas. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar estruturalmente a lectina de *Amansia multifida*, cuja fração protéica, possui um potencial hipoglicemiante. A fração rica em proteínas (F0/70) I foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel para eluição do pico I. Este pico protéico foi selecionado quanto à atividade hemaglutinante, coletado e empregado para o isolamento da lectina. Como observado por SDS-PAGE, PI apresentou elevado grau de purificação pela presença de uma única banda protéica (lectina). Por eletroforese bidimensional foram detectadas cinco isoformas. A seqüência N-terminal obtida (20 aminoácidos) não apresentou semelhança com nenhuma outra seqüência depositada em bancos de dados, sugerindo que ela não pertença a nenhum grupo de lectinas de algas conhecidas. Essa proteína foi caracterizada estruturalmente, por técnicas espectrocópicas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência. A análise por CD mostrou que a lectina era constituída por 4% de  $\alpha$ - hélice, 43% de folha beta, 21% de voltas e 32% de estrutura não ordenada, segundo o programa de desconvolução Contin. Ainda por CD, a proteína foi também avaliada quanto a estabilidade estrutural frente a extremos de temperatura e pH. Quando submetida a variações de temperatura de 10 – 85 °C foi verificado que a proteína mostrou 50% de desnaturação a aproximadamente 40,2 °C, mostrando-se completamente desnaturada a 85 °C. Tal desnaturação mostrou-se irreversível, já que após ser incubada novamente sob condições nativas, a lectina não foi capaz de recuperar sua estrutura original. Extremos de pH (3,0 e 11) não alteraram sua estrutura secundária, demonstrando a estabilidade da mesma nesse aspecto. Quanto aos dados de fluorescência, as leituras realizadas a 280 e 295 nm, mostraram a presença de aminoácidos aromáticos que emitem fluorescência, tais como triptofano e tirosina. Espectros de fluorescência frente a extremos de pH, não mostraram grandes alterações que pudessem refletir em mudanças estruturais, já que não houve deslocamento do pico máximo de emissão em nenhuma situação testada. Ensaio biológicos de atividade hipoglicemiante realizados com a F 0/70 de *A. multifida*, mostraram que a mesma foi capaz de reduzir significativamente o nível de glicose sanguínea dos animais com estado diabético induzido por aloxano.

## ABSTRACT

The function of a protein is determined by its structure. As a result, the structural study of potentially active biomolecules can lead to a better understanding of its mechanism of action, as their biological activities. Thus, this study aimed to purify and structurally characterize the lectin from red seaweed *Amansia multifida* protein fraction which has a potential hypoglycemic. The protein fraction (F 0/70) was subjected to an ion-exchange chromatography on a column of DEAE-Sephacel to elution of the first peak (PI). This peak was selected as the hemagglutination activity was obtained then the lectin from *A. multifida*, verified by SDS-PAGE. For two-dimensional electrophoresis were detected five isoforms. The N-terminal sequence (20 amino acid) showed no similarity to any sequence deposited in databases, suggesting that it does not belong to any group of algae known lectins. The lectin was structurally characterized by spectroscopic techniques of circular dichroism (CD) and fluorescence. The CD analysis showed that the lectin was composed of 4%  $\alpha$ - helix, 43% beta sheet, 21% turn and 32% unordered structure, according to the deconvolution program Contin. It was also verified by CD, the structural stability of the protein against the extremes of pH and different temperatures. When subjected to temperature of 10-85 ° C was found that the protein showed 50% of the denaturation in 40.2 ° C, being completely denatured at 85 ° C. Such a distortion was shown to be irreversible, since after being incubated again under native conditions, the lectin was not able to recover its original structure. Extremes of pH (3.0 and 11) did not alter the secondary structure of the protein. For the fluorescence data read out at 280 and 295 nm, showed the presence of aromatic amino acids that fluoresce, such as tryptophan and tyrosine. Fluorescence spectra measured, even in the face of extremes of pH, showed no major changes that could reflect structural changes in order not to shift the peak of the emission measurements. Biological assays of hypoglycemic activity carried out with the F 0/70, containing the lectin from the algae showed that it was able to significantly reduce the blood glucose level of animals with diabetic state induced by alloxan.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Isolamento e caracterização estrutural da lectina de *Amansia multifida* e avaliação do potencial hipoglicemiante de sua fração protéica F(0/70).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Purificação da lectina de *Amansia multifida* com auxílio de técnicas cromatográficas, seguidas de eletroforese;
- Caracterização estrutural da lectina por métodos espectroscópicos de Dicroísmo Circular e Fluorescência;
- Determinação da seqüência amino-terminal da lectina purificada;
- Ensaio da atividade hipoglicemiante da fração (F 0/70) da alga marinha vermelha *Amansia multifida*.

# **CAPÍTULO 01**

## **Caracterização Físicoquímica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida***

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Algas Marinhas

As algas marinhas pertencem a vários grupos taxonômicos heterogêneos caracterizados por terem a capacidade de se difundir em ambientes susceptíveis à colonização (PEREZ-LORENZO *et al.*, 1998), e constituem um grupo muito diversificado de organismos, pouco relacionados entre si, a não ser pelo fato de possuírem clorofila a e liberarem oxigênio no processo de fotossíntese. Exatamente por isso, desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos como produtores primários, constituindo a base das cadeias alimentares em rios, lagos e oceanos (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997).

A exploração comercial de algas marinhas, em grande parte baseada no cultivo de espécies comestíveis ou produção de ágar, carragenana e alginatos, se tornou uma indústria que gera milhões de dólares. Nos últimos anos, empresas farmacêuticas estão utilizando os organismos marinhos, incluindo as algas marinhas, em busca de novas substâncias naturais, para a utilização em pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004).

Cerca de 4 milhões de toneladas de algas são colhidas anualmente em todo o mundo, sendo chineses e japoneses os seus principais produtores, seguidos pelos norte-americanos e noruegueses. A partir das algas é possível a obtenção de produtos a baixo custo, que são de grande importância para a vida do homem moderno (ARMISEN, 1995).

Diversos fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar no desenvolvimento de comunidades de algas. As algas podem sofrer efeitos diretos, em curtos tempos e também efeitos indiretos, decorrentes dos efeitos diretos sobre outros organismos no meio. Existem interações entre a comunidade de algas e o ambiente que apresentam estes efeitos, podendo causar vantagens e desvantagens às algas (VIDOTII e ROLLEMBERG, 2004).

### 1.1.1 – Classificação

As algas são separadas pelo tamanho em dois grupos: as algas microscópicas (microalgas), invisíveis a olho nu, e as algas macroscópicas (macroalgas), com tamanhos que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997).

As macroalgas são apresentadas em três divisões dentro do reino Protista: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas). Sendo, comumente, classificadas de acordo com características bioquímicas de seus

cloroplastos, estrutura física, coloração predominante, substâncias de reserva, e ciclo reprodutivo (RAVEN *et al.*, 2001).

A classe Rhodophyceae possui o maior número de algas já estudadas. Cerca de 4000 espécies de algas vermelhas são abundantes nas águas tropicais quentes, podendo ser encontradas também nas regiões mais frias do mundo, como pólos.

A **TABELA 1** mostra a classificação geral da alga marinha vermelha *Amansia multifida* (**FIGURA 1**), utilizada no presente estudo.

**TABELA 1:** Classificação da alga marinha estudada (*Amansia multifida*)

---

Domínio: Eukaryota
Reino: Protista
Filo: Rhodophyta
Classe: <i>Rodhophyceae</i>
Ordem: Ceramiales
Família: Rodhomelaceae
Gênero: <i>Amansia</i>
Espécie: <b><i>Amansia multifida</i></b>

---

Fonte: WYNNE (1998).



**FIGURA 1:** Alga marinha vermelha *Amansia multifida*

O crescente interesse em produtos químicos de origem marinha tem conduzido à descoberta de novos componentes biologicamente ativos e, as algas marinhas têm sido objeto de crescente estudo com esse propósito. (AMICO, 1995).

Tais organismos marinhos têm-se destacado por serem constituídos de uma elevada quantidade de macromoléculas solúveis em água tais como polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas e outros componentes menos polares e de baixo peso molecular, alguns deles exibindo *in vitro*, propriedades biológicas particulares, como, por exemplo, as lectinas, proteínas que são alvos de muitos estudos nesses organismos.

## 1.2 - Lectinas

### 1.2.1 – Definições e Considerações Gerais

As lectinas são consideradas uma classe especial de proteínas, devido a sua propriedade de ligação específica e reversível a carboidratos, sua capacidade decodificadora de informações biológicas, como também o seu possível papel no reconhecimento celular.

O estudo das lectinas foi iniciado por STILLMARK (1888), quando verificou que extratos de sementes de algumas plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicas para animais. Além disso, ele mostrou que a ricina, isolada de sementes de *Ricinus communis*, aglutinava células epiteliais, hepáticas e leucocitárias. Na mesma ocasião, o autor encontrou propriedades semelhantes em extrato de outra semente, *Cróton triglium*, que apresentava especificidade diferente da ricina. Em seguida, HELLIN (1891) relatou a presença de outra lectina tóxica, em sementes de *Abrus precatorius*, que foi denominada de abrina.

As investigações com as lectinas trouxeram diversos avanços para a imunologia, desde que PAUL EHRLICH (1891) reconhecido como o pai da imunologia moderna, descobriu o uso de ricina e abrina como modelos de imunógenos potentes para indução de anticorpos específicos, significativamente melhor que os das bactérias. Posteriormente, NOWEL (1960) demonstrou as propriedades mitogênicas das lectinas ao observar que a lectina de *Phaseolus vulgaris* era capaz de induzir a proliferação “in vitro” de linfócitos.

O conhecimento sobre lectinas tem revelado sucessivas definições para esta proteína especial, dentre as quais, a mais recente e mais apropriada é aquela citada por PEUMANS & VAN DAMME (1995), que as definiram como “proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica”. CUMMINGS (1997) definiu uma lectina, como uma proteína que se liga a carboidrato, que não seja anticorpo e não tenha atividade enzimática para carboidratos.

A especificidade por açúcar é uma característica marcante das lectinas. A interação das lectinas com células é, portanto, dependente da presença dos carboidratos apropriados

na sua superfície. Deste modo, as lectinas ao interagirem com os carboidratos da superfície dos eritrócitos induzem ligações cruzadas entre as células, que resultam na aglutinação, denominada tecnicamente de aglutinação celular ou hemaglutinação (LIS e SHARON, 1998).

Tendo em vista a definição de lectina alguns autores as subdividiram em grupos:

- Merolectinas – representadas por lectinas de baixo peso molecular que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato, não sendo, portanto, capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo, podemos citar a heveína, uma proteína que se liga a quitina, encontrada no látex de seringueira *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS, *et al.*, 1991) e proteínas monoméricas provenientes de espécies de orquídeas com especificidade por manose (VAN DAMME, *et al.*, 1994).

- Hololectinas – representadas por lectinas que possuem mais de um sítio de ligação à carboidrato, podendo estes serem iguais ou homólogos. São constituídas exclusivamente por domínios ligantes a carboidrato, não possuindo qualquer outra atividade, Compreende todas as lectinas com múltiplos sítios de ligação que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (ANDRADE, 2006).

- Quimerolectinas – correspondem a lectinas que possuem um domínio ligante a carboidrato e um segundo domínio com uma atividade catalítica (ou outra atividade biológica) bem definida, mas que atuam de maneira independente dos domínios ligantes a carboidratos. Como exemplo deste grupo podemos citar as RIPs do tipo 2 e as quitinases do tipo 1 de plantas.

- Superlectinas – são consideradas um tipo especial de quimerolectinas. Elas possuem, pelo menos, dois sítios estruturalmente distintos de ligação a carboidrato, cujos quais reconhecem, portanto, carboidratos diferentes. A lectina de bulbos de tulipa (CAMMUE, *et al.*, 1986) é dotada de tais características, possuindo sítio de ligação para N-acetilgalactosamina e outro para manose (VAN DAMME, *et al.*, 1996).

- Multilectinas: são lectinas que possuem mais de um sítio estruturalmente idêntico para carboidrato, mas que, no entanto, ligam carboidratos diferentes (MONTEIRO-MOREIRA, 2002). Lectinas de *Actocarpus incisa* (frutalina) e *Actocarpus integrifolia* (jacalina) são exemplos de multilectinas.

As lectinas são encontradas na maioria dos organismos (vírus, bactérias, plantas, algas e animais). A maioria das lectinas estudadas foi isolada de plantas, dentre mais de 1000 espécies. Estas proteínas estão distribuídas em muitos tecidos vegetais como, raízes, cascas, folhas, frutos, sementes, bulbos e rizomas, dependendo de cada vegetal. No entanto, é nas sementes que elas são mais abundantes chegando em alguns casos a 10% das proteínas totais (WHITTAKER, 1969; BROEKART *et al.*, 1984; ETZLER, 1985; VAN DAMME *et al.*, 1987a,b; SHARON & LIS, 1989; LIS & SHARON, 1981,1998).

As lectinas, por apresentarem propriedades particulares, têm sido empregadas largamente no campo da fisiologia e na ciência bioquímica e biomédica. Creditam-se as lectinas um papel de reconhecimento em uma variedade de sistemas biológicos quer sejam microorganismos, plantas ou animais. Assim é que as lectinas, além de serem capazes de precipitar células e glicoconjugados, através de interação com a superfície da membrana, induzem uma série de modificações nas mesmas. Outras investigações têm mostrado a aplicação de lectinas no estudo e caracterização de glicoconjugados de superfície celular, através de cromatografia de afinidade, utilizando lectinas imobilizadas.

### **1.2.2 – Estudos de Isolamento e Caracterização de Lectinas de Algas Marinhas**

As lectinas de algas marinhas foram detectadas pela primeira vez por Boyd e colaboradores (1966) quando estudaram 24 extratos aquosos de diferentes espécies de algas, compreendidos entre pardas, verdes e vermelhas. Tendo sido observado que algumas algas pardas e verdes aglutinaram inespecificamente eritrócitos de todos os grupos, enquanto uma alga vermelha apresentou especificidade para eritrócitos humanos do grupo A.

A partir deste trabalho inicial, muitos outros relacionados ao levantamento da atividade hemaglutinante em extratos de algas foram realizados. Paralelamente a isto, algumas lectinas de algas passaram a ser isoladas e caracterizadas por diversos pesquisadores de várias partes do mundo. Este interesse levou à obtenção de dados interessantes sobre estas proteínas, o que permitiu uma melhor compreensão de suas características mais importantes.

A primeira hemaglutinina isolada e caracterizada foi proveniente da alga marinha *Ptilota plumosa*. Esta lectina mostrou-se dependente de cátions divalentes para manutenção de sua atividade hemaglutinante que era inibida por p-nitrofenil-alfa-D-galactosídeo. Depois de realizada a filtração em gel verificou-se que a atividade hemaglutinante era proveniente da ação de duas moléculas com pesos moleculares de 60 e 170 KDa, cujos quais foram confirmados por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, sendo revelado, ainda por essa técnica, que se tratavam de proteínas monoméricas (ROGERS *et al.*, 1977; ROGERS e BLUNDEN, 1980).

A classe Rhodophyceae apresenta o maior número de hemaglutininas isoladas e caracterizadas. Muitos protocolos para extração de proteínas têm sido publicados (FLEURENCE *et al.*, 1995). Em geral, eles fornecem apenas um suporte inicial para pesquisas.

O isolamento de lectinas foi inicialmente realizado através de métodos clássicos de fracionamento de proteínas tais como, precipitação salina, cromatografias e eletroforeses. A princípio, o isolamento de proteínas de algas marinhas se faz, de modo geral, realizando-se extração protéica do material biológico em soluções tamponantes contendo sal.

Posteriormente, seguem-se várias etapas de fracionamento dessas proteínas solúveis que vão desde a precipitação salina até a realização de várias cromatografias, tais como troca iônica, de afinidade, filtração em gel, entre outras, cuja utilização dependerá do objetivo almejado (ANDRADE, 2006).

As cromatografias de troca iônica têm-se mostrado de grande auxílio em procedimentos de purificação de lectinas de algas, sendo em alguns casos, suficiente para o isolamento dessas proteínas em algumas espécies, ou podendo ainda, estar associada a outras técnicas cromatográficas para a obtenção da proteína purificada.

A descoberta da cromatografia de afinidade por AGRAWAL e GOLDSTEIN (1965), com o isolamento da lectina de *Canavalia ensiformes* (Con A) em coluna de Sephadex, levou a uma elevada tendência de sua utilização em muitos processos de isolamento de lectinas. Atualmente, muitos experimentos associam métodos convencionais de isolamento à cromatografias de afinidade para obtenção de suas moléculas purificadas.

O esquema de fracionamento a ser seguido depende da especificidade da lectina por açúcar. Em muitos casos matrizes estão disponíveis comercialmente, como o Sephadex e a Sepharose. Em outros casos, são utilizadas colunas de mono e oligossacarídeos e glicoproteínas ligadas a matrizes estáveis, como Avidina-Sepharose (COSTA *et al.*, 1999), Mucina-Sepharose (NEVES, 2001), e mais recentemente, tem se desenvolvido muito o uso de gomas naturais, após tratamento por reticulação com epícloridrina (MOREIRA *et al.* 1997; ROSA, 2000; MELO, 2001). A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia de adsorção, no entanto, a natureza da sua ligação é mais específica, e a matriz escolhida deverá conter um ligante que será reconhecido pela molécula. Quando aplicamos a esta matriz uma solução protéica, e o ligante apresenta afinidade por uma proteína de interesse, esta ficará retida à matriz, enquanto as demais proteínas serão eluídas por lavagem com tampão de equilíbrio.

O emprego desta técnica de cromatografia de afinidade tem proporcionado alguns avanços na facilitação do isolamento e no aumento do rendimento da proteína isolada. Lectinas de sete espécies de algas da família Chlorophyceae, apresentaram em sua maioria, especificidade por N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc), sendo purificadas em colunas de GalNAc-Sepharose ou GlcNAc-agarose (LOVELESS & ROGERS, 1985; FABREGAS *et al.*, 1988; ROGERS & FANGLU, 1991; BENEVIDES, 2001). Oito espécies de algas da família Rhodophyceae foram isoladas ou purificadas através de matrizes de afinidade. Dentre as espécies testadas, metade delas tiveram suas lectinas isoladas em coluna de Manana-Sepharose e inibidas por um grande número de glicoproteínas (HORI *et al.*, 1987; OKAMOTA *et al.*, 1990; FARIAS, 1995; BENEVIDES *et al.*, 1996).

As lectinas de algas marinhas são um grupo de proteínas com características físico-químicas e estruturais distintas, comparativamente as lectinas de plantas superiores. Quanto

às suas estruturas primárias, poucos estudos foram realizados até hoje, dentre eles podemos citar o estudo realizado com as lectinas, hypninas A-1 e A-2, de *Hypnea japonica* que tiveram suas seqüências parcialmente elucidadas (HORI *et al.* 2000). Os autores mostraram que as hemaglutininas, hypninas A-1 e A-2, eram polipeptídeos de cadeia única, compostos de 90 resíduos de aminoácidos que incluem quatro “half-cystines”, isto é, duas pontes dissulfeto (intracadeia) envolvendo os resíduos Cys<sup>5</sup> - Cys<sup>62</sup> e Cys<sup>12</sup> - Cys<sup>89</sup>. As massas moleculares de 9,1467 e 9,1097 KDa obtidas para as hypninas A-1 e A-2, respectivamente, coincidiram com os valores determinados de 9,148 e 9,109 KDa através de espectrometria de massa. As lectinas diferiram levemente uma da outra; para a hypnina A-1 as posições Pro<sup>19</sup>, Arg<sup>31</sup> e Phe<sup>52</sup> correspondem a Leu<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup>, e Tyr<sup>52</sup> para a hypnina A-2. Aproximadamente 43% do número total de resíduos, consistiram de três tipos de aminoácidos: serina, glicina, e prolina.

As lectinas de duas espécies de algas marinhas vermelhas, pertencentes ao mesmo gênero, *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *B.seaforthii* (BS) foram isoladas ao terem suas frações protéicas submetidas a cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Estas apresentaram atividades inibidas por glicoproteínas; fetuína, avidina e mucina, mostrando-se dependentes de cátions divalentes. Seus pesos moleculares aparentes foram obtidos por filtração em gel de Sephadex G-75, apresentando-se em torno de 3,5 e 4,0 KDa para BT e BS, respectivamente. (AINOUZ *et al.*, 1995).

Após cinco anos de realizado o isolamento por Ainouz e colaboradores em 1995, a aglutinina de *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin), teve então, sua seqüência de aminoácidos determinada pela combinação do método clássico de degradação de Edman e por espectrometria de massa (CALVETE *et al.*, 2000). Os autores apresentaram para suas isoformas, valores correspondentes a 8,9805, 8,9644 e 8,9495 KDa conforme calculados por espectrometria de massa. Sua estrutura é composta por 91 aminoácidos, possuindo duas pontes dissulfeto intracadeia de padrão 1-2, 3-4. Não foi observada similaridade de sua seqüência com nenhuma outra lectina de planta ou animal.

A lectina da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (HML) teve sua massa molecular (9,3 kDa) determinada por espectrometria de massa em MALDI-TOF/MS, e sua seqüência primária mostrou 90 aminoácidos contendo 14 cisteínas (NAGANO *et al.*, 2002).

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 – Obtenção da alga**

A alga marinha vermelha *Amansia multifida*, foi coletada na praia de Guajirú, município de Trairí, litoral cearense, em marés de sizígia. Após coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, resfriadas e levadas ao Laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, onde foram retirados sal e epífitas. Os exemplares coletados foram estocados a – 20 °C para posterior utilização.

### **2.2 – Eritrócitos**

Amostras de sangue de coelho albino foram obtidas de animais adultos e sadios mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Os eritrócitos foram lavados 6 vezes com NaCl 0,15 M. Após esse processo foi realizada a dosagem de hematócrito para preparação de uma suspensão de sangue de concentração de 2,3%. Esta foi, então, tratada enzimaticamente com 0,1 mg de tripsina para cada 10 ml de sangue e a enzima mantida em contato com os eritrócitos por 1 hora a 25 °C, após leve homogeneização. Passado esse período a suspensão de eritrócitos foi novamente lavada 6 vezes com NaCl 0,15 M e ressuspensos de modo a obter um volume final cuja concentração de eritrócitos fosse de 2,3 %.

### **2.3 – Reagentes**

- Ácido acético glacial – (Merck, Alemanha); Acrilamida – (Sigma, U.S.A.); Albumina Sérica Bovina – (Sigma, U.S.A.); Comassie Brilliant Blue G-250 – Sigma, U.S.A.); DEAE – Sephacel – (Merck, Darmstadt, Alemanha); Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) – (Biorad); Marcadores de alto peso molecular (14,0 - 65,0 KDa) para eletroforese (SIGMA Chemical Co., St Louis U.S.A.);  $\beta$ -Mercaptoetanol – (Sigma, U.S.A.); N,N'-metilenobisacrilamida – (Sigma, U.S.A.); Persulfato de Amônio – (Bioreagent); TEMED – (Sigma, U.S.A.)

- Os demais reagentes foram de grau analítico e, obtidos comercialmente.

### **2.4 - Preparação da Fração protéica**

A alga dessecada foi macerada em nitrogênio líquido e submetida à extração com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M na relação 1:8 (peso/volume) por 6 horas, sob agitação constante. O material foi filtrado e centrifugado (7.000 x g por 30 min), o sobrenadante obtido, denominado extrato total foi, então, tratado com sulfato de amônio (70% de saturação) e mantido em repouso por 12 horas para

obtenção da fração protéica da alga. A suspensão foi centrifugada a 7.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 e posteriormente dialisado exaustivamente contra água e por último contra o mesmo tampão, sob leve agitação constante para obtenção da fração protéica de *Amansia multifida* F(0/70). Essa fração foi utilizada em ensaios biológicos de redução de glicose em ratos diabéticos e em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE – Sephacel para a obtenção da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* como mostrado no esquema da **FIGURA 2**.

## **2.5 - Determinação de Proteínas**

As dosagens de proteínas solúveis presentes na fração protéica F(0/70) e demais amostras foram realizadas segundo o método de (Bradford, 1976).

A medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III) foi utilizada para o monitoramento de proteína nos eluatos das cromatografias.

## **2.6 - 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 0,15 M. No primeiro tubo foram adicionados 100 µl da amostra e uma série de diluições duplas foram realizadas (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 uma suspensão de eritrócitos de coelho (2 - 2,5 %) e a reação foi incubada à temperatura ambiente, por 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/ml), que corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que apresente nítida aglutinação.

## **2.7 - Purificação da Lectina por Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sephacel**

A fração 0/70 obtida de *A. multifida*, segundo o esquema mostrado na **FIGURA 2** foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE - Sephacel. A coluna foi montada por gravidade e com o auxílio de bomba peristáltica equilibrada com tampão Fosfato 0,02 M, pH 7,0. A fração previamente dialisada contra água seguida do tampão de equilíbrio, foi aplicada à coluna, e o primeiro pico foi eluído com este mesmo tampão, em seguida, uma solução de NaCl 1,0 M foi aplicada para liberação das proteínas adsorvidas à coluna. A cromatografia foi realizada com um fluxo constante de 40 ml.h<sup>-1</sup>, frações de aproximadamente 3 ml foram coletadas e suas absorvâncias determinadas a 280 nm em espectrofotômetro. Para cada tubo coletado do pico I, alíquotas de 100 µl foram retiradas para

a realização de ensaios de hemaglutinação frente a eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Oito diluições seriadas foram realizadas com NaCl 0,15 M para cada tubo. Os tubos com maior atividade hemaglutinante foram separados dos que possuíam menor atividade e ambos foram concentrados em tubos Milipore (Amicon) para serem utilizados posteriormente.

## **2.8. - Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (PAGE-SDS) segundo o método de Laemmli (1970) foi empregada para avaliar o grau de pureza da lectina extraída da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. O coramento do gel foi realizado na presença de Comassie Brilliant Blue R-250.

## **2.9 - Eletroforese Bidimensional**

### **2.9.1 - Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)**

Tiras de 11 centímetros contendo gel com gradiente de pH imobilizados variando entre 3-10 (Amersham) foram re-hidratadas durante 12 horas com solução tampão de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, 1% de CHAPS, 0,5% de Pharmalyte 3-10, 4-7 ou 6-11, DTT 65mM). Os géis foram re-hidratados em uma cuba de re-hidratação "Reswelling Tray" (Pharmacia Biotech) com 200  $\mu$ L de solução contendo a massa desejada da proteína a ser analisada. A focalização isoelétrica foi realizada utilizando o aparelho Ettan IPGphor II obtido da Amersham Biosciences cujas condições elétricas seguiram um programa pré-estabelecido (100V durante 1 hora; 500V durante 1 hora e 30 min; 5000V durante 2 horas; 10000V até atingir 18.000 VhT).

Após a etapa de focalização isoelétrica, os géis foram transferidos para tubos apropriados contendo 3 ml de tampão de equilíbrio (Tris 50mM, Glicerol 30 %, 6M uréia, 2 % de SDS e 1 L de azul de bromofenol) contendo 57,8 mg de DTT e deixados sob agitação lenta durante 15 minutos.

### **2.9.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Segunda Dimensão)**

Após tratamento dos géis com tampão de equilíbrio, estes foram mergulhados em tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%) para remover o excesso de solução de equilíbrio. Em seguida os géis foram colocados no topo do gel de segunda dimensão e fixados com tampão de corrida contendo 0,5 % de ágar e Azul de Bromofenol. A segunda dimensão foi realizada em um sistema vertical. Para tanto foi utilizado gel de poliacrilamida (12,5%) de 14 x 14 cm. O sistema foi alimentado por uma fonte Electrophoresis Power Supply ESP 301 (Pharmacia) e a corrida realizada a 25mA, 150V. As

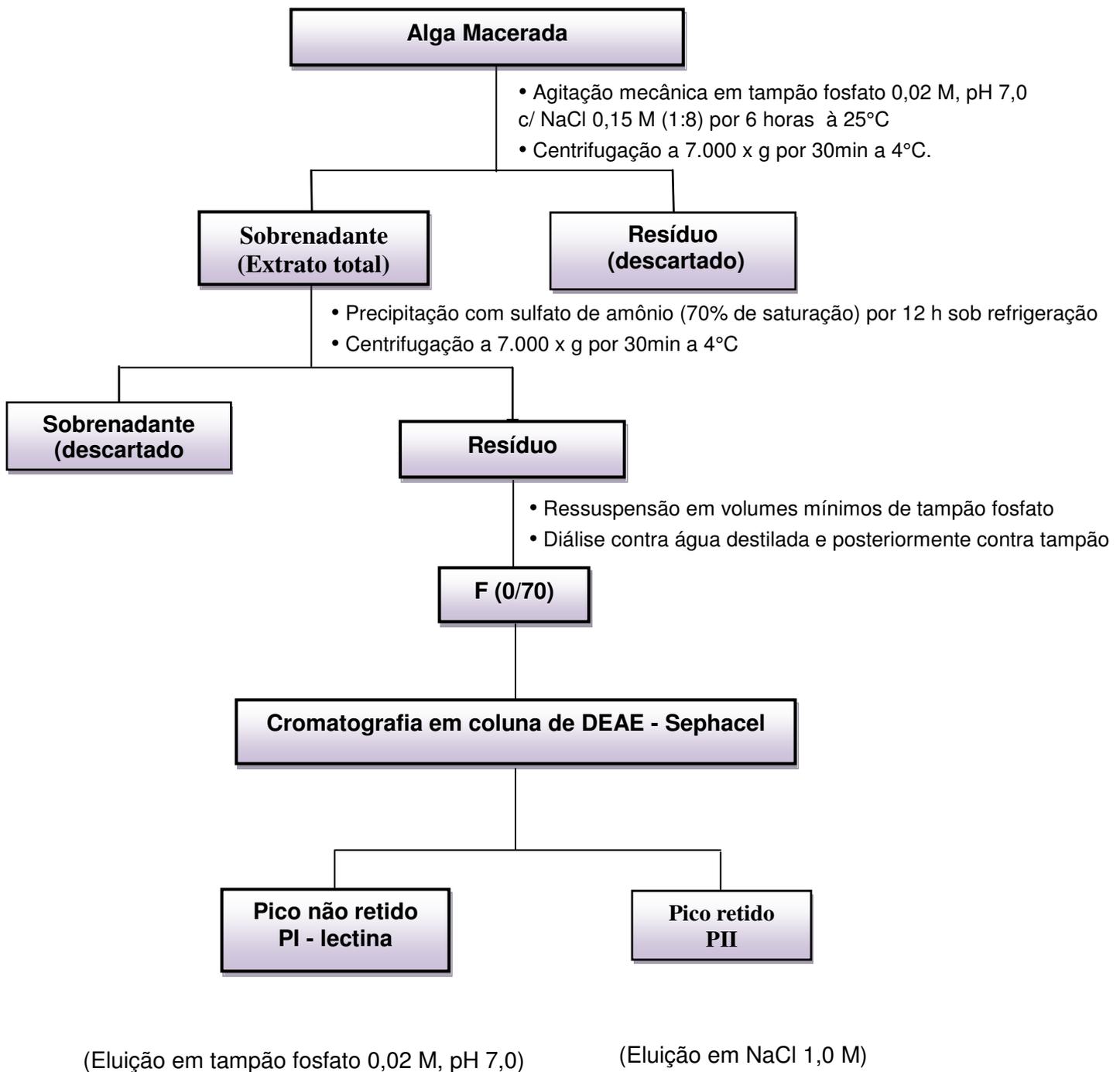
proteínas foram visualizadas através do coramento do gel com Comassie Brilliant Blue R-250 seguida da remoção do corante não ligado às proteínas por uma solução descorante contendo metanol, ácido acético, água.

### **2.9.3 - Análise do Gel**

Após descoramento do gel, ele foi armazenado em uma solução de glicerol, metanol e água e posteriormente foram digitalizados no scanner ImageScanner UTA-1100 (Amersham Bioscience). As imagens capturadas pelo programa LabScan versão 5.0 (Amersham Bioscience) foram analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 obtido da GE Healthcare, sendo os géis analisados quanto ao total de proteína presente na amostra e aos valores estimados do ponto isoelétrico e massa molecular da proteína observada.

### **2.10 - Seqüência de aminoácidos**

A seqüência de aminoácido N-terminal foi realizada por degradação de Edman (1950) em um seqüenciador automático de proteína PPSQ-23<sup>a</sup> da Shimadzu. A seqüência obtida foi submetida ao alinhamento automático, utilizando o sistema de busca NCBI-BLAST para proteína.



**FIGURA 2** - Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida*.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

A purificação da lectina *Amansia multifida* foi realizada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel, cujo perfil cromatográfico encontra-se na **FIGURA 3**, bem como os resultados dos ensaios de atividade hemaglutinante para cada tubo do pico não adsorvido a coluna (PI) e pico retido (PII).

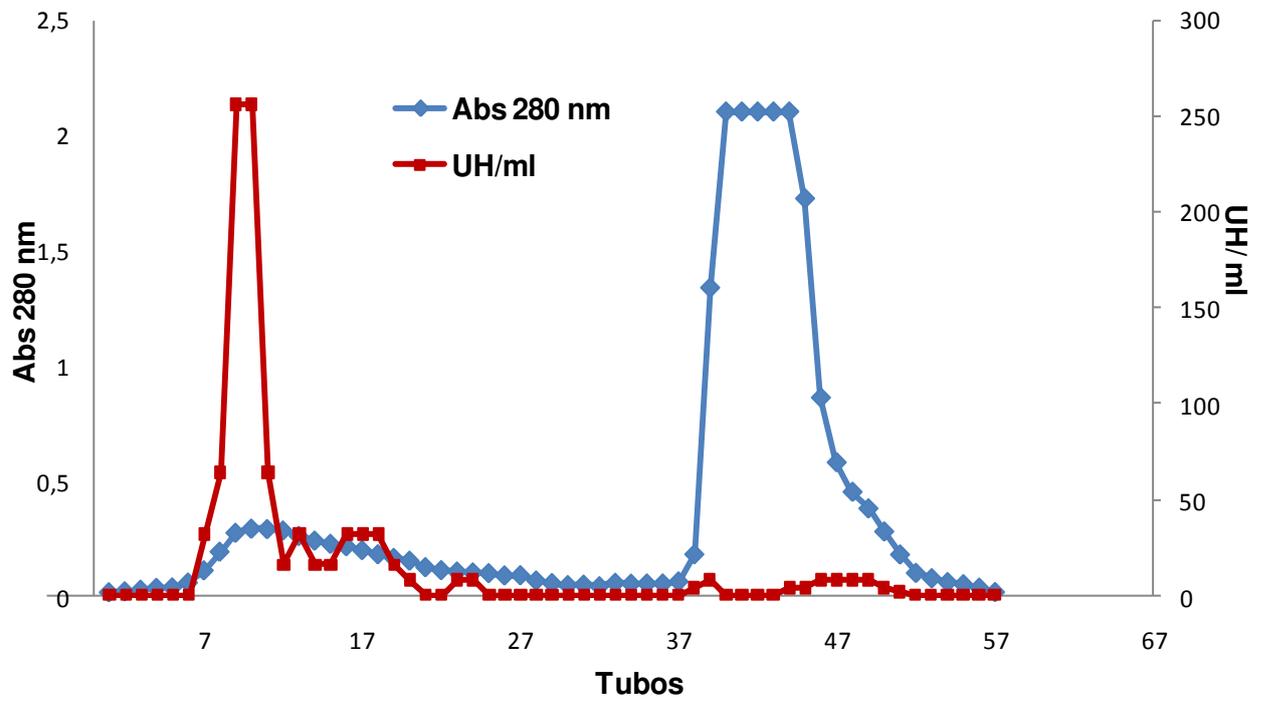
A pureza da proteína foi verificada por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS- PAGE), cujo peso molecular aparente foi de aproximadamente 30 KDa.

A eletroforese mostra 2 linhas (L2 e L3) em que se pode observar a presença de contaminantes na amostra. Estas linhas representam o pico I de cromatografias de troca iônica, realizadas anteriormente, em que tubos que apresentaram leituras significantes a 280 nm foram reunidos, obtendo-se o PI total, e, só então, avaliados quanto à capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho tripsinizados. No entanto ao se realizar novas cromatografias cujo procedimento se baseava em selecionar todos os tubos do pico I, quanto as suas atividades hemaglutinantes, tubos que apresentaram maior atividade foram avaliados por eletroforese, podendo ser observado nas duas linhas seguintes (L4 e L5). Essas linhas mostram que apenas uma banda na faixa de 30 KDa foi revelada, obtendo-se portanto, a lectina purificada de *Amansia multifida* (**FIGURA 4**).

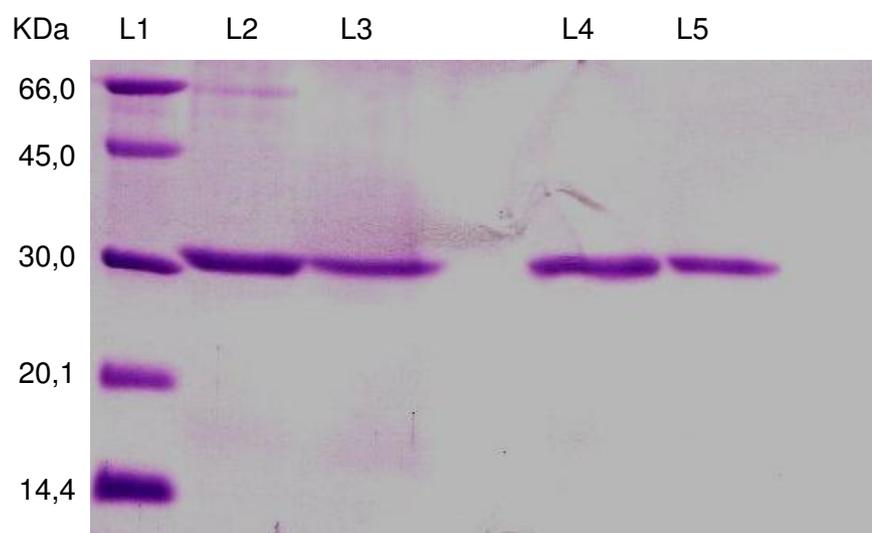
O isolamento da proteína em estudo foi semelhante ao realizado por Ainouz e colaboradores (1995) ao utilizarem cromatografia de troca iônica para a purificação de duas lectinas de algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *B.seaforthii* (BS), diferindo da técnica realizada, somente, quanto ao tipo de coluna utilizada e algumas estratégias experimentais.

A eletroforese mostrou, ainda, que quando submetida à ação do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (L5) a lectina de *Amansia multifida* apresentou somente uma banda que coincide com o peso molecular da proteína sem o agente redutor, podendo sugerir-se que a mesma é constituída de uma única subunidade.

O peso molecular aparente da lectina de *Amansia multifida* de 30 KDa mostrou-se de acordo com o valor encontrado por Costa *et al.* (1999) quando obteve a lectina da mesma alga marinha. No entanto, eles utilizaram diversas técnicas cromatográficas para essa purificação, tais como, cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel, seguida de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em coluna de Phenyl- Sepharose 4B, realizando-se ainda, uma cromatografia de afinidade em coluna de avidina-Sepharose 4B, técnicas que não foram necessárias para a obtenção da lectina neste trabalho.



**FIGURA 3:** Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharcel da fração F (0/70) da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0.



**FIGURA 4:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do PI total (L2 e L3 - c/ $\beta$  e s/ $\beta$ , respectivamente) e dos tubos de maior atividade do pico I - lectina purificada de *Amansia multifida* (linhas L4 e L5 - c/ $\beta$  e s/ $\beta$ , respectivamente). Gel corado com Comassie Brillhant Blue R-250.

### 3.2 – Eletroforese Bidimensional (2D)

O resultado da eletroforese bidimensional mostrou a presença de cinco “spots” de peso molecular aparente de 30 KDa, como observado por eletroforese unidimensional. Esses “spots” diferiram apenas quanto ao ponto isoelétrico (pI), sendo esses valores obtidos por análise do Programa ImageMaster e considerados bastante próximos, estando todos em uma faixa ácida de pH (5,66; 5,87; 6,05; 6,33 e 6,63). Foram revelados, ainda, três “spots” de peso molecular aparente de 17,6 KDa e pontos isoelétricos de 5,66; 5,87 e 6,32 (FIGURA 5).

Com base nesses resultados pode-se sugerir, portanto, que cinco isoformas protéicas da alga marinha vermelha foram observadas no gel e que os três “spots” de menor peso molecular correspondem a possíveis subunidades, uma vez que os pI(s) obtidos foram iguais aos de três supostas isoformas. Além disso, a aplicação de uma concentração maior de proteína para a 2D, pode ter favorecido o aparecimento dessas possíveis subunidades (spots com fraca visualização), não visualizadas em eletroforese unidimensional. No entanto, análises dos “spots” por Espectrometria de Massa se fazem necessários para a confirmação dos resultados sugeridos.

Os valores de pI(s) ácidos observados pela focalização isoelétrica realizada com a lectina de *Amansia multifida* estão de acordo com valores encontrados na literatura por alguns autores que fazem referência a lectinas de algas marinhas vermelhas.

A lectina da alga marinha vermelha *Palmaria palmata*, de peso molecular aparente de 43 KDa (duas subunidades de 20 KDa), apresentou um ponto isoelétrico de 4,6, que pôde ser explicado por ser composta em grande quantidade por aminoácidos hidroxilados e ácidos (KAMIYA *et al.*, 1982).

Três isoformas lectínicas foram isoladas da alga vermelha *Solieria robusta*. Essas isolectinas de peso molecular aparente de 23 KDa, apresentaram pontos isoelétricos ácidos (4,3, 4,2 e 4,1), tendo sido verificado, ainda, que essas proteínas mostraram-se ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados, resultados que corroboram com os valores de pI(s) encontrados. Ela mostrou possuir também, elevados percentuais de glicina (HORI *et al.* 1988 b).

Em 1990, Okamoto e colaboradores isolaram uma lectina presente na alga marinha vermelha *Gracilaria bursa-pastoris* de 15,5 KDa e pI de 4,7, sendo considerada uma glicoproteína monomérica rica em glicina e aminoácidos ácidos e hidroxilados.

Desse modo, o ponto isoelétrico ácido observado para as isoformas encontradas pode ser, também, devido a presença de aminoácidos ácidos na molécula protéica, no entanto outros estudos devem ser realizados nesse aspecto.

### 3.3 Seqüenciamento da lectina

A seqüência obtida da lectina pura segundo degradação de Edman, encontra-se mostrada na **FIGURA 6**.

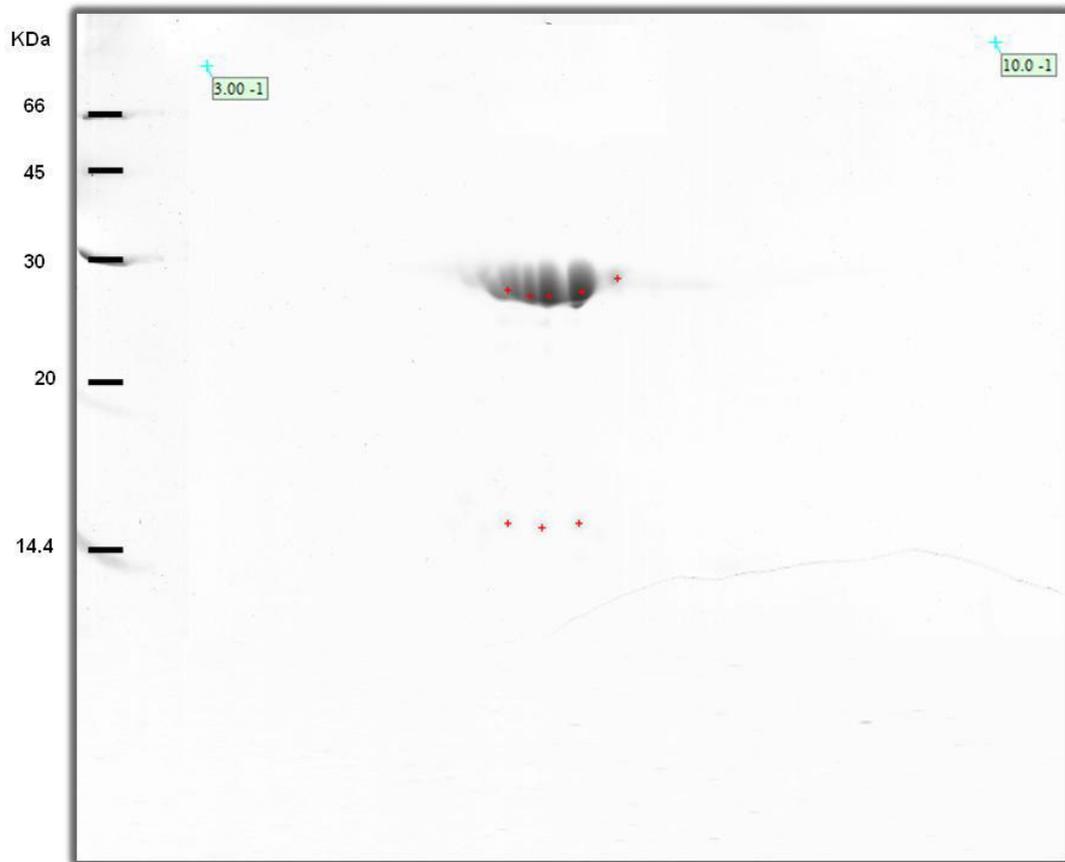
O seqüenciamento da região N-terminal foi realizado e 20 resíduos de aminoácidos foram obtidos, no entanto poucos estudos estruturais foram realizados até então com lectinas de algas, sendo mais comum, desde a primeira observação dessas moléculas nesses organismos marinhos, estudos de isolamento e caracterização parcial. Esses estudos referem-se, principalmente, às suas atividades biológicas, desde a característica que as define descrita por Peumans e Van Damme (1995) no que diz respeito à descoberta de que essas moléculas são capazes de aglutinar eritrócitos por se ligarem a carboidratos presentes na superfície de células, até as demais atividades biológicas e de caráter farmacológico que são particularmente diferentes dependendo da espécie em estudo. Isso difere bastante do que se tem quanto à lectinas de plantas, cujas características estruturais são bem conhecidas, podendo-se comparar estudos estruturais de moléculas descobertas recentemente com aqueles depositados em bancos de dados de modo que se possa avaliar a filogenia dessas moléculas e identificá-las taxonomicamente. (BOYD *et al.*, 1966).

Até o presente momento algumas poucas espécies de algas citadas a seguir tiveram suas lectinas isoladas e caracterizadas estruturalmente quanto as suas seqüências primárias. Em 2000, Calvete e colaboradores estudaram estruturalmente pela primeira vez uma lectina obtida da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* através de análises de espectrometria de massa e degradação de Edman, sendo verificado que a mesma continha cerca de 91 aminoácidos e duas pontes dissulfeto intracadeia com padrão 1-2, 2-3. A seqüência encontrada da lectina não era similar a de nenhuma outra seqüência de lectinas de plantas e animais quando realizada a pesquisa em bancos de dados utilizando o programa BLAST. No entanto, neste mesmo trabalho os autores relataram que estudos de caracterização estrutural estavam sendo desenvolvidos com duas lectinas de algas marinhas vermelhas: *Ptilota serrata* de 18 KDa, segundo Sampaio e colaboradores (1998) e *Meristiela echinocarpa* de 30 KDa. As seqüências N-terminal das lectinas estavam sendo estudadas pelo grupo, mas até então nenhuma publicação dos referidos trabalhos foi verificada. No mesmo ano foi obtida por degradação de Edman a seqüência de outra lectina de alga isolada de *Hypnea japônica*, os estudos estruturais mostraram que a lectina era constituída de uma única cadeia polipeptídica de 90 aminoácidos, possuindo duas pontes dissulfeto intracadeia de padrão 1-3, 2-4. Seqüências depositadas em bancos de dados não foram similares àquela isolada da alga marinha vermelha, no entanto, segundo o alinhamento de seqüências realizado, tal lectina parece possuir aminoácidos conservados na região C-terminal, sendo esta similar a regiões dos domínios de reconhecimento a

carboidratos de lectinas tipo C de animais. Os autores sugeriram, ainda, que a lectina continha um sítio de ligação para proteína e outro para carboidrato (HORI *et al.*, 2000).

A lectina da alga marinha verde *Ulva pertusa* foi seqüenciada em 2004 por Wang *et al.*, no entanto nenhuma similaridade foi obtida quando a seqüência foi comparada a de outras lectinas de plantas e animais depositadas em bancos de dados. O mais recente relato de estudos estruturais relacionados à lectinas de algas foi verificado em 2005 com o seqüenciamento da estrutura primária de duas lectinas de algas marinhas vermelhas pertencentes ao gênero *Hypnea*. As seqüências de aminoácidos das lectinas de *Hypnea cervicornis* (HCA) e *Hypnea musciformes* (HML), apresentaram 55% de identidade (80% de similaridade entre si), mas não se mostraram similares as seqüências de lectinas de algas, plantas e animais já conhecidas, sugerindo-se que estas possam pertencer a uma nova família de lectinas. Elas foram descritas como sendo cadeias polipeptídicas de 90 resíduos de aminoácidos contendo sete pontes dissulfeto intracadeia e duas subunidades ligadas por uma ponte dissulfeto (NAGANO *et al.*, 2005).

Desse modo, são escassas as informações bioquímicas e estruturais existentes quanto a lectinas de algas, e estes estudos limitam-se a apenas algumas espécies, o que dificulta a classificação funcional e filogenética dessas moléculas, inclusive da lectina da alga em estudo que não apresentou similaridade com nenhuma outra seqüência depositada em bancos de dados, não pertencendo, portanto, a nenhuma classe de lectinas de algas já conhecida.



**FIGURA 5:** Eletroforese Bidimensional da lectina de *Amansia multifida*. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

1 NAWYWPEQAYFWYEIWIGEE 20

**FIGURA 6:** Seqüência N-terminal da lectina isolada da alga marinha vermelha *Amansia multifida* obtida por seqüenciamento automático de Edman. Nenhuma similaridade foi observada da seqüência obtida com outras seqüências depositadas em bancos de dados após realizada a pesquisa pelo NCBI-BLAST.

## **CAPÍTULO 02**

### **Estudos Biofísicos da Lectina da Alga Marinha *A. multifida***

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1- Análise Estrutural de Proteínas por Dicroísmo Circular (CD)

Poucos estudos sobre a estrutura tridimensional das lectinas foram realizados até o momento, no entanto técnicas cada vez mais avançadas favorecem o desvendamento de estruturas protéicas, de modo que se possa entender melhor seus verdadeiros papéis biológicos. Dentre os diversos métodos de estudo da estrutura de proteínas a técnica de Dicroísmo Circular (CD) nos permite avaliar com rapidez e facilidade componentes estruturais de proteínas.

O fenômeno de Dicroísmo Circular (CD) refere-se à absorção diferenciada da luz, circularmente polarizada à direita e à esquerda. A forma do espectro de CD fornece informações sobre a estrutura secundária do meio no qual se encontra a proteína, além de permitir estimar as frações destas estruturas, utilizando programas específicos para estes cálculos. Desse modo, pode-se obter a composição estrutural da proteína quanto à quantidade de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , número de voltas, etc. (SHARON *et al.*, 2000, 2005). Uma vantagem dessa técnica em estudos de proteínas é que a informação estrutural pode ser completamente obtida da análise da região do espectro (SHARON *et al.*, 2005).

Além das informações citadas acima e realizadas com a lectina da alga marinha em estudo, a análise por CD pode ser aplicada sob sistemas biológicos fornecendo várias outras informações quanto ao estudo de proteínas, dentre os quais podemos citar a análise da estrutura terciária da proteína por “*fingerprint*”. O espectro de CD na região do infravermelho próximo (320-260 nm) reflete a região das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos e, portanto, fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína (KRITTANAI & JOHNSON, 1997).

É possível avaliar, também, a interação proteína-ligante, podendo-se então, verificar a integridade de cofatores no sítio ligante de suas respectivas proteínas, por exemplo. A não interação do ligante à proteína resultará no ligante livre em solução que refletirá em uma pequena, mas perceptível, mudança no sinal do espectro obtido em CD, dessa forma, pode-se realizar estudos avaliando tais interações (SHARON *et al.*, 2005).

Mudanças estruturais na proteína podem ser verificadas utilizando recursos como mudanças de temperatura, pH, excesso de ligante, entre outros, levando a avaliação da estabilidade estrutural da proteína através de mudanças no espectro de CD quando comparadas a proteínas em seu estado nativo. Assim, mudanças na região de máximo do pico de absorção podem revelar alterações conformacionais da proteína em estudo (GILETTO & PACE, 1996; JOHNSON & FERSHT, 1995; SHARON *et al.*, 2005).

A análise por CD permite, ainda, avaliar o reenovelamento ou renaturação de uma proteína previamente desnaturada, verificando-se o potencial da mesma em retornar a sua estrutura nativa após ser submetida a determinados processos que levaram a sua desnaturação. O resultado da análise de CD pode ser comparado ao de outras técnicas utilizadas no estudo estrutural de proteínas como Cristalografia de raio-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que são ótimas técnicas de análise estrutural, no entanto, em contraste ao CD a Cristalografia requer cristais de proteínas devidamente difratados, o que muitas vezes requer tempo. Já para análise de RMN uma elevada quantidade de proteína se faz necessária para se alcançar o objetivo experimental (SHARON *et al.*, 2005).

Desse modo, estudos biofísicos de dicroísmo circular são rápidos e requerem apenas pequenas quantidades de proteína em solução, fornecendo resultados bastante satisfatórios sobre sua estrutura.

## **1.2 – Análise de Componentes Estruturais de Proteínas por Fluorescência**

A Fluorescência é atualmente uma metodologia amplamente utilizada em biotecnologia, citometria de fluxo, diagnósticos médicos, seqüenciamento de DNA, biologia forense e análise genética, dentre outros. Essa técnica é bastante sensível, evitando-se o uso de marcadores radioativos (JOSEPH *et al.*, 2006).

A fluorescência é um fenômeno formador da luminescência que é a emissão de luz proveniente de uma determinada substância devido a um estado de excitação eletrônica. Este fenômeno ocorre dependendo da natureza do estado de excitação, sendo tipicamente emitido a partir de moléculas aromáticas (JOSEPH *et al.*, 2006). Desse modo essa técnica auxilia enormemente o estudo de proteínas facilitando a análise estrutural da mesma no que diz respeito à composição de aminoácidos aromáticos, podendo-se avaliar a estrutura tridimensional dessas moléculas observando-se possíveis localizações desses resíduos aromáticos, uma vez que determinados tratamentos desnaturantes podem nos levar a sugerir se este se encontra mais exposto ou mais interno na estrutura da molécula nativa.

Freitas (2009) caracterizou uma proteína envolvida na defesa de plantas (osmotina) proveniente do látex de *Calotropis procera* quanto a sua composição estrutural, através de técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular e fluorescência, avaliando-a quanto a possíveis alterações estruturais frente a extremos de temperatura e pH, verificando-se portanto, a estabilidade da proteína e sua parcial renaturação após submetida ao tratamento térmico.

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Dicroísmo Circular (CD)**

#### **2.1.1 – Composição estrutural da lectina de *Amansia multifida* em condições nativas**

As medidas de CD foram realizadas no espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas cilíndricas de quartzo (0,1 cm - caminho óptico). Os espectros foram determinados no intervalo de 190 a 250 nm sob N<sub>2</sub> constante, fazendo-se 8 cumulações para cada amostra à 25 °C. A análise da composição da estrutura secundária da lectina foi então realizada por desconvolução do espectro de CD usando os programas Selcon3, CDSSTR e Continll segundo Sreerama & Woody (2000).

#### **2.1.2 – Avaliação da estabilidade térmica da lectina de *Amansia multifida***

Para avaliar a estabilidade térmica da lectina de *Amansia multifida* por dicroísmo circular a proteína purificada (0,44 mg/ml) foi incubada por 10 min em diferentes temperaturas que variaram de 10 a 85 °C, com intervalos de 5° C. Após cada incubação eram realizados 8 ciclos de medidas para cada temperatura.

#### **2.1.3 – Estudo estrutural da proteína submetida a extremos de pH**

Esta metodologia permitiu também o monitoramento das mudanças conformacionais que poderiam ocorrer na proteína em função do pH e da força iônica do meio. Todas as medidas realizadas em CD tinham a proteína na concentração de 0,44 mg/ml, tendo sido utilizados tampão fosfato, acetato, borato 0,02 M, em diferentes pHs (3,0, e 11) para realizar as medidas em CD e analisar a estabilidade da lectina quanto à extremos de pH. Essas medidas foram comparadas às medidas da proteína realizadas sob condições nativas (pH 7,0) para avaliar possíveis alterações estruturais.

### **2.2 – Fluorescência**

#### **2.2.1 – Análise da composição da proteína sob condições nativas**

Para os ensaios de fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de 0,5 ml, cujo caminho óptico a ser percorrido foi de 1 cm, tendo sido realizadas as medidas em Fluorímetro ISSK<sub>2</sub>. A lectina de *Amansia multifida* encontrava-se na concentração de 0,11 mg/ml e foi excitada 280 e 295 nm para avaliação do espectro de emissão da fluorescência monitorada no intervalo de 300 a 440 nm.

### **2.2.2 – Avaliação de mudanças estruturais da lectina frente a extremos de pH**

A proteína também foi avaliada por fluorescência quanto a extremos de pH nos dois comprimentos de onda (280 e 295 nm) e os espectros obtidos foram comparados ao espectro da lectina sob condições nativas (pH 7,0) e possíveis mudanças conformacionais foram avaliadas.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

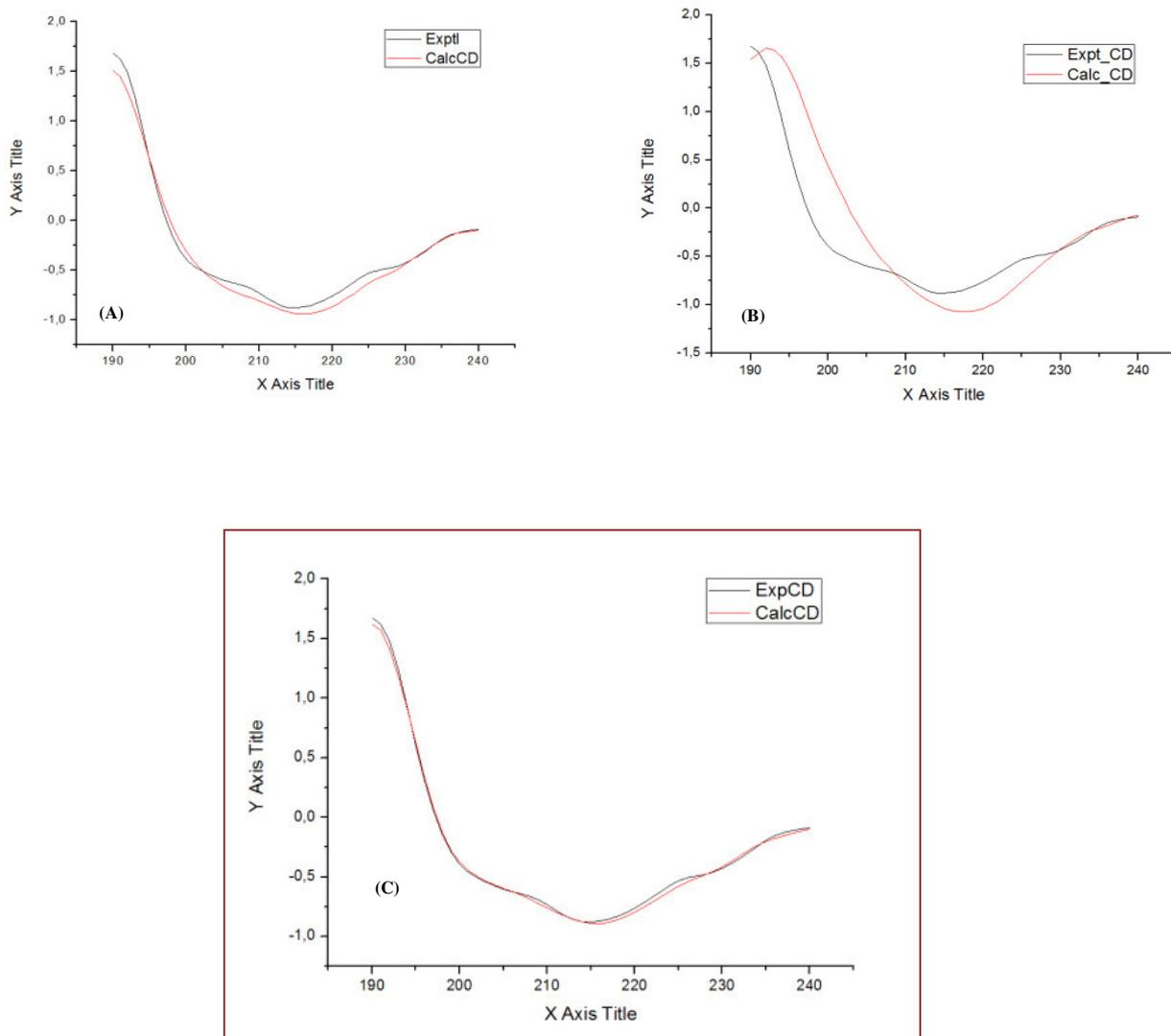
#### 3.1 - Análise da Estrutura Secundária da Proteína por Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD da estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida* foi realizado com a finalidade de avaliar sua composição estrutural, quanto à quantidade de  $\alpha$ -hélice, folhas  $-\beta$ , voltas e também quanto à estrutura não ordenada. Tendo sido utilizados para a desconvolução do espectro da proteína nativa programas como Selcon3, Contin e CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000). Nestes programas espectros de estruturas secundárias de proteínas conhecidas depositadas em bancos de dados foram utilizados de modo comparativo para verificar qual o programa apresentaria uma desconvolução mais satisfatória. Desse modo dentre os programas analisados, o Contin foi escolhido por apresentar melhor desconvolução (**FIGURA 7**).

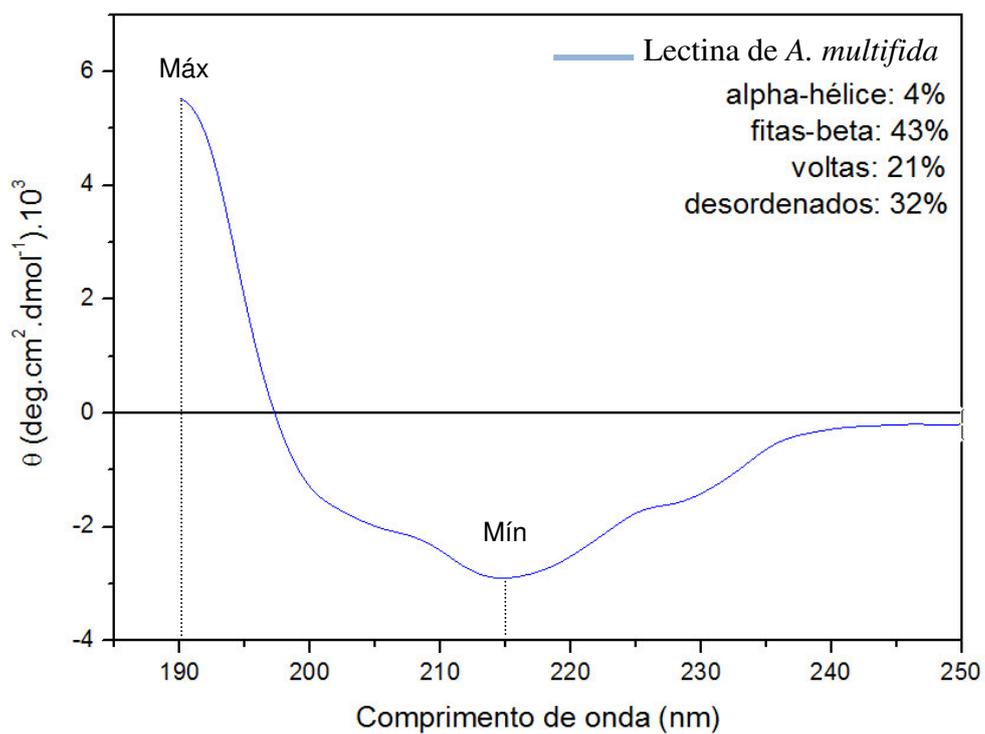
O espectro da estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida* em condições nativas pH 7,0 a 25 °C mostrou que esta apresentou-se composta por 4% de  $\alpha$  - hélice, 43% de folha- $\beta$ , 21% de voltas e 32% de estrutura não ordenada, segundo o programa de desconvolução Contin. Apresentando picos máximos e mínimos de aproximadamente 190 e 215 nm, respectivamente. (**FIGURA 8**).

##### 3.1.1 – Análise da Estrutura frente a extremos de pH

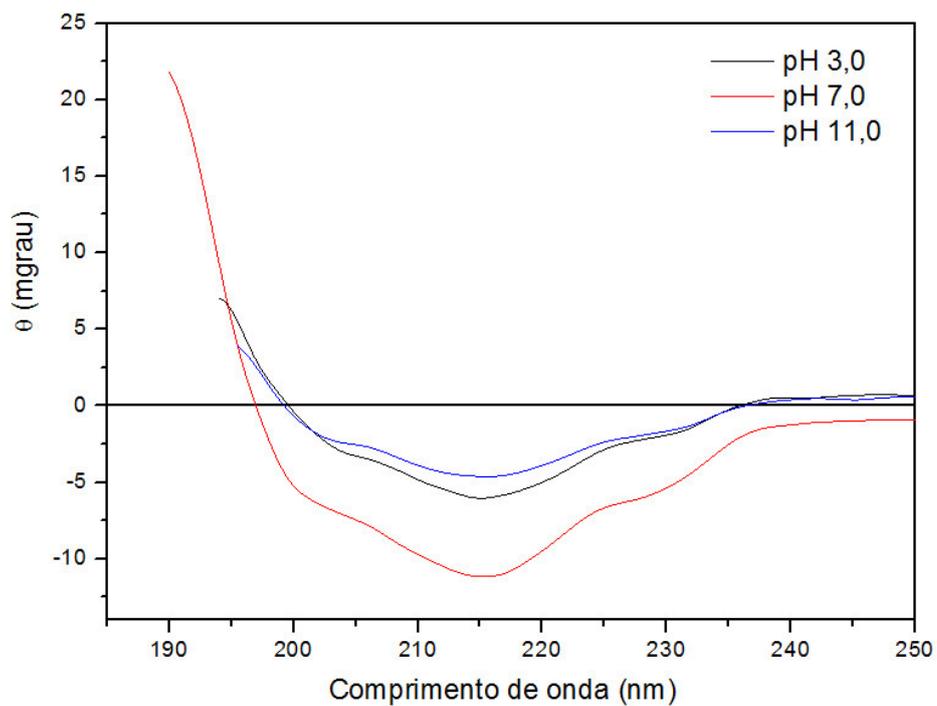
A estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida* foi analisada por dicroísmo circular, sob extremos de pH (3,0 e 11) e comparadas ao espectro obtido quando a lectina estava em seu estado nativo (pH 7,0). Estes espectros estão representados na **FIGURA 9** e eles podem demonstrar a estabilidade estrutural da proteína quando submetida a esses pH(s), no entanto a figura mostra que houve diminuição na intensidade dos espectros nos pHs 3,0 e 11, podendo ser explicado por uma leve precipitação da proteína, já que o perfil do espectro manteve-se semelhante ao original a pH 7,0, apresentando o mesmo máximo e mínimo de emissão, em torno de 190 e 215 nm, respectivamente. Tal precipitação pôde ser observada pela diminuição da leitura da absorbância das soluções de extremos de pH contendo a lectina, quando comparadas a leitura da solução a pH 7,0 realizada em espectrofotômetro a 280 nm. Em todas as soluções foram utilizadas quantidades iguais da lectina.



**FIGURA 7:** Espectro de CD da lectina de *Amansia multifida* em condições nativas comparado a espectros de estruturas secundárias de proteínas conhecidas depositadas em bancos de dados utilizando-se diferentes programas: CDSSTR (A), Selcon3 (B), Contin (C). A melhor desconvolução foi mostrada pelo programa Contin (em destaque).



**FIGURA 8:** Espectro da estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida* em condições nativas pelo programa Contin com sua respectiva composição estrutural.



**FIGURA 9:** Efeito do pH na estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida*. Cada amostra foi incubada por 30 min com o tampão específico para os respectivos pHs (3,0, 7,0 e 11).

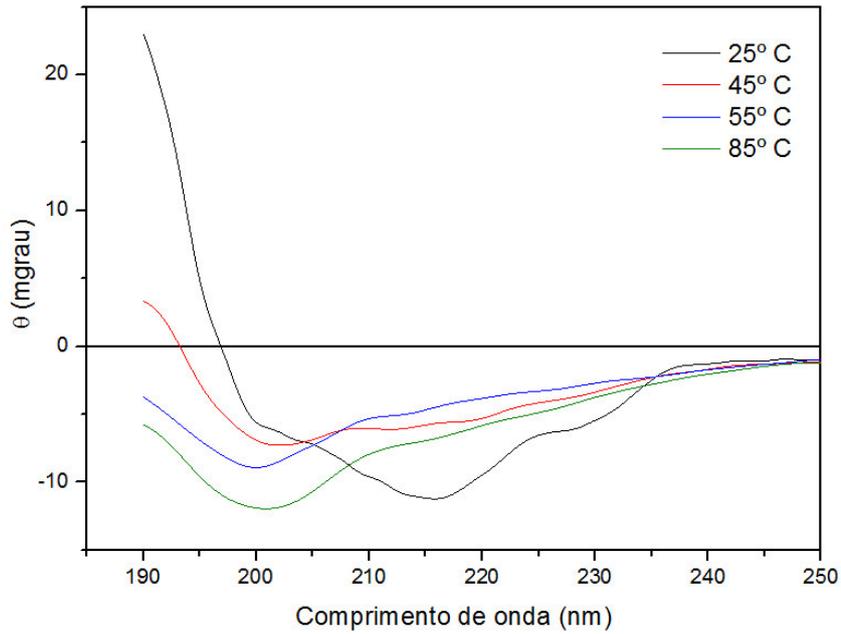
### 3.1.2 – Avaliação da Estabilidade Térmica da lectina de *Amansia multifida*

O gráfico da **FIGURA 10** mostra a comparação entre o espectro da proteína em seu estado nativo obtido a 25° C e os espectros que demonstraram mais significativamente a perda gradativa da estrutura nativa da proteína até a completa desnaturação. Pode-se verificar, portanto, que a lectina demonstrou certa resistência, quando submetida a temperaturas relativamente superiores aquela de seu estado nativo, tendo em vista que a perda de sua estrutura secundária pôde ser inicialmente evidenciada quando esta foi submetida a uma temperatura de aproximadamente 35° C atingindo cerca de 50% de estrutura desnaturada na temperatura de 40,2 °C (**FIGURA 11**).

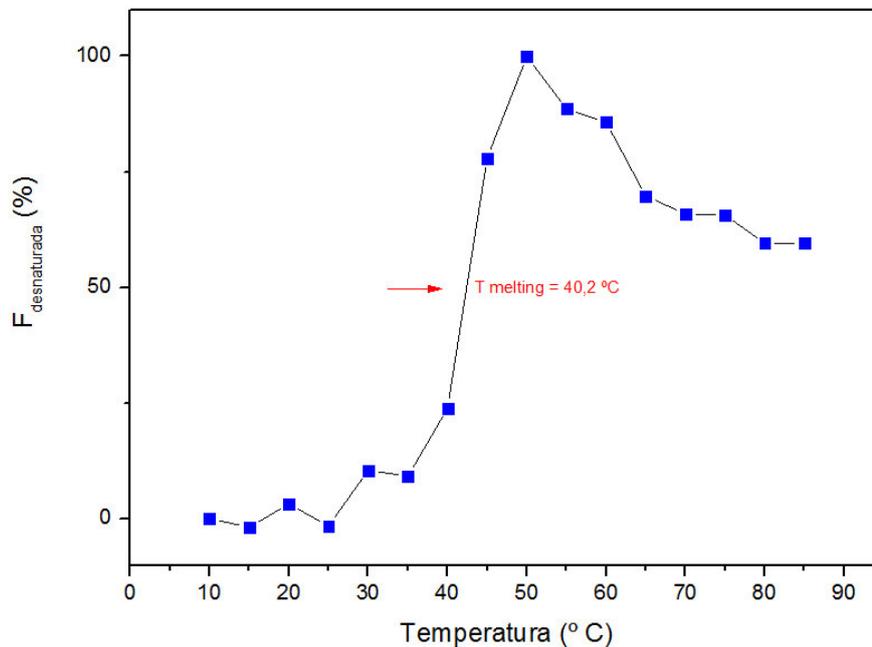
O processo pós-tratamento térmico avaliou a capacidade de “refolding” da proteína após sua completa desnaturação, sendo esta novamente incubada sob condições nativas por 10 min (25° C). O resultado mostrou que a proteína não foi capaz de voltar a sua forma estrutural nativa, após ter sido submetida ao tratamento térmico (**FIGURA 12**).

A lectina de *Amansia multifida* não passou pelo processo de liofilização, tendo sido apenas concentrada em tubos com membrana milipore (Amicon), evitando-se assim, um possível estado de agregação da molécula que poderia ter levado a uma diminuição da intensidade do sinal nos espectros analisados, mesmo em condições nativas.

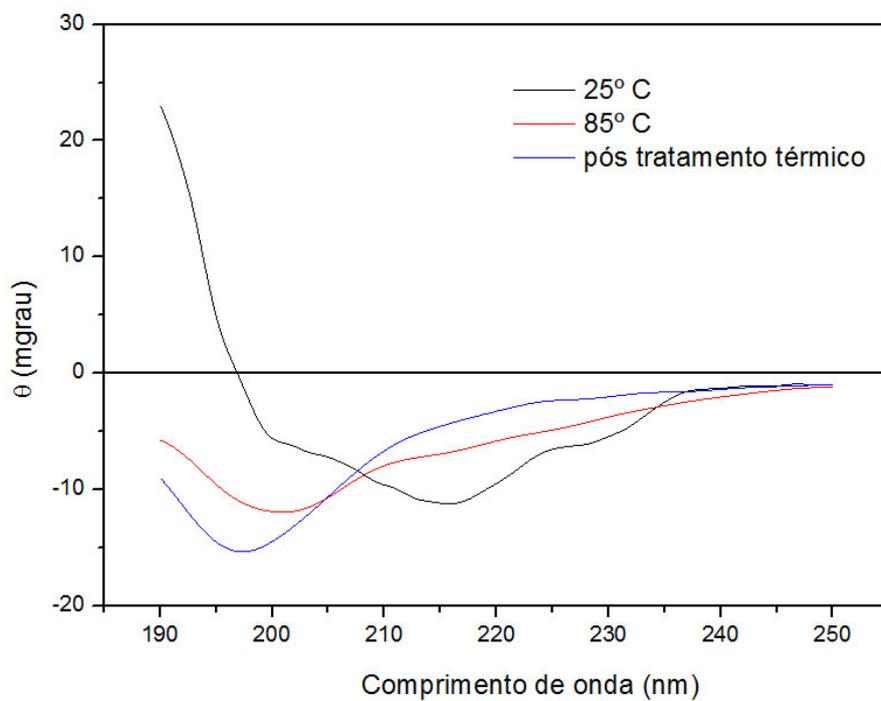
Estudos de caracterização estrutural ainda são raros com lectinas de algas. Até o presente momento não se tem relatos da utilização de análises espectroscópicas de CD e fluorescência para a avaliação da estrutura secundária e terciária de tais lectinas. Desse modo, resultados obtidos neste trabalho serão de grande auxílio, como dados comparativos, para estudos futuros a serem realizados nesse aspecto com essa classe de proteínas de algas.



**FIGURA 10:** Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de *Amansia multifida* por dicroísmo circular. Lectina em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A concentração final era de 0,44mg/ml, esta foi incubada por 10 min em cada temperatura (10 a 85 ° C, elevadas de 5 em 5° C).



**FIGURA 11:** Temperatura média de desnaturação da lectina de *Amansia multifida* a pH 7,0. Os espectros das diferentes temperaturas de CD foram medidos a 205 nm.



**FIGURA 12:** Espectro de CD da lectina de *Amansia multifida* após aquecimento por 10 min e incubação a 25° C por 30 min.

### 3.2 - Análise da Composição Estrutural da lectina de *Amansia multifida* por Fluorescência

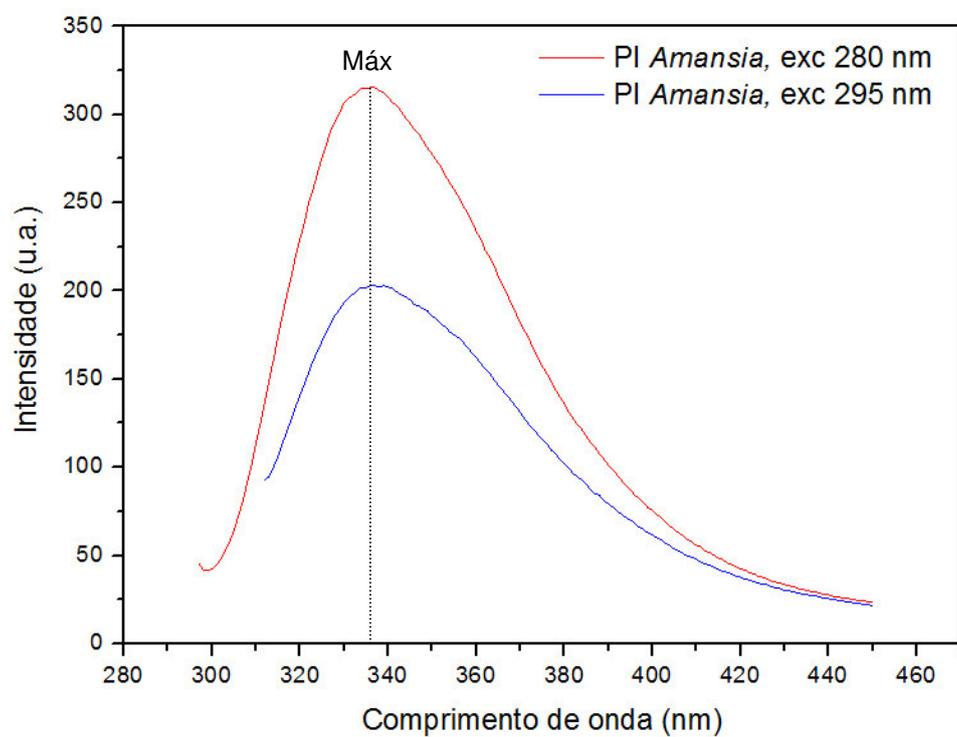
A lectina de *Amansia multifida* foi excitada a comprimentos de onda de 280 e 295 nm, e a **FIGURA 13** mostra o máximo de emissão quando a amostra foi submetida à excitação nestes comprimentos.

Os resultados mostraram que a amostra excitada a 280 nm obteve um máximo de emissão no comprimento de onda de aproximadamente 336 nm, que é um pico característico da presença do aminoácido aromático triptofano. A intensidade do sinal obtido foi relativamente elevada, podendo ser indicativo da presença de mais de um resíduo deste aminoácido, mas devido à excitação a 280 nm poder refletir também a presença do aminoácido tirosina (Y), pode-se considerar que talvez a intensidade do sinal seja resultado da influência deste aminoácido que está associado ao sinal emitido pelo triptofano (W), no entanto, ao se excitar a proteína a 295 nm pôde-se observar o pico máximo de emissão que foi também de aproximadamente 336 nm e confirmar a presença significativa do aminoácido triptofano na molécula em estudo, já que quando excitada neste comprimento de onda, somente resíduos de W serão observados ou não, dependendo do máximo de emissão.

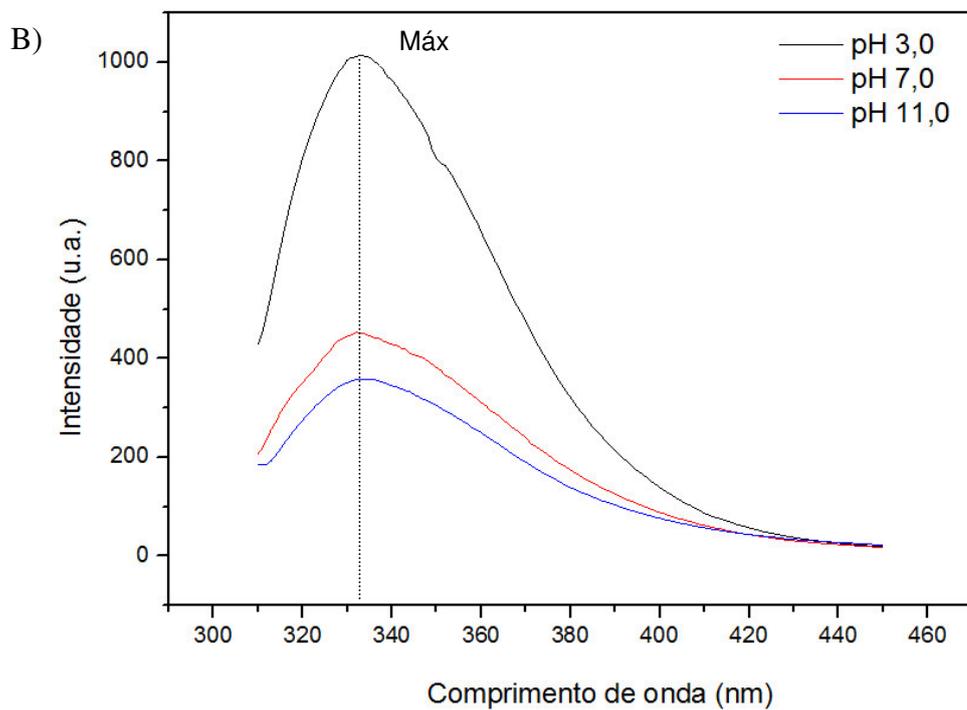
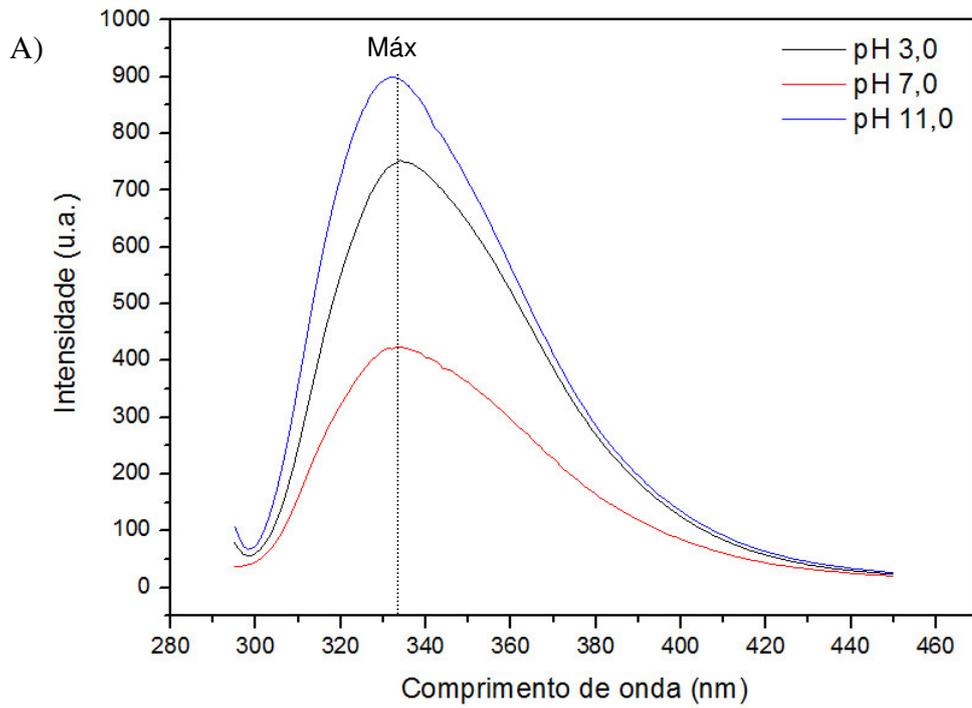
#### 3.2.1 - Análise da Estrutura da lectina frente a extremos de pH

A fluorescência emitida a 280 nm quando amostras da lectina foram incubadas por 30 min em diferentes tampões de pHs 3,0 e 11,0 resultou em espectros que foram comparados ao espectro de fluorescência da lectina em condições nativas (pH 7,0) e o resultado mostrou que os extremos de pHs aos quais foi submetida a lectina alteraram apenas a intensidade do sinal, já que não houve deslocamento do pico máximo de emissão, permanecendo em 336 nm. Diferenças na intensidade do sinal podem ser devido a influência de protonação dos grupos laterais da cadeia amioacídica ou mesmo precipitação da amostra (**FIGURA 14**).

Silva e colaboradores (2008) também realizaram estudos estruturais por métodos de fluorescência, analisando a estrutura da lectina de *Caulerpa cupressoides* (LCc) sob diferentes pHs, onde apenas os mais extremos, parecem ter refletido em mudanças mais significativas. Semelhante ao que foi observado na análise da estrutura da lectina em estudo por fluorescência, diferentes pHs não alteraram o máximo de emissão (em torno de 340 nm) dos espectros observados, interferindo apenas na intensidade do sinal devido uma possível precipitação da molécula.



**FIGURA 13:** Espectro de emissão de fluorescência da lectina de *Amansia multifida* em condições nativas, pH7,0, quando excitada a 280 e 295 nm.



**FIGURA 14:** Espectro de fluorescência da lectina de *Amansia multifida* incubada em diferentes pHs, excitada a comprimentos de onda de 280 nm (A) e 295 nm (B).

## **CAPÍTULO 03**

### **Atividade Hipoglicemiante da Fração Protéica de *Amansia multifida***

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Usos e Propriedades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas

As lectinas isoladas de várias fontes, e principalmente de origem vegetal, têm sido utilizadas para uma série de aplicações biológicas como, por exemplo, na mimetização ou bloqueio da ação de efetores fisiológicos, no isolamento e caracterização de ligantes de superfícies celulares ou na avaliação de fenômenos decorrentes de suas interações com tais ligantes e intrincadas vias de transdução de sinal. Vejamos resumidamente algumas de suas aplicações:

As hemaglutininas de algas marinhas foram também sugeridas como novas ferramentas biológicas, inclusive na taxonomia de algas (BLUNDEN *et al.*, 1975).

Semelhante as lectinas de plantas superiores, as hemaglutininas de algas marinhas também foram empregadas na tipagem de grupos sanguíneos. ROGERS *et al.*, (1977), relataram que a hemaglutinina de *Ptilota plumosa* aglutina especificamente eritrócitos que expressam o antígeno B (B, A<sub>1</sub>B e A<sub>2</sub>B), não reconhecendo portanto, os eritrócitos dos grupos A e O.

As lectinas de algas são vistas como ferramentas na pesquisa do câncer. Extratos de *Boodlea coacta*, *Codium fragile*, *Hypnea japonica*, *Carpopeltis flabellata*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Solieria robusta*, aglutinaram fortemente células tumorais (HORI *et al.*, 1986a).

NEVES *et al.* (2001), mostraram que as lectinas isoladas das algas *Bryothamnion triquetrum* (BT), *Bryothamnion seaforthii* (BS), *Amansia multifida* (AM) e *Gracilaria caudata* (GC) apresentaram atividade indutora de migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*. A lectina de (BT) foi mais potente quando o ensaio foi realizado em ratos, enquanto a lectina de (AM) quando testada em camundongos induziu melhor a migração. Todas as lectinas induziram significativamente a migração de neutrófilos em humanos nos testes *in vitro*, sendo (BT) e (GC) as mais efetivas. A avaliação no efeito inflamatório das lectinas mostrou que D-manose reduziu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório tanto *in vitro* como *in vivo*, com exceção da lectina (AM). Esses dados foram considerados surpreendentes já que as lectinas de algas são em geral inibidas por glicoproteínas e não por açúcares.

Na indução de proliferação celular as lectinas presentes nas algas *Carpopeltis flabellata*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Solieria robusta* foram capazes de estimular a mitogenicidade em linfócitos de camundongos em concentrações que variavam entre 5 e 12µg/mL (HORI *et al.*, 1987; HORI *et al.*, 1988b; OKAMOTA *et al.*, 1990). BIRD *et al.*, (1993), trabalhando com 22 espécies de algas marinhas, encontraram que frações ricas em proteínas eram capazes de estimular a atividade mitogênica em esplenócitos de

camundongos e linfócitos humanos. As frações protéicas das algas *Gracilaria tikvahiae* e *G. verrucosa* foram capazes de estimular a mitogenicidade dos dois sistemas estudados, enquanto a da alga verde *Ulva rígida* foi capaz de estimular a mitogenicidade de esplenócitos de camundongos. Lectinas de algas marinhas do Nordeste brasileiro, como *Amansia multifida* (COSTA, 1999) e *Meristiella echinocarpa* (FARIAS, 1995), ambas mostraram-se mitogênicas para linfócitos humanos. *A. multifida* estimulou a proliferação de células mononucleares do sangue humano (PBMC) em concentrações relativamente baixas, de 3,12 a 12,5 µg/mL, sendo que esse efeito foi predominante a 50µg/ml (LIMA *et al.*,1998). *M. echinocarpa* estimulou uma boa proliferação destas células em baixas concentrações (12,5 – 2,5 µg/mL) e em menor intensidade quando utilizadas em doses elevadas (50 – 100 µg/mL). A proliferação linfocitária foi bloqueada por avidina, porém esse efeito não foi revertido pela adição de IL-2 purificada ou uma outra lectina (ConBr) em concentrações estimulatórias. Foi também observado que células incubadas com amansina em concentrações adequadas produziram IFN- $\gamma$ .

As lectinas de algas marinhas também têm sido empregadas como ferramentas na pesquisa da Síndrome da Imuno-Deficiência-Adquirida (SIDA). Algumas dessas lectinas foram utilizadas para caracterizar oligossacarídeos estruturais do envelope viral, como a glicoproteína 120. Essa caracterização poderia permitir a prevenção da ligação do vírus às células hospedeiras, uma vez que as lectinas específicas se ligariam a capsula viral, bloqueando o seu sítio de ligação às células (FAVERO, 1994).

Essas moléculas podem ser vistas, ainda, como ferramentas em testes histoquímicos. A conjugação da lectina de *Codium fragile* por GRIFFIN *et al.*, (1995) ao ouro coloidal foi proposta para permitir a ligação desse complexo a membranas de eritrócitos humanos A<sub>1</sub>. A vantagem inicialmente seria que este conjugado poderia ser usado como sistema-modelo, além de ser facilmente detectado por microscopia eletrônica de transmissão. Deste modo, pequenas moléculas como a lectina de *C. fragile*, poderiam ser utilizadas nesses testes levando-se em conta o fácil acesso das mesmas a diferentes pontos da superfície de células de vários tecidos.

Várias lectinas de algas marinhas têm mostrado interagir com plaquetas humanas, como Phytohemagglutinin (PHA), “wheat germ agglutinin” (WGA) e lectina de veneno de cobra. A interação dessas lipoproteínas com plaquetas não tem sido muito investigada, entretanto MATSUBARA *et al.*, (1996) examinando a interação de quatro lectinas de algas com plaquetas humanas, observou que estas inibiram a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP), enquanto que uma delas induziu a agregação de plaquetas inativadas.

Como mísseis biológicos. As lectinas de algas, sendo moléculas pequenas, podem ser menos antigênicas que lectinas de plantas superiores que possuem alto peso molecular (ROGERS & HORI, 1993).

Avanços importantes têm sido feitos na pesquisa sobre lectinas de algas marinhas, entretanto, muito pouco se conhece sobre o seu possível papel endógeno. Trabalhos realizados com a fração lectínica da alga marinha vermelha *Digenea simplex* demonstraram seu potencial hipoglicemiante por esta reduzir significativamente o nível de glucose em ratos diabéticos, induzido por aloxano (ANDRADE *et al.*, 2006), sendo este mais um potencial biológico e de grande interesse científico que deve ser melhor estudado nessas moléculas.

## **1.2 – Diabetes**

### **1.2.1 – Considerações Gerais**

O conhecimento do *diabetes mellitus*, já data de vários séculos. O papiro egípcio Ebers, em 1500 anos a.C., descreve uma doença caracterizada pela passagem de grande quantidade de urina. No entanto, o grande marco foi à descrição de Araterus da Capadócia, no século II, que denominou essa enfermidade de diabetes (correr através de sifão), com sua clássica descrição de que “a carne do corpo e dos membros se derretia e se convertia em urina” (KRALL *et al.*, 1994). Mesmo conhecendo-se vários relatos na China, Japão e Índia da ocorrência de poliúria com urina doce e espessa em algumas pessoas, foi Willis, em 1675, quem estabeleceu o nome *diabetes mellitus*, fazendo referência a esta condição da urina, doce e mel, por ele observada (OLIVEIRA E MILECH, 2004). O *diabetes mellitus* é um distúrbio crônico que afeta cerca de 5% da população mundial (DANEMAN, 2006).

O *diabetes mellitus* é considerado uma síndrome caracterizada por hiperglicemia crônica que envolve distúrbios metabólicos dos carboidratos, proteínas, lipídios, água, vitaminas e minerais, alterando desta forma, a homeostase do organismo, podendo no período de evolução da doença, dependendo do controle metabólico, advir complicações agudas e crônicas (OLIVEIRA E MILECH, 2004).

A doença caracteriza-se por apresentar os seguintes sinais: aumento da concentração sanguínea de glicose, devido à utilização desta pelas células corporais estar diminuída; metabolismo lipídico anormal devido à acentuada mobilização das gorduras a partir das áreas de armazenamento; arterosclerose causada pela deposição de colesterol nas paredes arteriais e depleção de proteínas nos tecidos do corpo (GUYTON, 2002). Essa depleção ocorre devido a um aumento na degradação e uma diminuição na síntese de proteínas (RANG *et al.*, 2004).

O indivíduo com diabetes evidencia os seguintes sintomas iniciais: eliminação excessiva de urina (poliúria) (GUYTON, 2002); sede intensa associada à desidratação e ingestão de grandes volumes de água (polidipsia), que em diabetes está relacionado à perda de água e metabólitos intracelulares, que altera o estado normal dos osmorreceptores dos centros da sede no cérebro. O excesso de açúcar, não utilizado, traz como consequência a falta de fornecimento de energia nas células, originando os sintomas de fraqueza e perda de peso (NEGRI, 2005; COTRAN, 1996).

Uma alteração característica do diabetes é a excessiva, porém incompleta oxidação dos ácidos graxos no fígado, promovendo um aumento na produção de corpos cetônicos (LEHNINGER *et al.*, 2002). A cetoacidose desenvolve-se devido à degradação acelerada das gorduras em acetil-CoA que, na ausência de metabolismo aeróbico de carboidratos, é convertida em acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato (provocando acidose) e cetona (RANG *et al.*, 2004).

Outras manifestações sintomáticas citadas em referência ao diabetes são parestesias, distúrbios visuais e no aparelho geniturinário, disfunção erétil e diminuição da libido (OLIVEIRA e MILECH, 2004). O diabetes também parece estar associado a alterações na cognição. Estudos examinando a incidência de demência em pessoas com *diabetes mellitus* revelaram um maior grau de representatividade em diabéticos do que em pessoas sem a doença. Este alto risco inclui tanto a doença de Alzheimer quanto casos de demência vascular (BIESSELS *et al.*, 2006).

Quanto à classificação, destacam-se duas classes principais da doença: diabetes mellitus dependente de insulina ou diabetes tipo 1, que aparece no início da vida e frequentemente envolve a destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas; e diabetes mellitus não dependente de insulina, ou diabetes tipo 2, que é causada, em algumas formas da doença, por mutações na estrutura do receptor da insulina ou em suas atividades intracelulares responsáveis pela utilização da glicose (MATHEWS & VAN HOLDE, 1995). Existem, ainda, outros tipos específicos de diabetes, resultantes de defeitos genéticos funcionais da célula  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado, outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes e o diabetes gestacional.

Apesar de o diabetes tipo 1 ser menos incidente que o tipo 2, é responsável por uma séria desordem crônica com importantes consequências a longo prazo. Apresenta um forte componente genético que torna aumentada a susceptibilidade de alguns indivíduos, bem como uma predisposição hereditária, com incidência 10 vezes maior em parentes de primeiro grau de um caso original (DANEMAN, 2006; RANG *et al.*, 2004).

Com a intensificação do controle glicêmico no tratamento do diabetes melitus tipo 1, houve uma mudança progressiva das causas de mortalidade com destaque para as doenças cardiovasculares. A identificação de fatores de risco, como a dislipidemia, tornou-se de grande importância para minimizar o risco de complicações crônicas micro e macrovasculares. As diretrizes para prevenção de doença coronariana em diabetes, geralmente, fazem referência ao diabetes tipo 2, com pouca recomendação específica para o diabetes tipo 1. Definir alvos terapêuticos ou indicação de intervenção farmacológica é mais controverso nesse tipo de diabetes, em virtude da faixa etária desses pacientes (MATHEUS & COBAS & GOMES, 2008).

O diabetes tipo 2 representa um grupo heterogêneo de desordens assinaladas pela resistência à insulina e diminuição da secreção do hormônio (REES e ALCOLADO, 2005). Frequentemente, pacientes acometidos pelo tipo 2 são obesos, com um número maior de casos da doença na fase adulta, e um aumento progressivo na incidência em relação ao aumento da idade, à medida que ocorre um declínio da função das células  $\beta$  (RANG *et al.*, 2004).

A hiperglicemia pós-prandial é a primeira anormalidade metabólica em diabéticos tipo 2 e, também, representa um importante fator na predição do início de complicações macrovascular e microvascular, que contribuem para o progresso dos sintomas no *diabetes mellitus* (RATNER, 2001).

O diagnóstico do diabetes baseia-se nas alterações de glucose plasmática de jejum (8-12 h) ou após uma sobrecarga de 75g de glucose por via oral, com medições após duas horas (teste oral de tolerância à glucose - TOTG), e nos níveis de glucose plasmática casual (PEREIRA *et al.*, 2006).

O tratamento do diabetes envolve a princípio a administração de insulina suficiente para que o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas seja o mais normal possível. A insulina pode ser encontrada sob várias formas: a “regular” que possui ação que vai de 3 a 8 horas e as formas de insulina que são precipitadas com zinco ou com vários derivados protéicos, tendo efeitos que duram de 10 a 48 horas, devido à absorção lenta no sítio de injeção (GUYTON, 2002).

Para o tratamento do diabetes tipo 1, a insulina torna-se um componente essencial. Este requer injeções diárias do hormônio, com o intuito de prevenir os distúrbios metabólicos causadores de cetoacidose e morte. Devido à degradação no trato digestório, a insulina é administrada de forma parenteral, sendo a via subcutânea a mais comum, embora possa também ser administrada intravenosamente, de maneira intranasal (HINCHCLIFFE e ILLUM, 1999), ou até mesmo intramuscular (RANG *et al.*, 2004).

No diabetes tipo 2 ocorre uma diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo ao efeito da insulina (OLIVEIRA e MILECH, 2004). Desse modo, de forma mais simplificada, dietas e

exercícios correspondem ao ponto de partida para o tratamento (IGNARRO *et al.*, 2007; GANNON e NUTTALL, 2006). Contudo, os medicamentos hipoglicemiantes tornam-se comumente necessários, e em alguns casos, além de mudanças nos padrões de alimentação e atividade física, a utilização de insulina também é importante (KOSKI, 2006).

As quatro principais classes de agentes hipoglicemiantes orais são as sulfoniluréias, que reduzem o nível de glucose plasmática primariamente por aumentarem a liberação de insulina a partir do estímulo às células  $\beta$  do pâncreas, causando hipoglicemia; as biguanidas: a metformina que é o único fármaco da classe das biguanidas atualmente disponível, seu mecanismo primário consiste em uma diminuição dos níveis de glucose, a partir da diminuição da gliconeogênese no fígado, além de aumentar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos e diminuir a absorção de glucose no intestino; inibidores de  $\alpha$ -glucosidase, drogas que interferem na absorção dos carboidratos pelas células intestinais, seu efeito consiste, primariamente, na redução dos níveis de glucose pós-prandial no plasma, atuando como competidores e inibidores reversíveis de  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase impedindo, assim, o fornecimento de glucose, a partir da quebra enzimática de polissacarídeos complexos; e por fim os tiazolidinodionas, que aumentam a sensibilidade dos tecidos muscular e adiposo à insulina, também diminuem a produção de glucose hepática e são potentes e seletivos agonistas dos receptores  $\gamma$  nucleares, que regulam a transcrição de genes envolvidos no controle da produção, transporte e utilização de glucose (KOSKI, 2006).

Outros agentes hipoglicemiantes orais em desenvolvimento, para o tratamento de pacientes diabéticos tipo 2, incluem drogas inibidoras de certas enzimas responsáveis pela ativação de glucoquinases, promovendo uma redução da glucose pós-prandial (KOSKI, 2006).

Contudo, dos medicamentos correntemente usados na prática clínica, nenhum é capaz de restaurar com sucesso os níveis normais de glicemia em muitos pacientes. Ou, por outro lado, tornam-se falhos no decorrer de algum tempo. Mais ainda, o uso contínuo de drogas sintéticas antidiabéticas pode causar efeitos colaterais e toxicidade (ZHANG *et al.*, 2001). Desse modo, torna-se cada vez mais necessária à procura por drogas antidiabéticas naturais e não-tóxicas eficazes no tratamento da doença.

### **1.2.2 – Indução do diabetes na experimentação animal**

Uma droga muito usada para induzir diabetes é o Aloxano, que é derivado do ácido úrico. Ocorre uma citotoxicidade seletiva porque as células  $\beta$  pancreáticas possuem uma maior capacidade de acumular essa droga e, além disso, tem maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparadas as outras células do corpo. Esse efeito causa

diabetes mellitus irreversível 24 horas após a sua administração, sendo os efeitos crônicos da doença observados após 7 dias. (CARVALHO & CARVALHO & FERREIRA, 2003). Esse efeito lesivo do aloxano pode ser prevenido por diversas substâncias, que diminuem a suscetibilidade das células alvo ao agente agressor (JOURS *et al.*, 1999).

Apesar de o Aloxano ter um elevado índice de mortalidade relativa, é um modelo de fácil execução e permite a utilização de um grande número de animais, destruindo somente a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina. A via mais utilizada é a endovenosa (LERCO, 2003).

### 1.2.3 – Utilização de plantas e algas no tratamento do Diabetes

As plantas consideradas medicinais foram utilizadas para tratar doenças humanas no Oriente durante séculos. Há registros médicos que comprovam que os chineses já utilizam as plantas medicinais desde 3700 anos a.C. e acreditavam que havia uma planta apropriada para cada doença. A utilização das plantas é baseada na crença popular e apesar do emprego empírico, muitas delas são utilizadas até hoje e ainda não foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (COWAN, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003; NIERO *et al.*, 2003).

Plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo à base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (UGAZ, 1994; CECHINEL & YUNES, 1998).

Acredita-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (CRAGG *et al.*, 1997). Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, pode-se citar como exemplo de uma boa fonte de compostos farmacológicos, as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies. Muitas destas plantas são usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul (ACHENBACH *et al.*, 1988). Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com estas plantas indicam que as mesmas são constituídas principalmente de glicosídeos esteroídicos, triterpenos, lactonas e flavonóides (BREVIGLIERI, 1997; CECHINEL, 2000). Tais plantas, pertencentes a este gênero são conhecidas como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi”. As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, especialmente *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, são amplamente utilizadas em nosso e também em outros países sob a forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades,

principalmente infecções, processos dolorosos e diabetes (ACHENBACH *et al.* 1988; TESKE *et al.*, 1995; GUPTA, 1995).

Uma espécie de planta bastante utilizada no tratamento do diabetes é a *Momordica charantia* vulgarmente conhecida como melão-de-São-Caetano. Vários relatos têm sido feitos a respeito da atividade hipoglicemiante de seus frutos e sementes. Em 1993, extratos aquosos desta planta foram testados em camundongos diabéticos e nestes foi observada uma redução dos níveis de glicose sanguínea. Foi verificado também um atraso no aparecimento da catarata, uma complicação característica do diabetes (SIRIVASTAVA *et al.*, 1993).

*Eucalyptus globulus* também é uma planta tradicionalmente utilizada no tratamento do diabetes na América do Sul e da África. O seu consumo é feito através do chá de suas folhas, parte medicinal da planta. Gray & Flatt (1998), verificaram que a incorporação do eucalipto na dieta reduziu a hiperglicemia em camundongos diabéticos e seu extrato aquoso aumentou o transporte de glicose e o seu metabolismo.

Segundo Gray & Flatt (1998), estudos mostraram que a administração crônica de *Agrimony eupatoria* reduziu a polidipsia e a hiperglicemia em camundongos diabéticos (induzidos por estreptozotocina). In vitro, seu extrato aquoso aumentou o transporte de glicose, sua oxidação e a síntese de glicogênio.

A *Trigonella foenumgraecum* (fenogregó) é uma outra planta cujo potencial antidiabético, também é bastante conhecido. Estudos realizados por Ribes *et al.* (1986), mostraram que a administração crônica contendo testa e endosperma foi capaz de reduzir a hiperglicemia e a glicosúria em cachorros diabéticos (induzidos por aloxano). Da mesma forma, *Caesalpinia bonducella* mostrou-se eficaz na redução dos níveis de glicose sanguínea e também reduziu o nível de colesterol em ratos diabéticos induzidos por aloxano (KANNUR *et al.*, 2006).

Muitos experimentos realizados mostram a redução do nível de glicose sanguíneo por fatores adversos, o que, muitas vezes, refletem também em reduções dos níveis de triglicérides e colesterol, no entanto, o foco de várias pesquisas realizadas atualmente é a busca por moléculas bioativas que desempenhem um papel tipo insulina, promovendo alterações a níveis plasmáticos dessa molécula, talvez mesmo, por promover alterações em seus receptores de modo que estes venham a capturá-la com mais eficiência.

O extrato de canela, uma especiaria conhecida e comumente utilizada para diversos fins pela população mostrou possuir princípios ativos, polímeros da chalcona, que melhoraram a função dos receptores de insulina por promoverem um aumento do reconhecimento da molécula pelo mesmo, através do receptor insulinoquinase e inibição do receptor insulinfosfatase (BROADHURST *et al.*, 2000).

Desde o descobrimento de insulina em vertebrados, plantas passaram a ser investigadas quanto à presença dessa molécula. Em 1923, Collip e colaboradores realizaram experimentos de atividade hipoglicemiante com diferentes extratos de plantas, tais como alface, cevada, cebola, trigo e feijão, atribuindo o nome de glucocinina a estes compostos hipoglicêmicos, devido o potencial de redução da glucose exercido por eles (COLLIP *et al.*, 1923).

Apesar de a presença de insulina em plantas já ter sido descrita em trabalhos científicos, a primeira seqüência de insulina vegetal foi obtida de sementes de uma leguminosa da espécie *Canavalia ensiformes* conhecida como feijão-de-porco. A molécula foi isolada por Oliveira *et al.*,(1999). Tendo em vista, o conhecimento de sua utilização em tratamento de doenças, tais como o diabetes, a espécie *Bauhinia forticata* (pata-de-vaca) foi utilizada por esse mesmo grupo na pesquisa de moléculas bioativas de potencial hipoglicemiante, tendo sido isolada de cloroplastos das folhas uma molécula identificada como insulina. Em 2003 este mesmo grupo utilizou folhas de *Vigna unguiculata* para o isolamento e posterior identificação da molécula insulina. Oliveira *et al.* (2003). Todas as proteínas isoladas foram seqüenciadas e as seqüências apresentaram-se homólogas à da insulina bovina.

Algas marinhas, além de plantas, também têm sido utilizadas em pesquisas como fonte de buscas de moléculas com potencial hipoglicemiante. Evidências experimentais não recentes já revelavam a capacidade de moléculas de algas em reduzir níveis de glucose sanguíneos. Um exemplo é a alga *Chlorella*, uma alga unicelular bastante utilizada como alimento no Japão e Taiwan. Estudos mostraram que a administração aguda desta alga em ratos, cujo estado diabético foi induzido por aloxano, reduziu de maneira significativa os níveis de glucose sanguíneos nos animais (RODRIGUEZ-LOPEZ, 1964; RODRIGUEZ-LOPEZ e LOPEZ-QUIJADA, 1971).

Antígenos tipo-insulina foram detectados por ELISA e Western blotting na alga marinha vermelha *Gracilariopsis sp.* O antígeno encontrado reagiu positivamente contra anticorpos anti-insulina humana e apresentou o mesmo peso molecular da insulina bovina (SILVA *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Cherng e Shih (2005), mostraram que a referida alga citada anteriormente, *Chlorella*, produziu um efeito hipoglicêmico transitório (90 min) em camundongos normais após administração aguda. No entanto, o nível basal de glucose não foi alterado para camundongos tratados com streptozotocina, nem o nível plasmático de insulina em camundongos normais. De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que a aplicação de *Chlorella* aumentava a sensibilidade da insulina em camundongos tratados com streptozotocina, tendo em vista que foi observado, ainda, que a administração da alga aumentou o efeito hipoglicêmico da insulina exógena quando injetada

em camundongos diabéticos, prolongando este efeito por mais de 60 min após sua aplicação.

Em 2006, o mesmo grupo sugeriu, ainda, que o efeito hipoglicêmico da alga *Chlorella* é devido a aquisição de glucose no fígado e no músculo sóleo, já que o tratamento com a mesma aumentou a aquisição de 2-deoxiglucose no fígado e no músculo sóleo em camundongos normais e tratados com streptozotocina. Além disso, fazendo referência aos resultados obtidos no trabalho anterior, os autores sugeriram que a melhora da sensibilidade a insulina após o tratamento com a alga pode ser resultado, também, dos baixos níveis de ácidos graxos não-esterificados, tendo em vista que a sensibilidade a esse hormônio é normalmente diminuída por elevados níveis desses ácidos no diabetes, e que, de acordo com os resultados os níveis de ácidos graxos não-esterificados mostraram-se mais baixos em animais tratados com a alga que em animais pertencentes ao grupo controle (CHERNG E SHIH, 2006).

Ensaio de atividade hipoglicemiante foram realizados com a fração protéica (20/60) da alga marinha vermelha *Digenea simplex*. Os resultados mostraram que o tratamento realizado foi capaz de reduzir significativamente os níveis de glucose sanguíneos em ratos com o estado diabético induzido por aloxano, no entanto, nenhuma alteração significativa foi observada quanto aos níveis de colesterol, triglicérides e transaminases (TGO e TGP) nos animais testados, antes e depois do tratamento (ANDRADE, 2006).

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 - Ensaio de Atividade Hipoglicemiante**

#### **2.1.1 - Drogas e Reagentes**

- aloxano® da marca Sigma, USA;
- Glibenclamida 5 mg produzida pelo laboratório Germed, em São Bernardo do Campo, São Paulo;
- Os kits para as dosagens bioquímicas de glicemia foram obtidos do laboratório LABTEST®;

#### **2.1.2 - Animais**

Em média 100 animais foram necessários para a realização do experimento completo. Foram utilizados ratos machos, com peso variando entre 200 gramas e 250 gramas, albinos, da linhagem Wistar, adultos, saudáveis, procedentes do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do norte. Os ratos ficaram em repouso no laboratório de biofisiologia, confinados em gaiolas-padrão de polipropileno (40cm × 30cm × 15cm) forradas com maravalhas e fechadas por grade de aço inoxidável, com alternância automática, em períodos de 12 horas, de claro-escuro, recebendo água e ração apropriada à vontade.

Os animais foram divididos em grupos de dez animais cada, para serem submetidos ao tratamento, via oral, com as frações protéicas. Os grupos testes foram: controle 1 (água destilada), controle 2 (glibenclamida 10mg/kg), fração (0/70) de *A. multifida* (2, 5, 10 e 20 mg/kg).

Os animais foram manipulados de acordo com o National Institutes of Health, USA (1986) "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" e o trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Juazeiro do norte.

#### **2.1.3 - Indução do diabetes**

Para a avaliação da atividade hipoglicemiante o diabetes foi induzido através da administração de uma injeção de Aloxano 50mg/kg na veia peniana do animal. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso. O animal foi submetido à anestesia com éter para posterior injeção da droga diabetogênica.

Os animais permaneceram 48 horas em repouso para coleta por capilar de 1 ml de sangue do plexo retro-orbital do animal após anestesia com éter, para confirmar se o diabetes foi induzido com sucesso. Animais cuja glicemia não foi superior a 200mg/kg foram descartados.

#### **2.1.4 - Administração da droga**

Os ratos foram divididos em seis grupos para a realização dos ensaios biológicos. Os grupos 1 e 2 foram os controles aos quais foram administrados água destilada (0,8 ml) e glibenclamida (10mg/kg), respectivamente. E os grupos 3, 4, 5 e 6 cujos animais foram tratados com a F (0/70) de *A. multifida* nas doses de 2, 5, 10 e 20mg/kg, respectivamente.

Os animais foram tratados por cinco dias após pesagem dos animais, 1 ml de sangue do plexo retro-orbital foi coletado novamente dos animais após anestesia com éter para a avaliação dos níveis de glicose que foram analisados através de Kits bioquímicos - LABTEST®.

Ao final dos ensaios os animais foram sacrificados para a retirada de órgãos como o fígado e o pâncreas com o objetivo de realizar estudos histopatológicos necessários. As carcaças foram armazenadas em refrigeradores até o momento da incineração (experimentos em desenvolvimento).

#### **2.1.5 - Análise e interpretação dos dados**

Nos procedimentos experimentais, os resultados dos testes realizados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), empregando-se análise de variável ANOVA e o Teste Student-Newman-Keuls como Teste *pos hoc*. Os dados foram considerados significativos quando a possibilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Ensaio de Atividade Hipoglicemiante

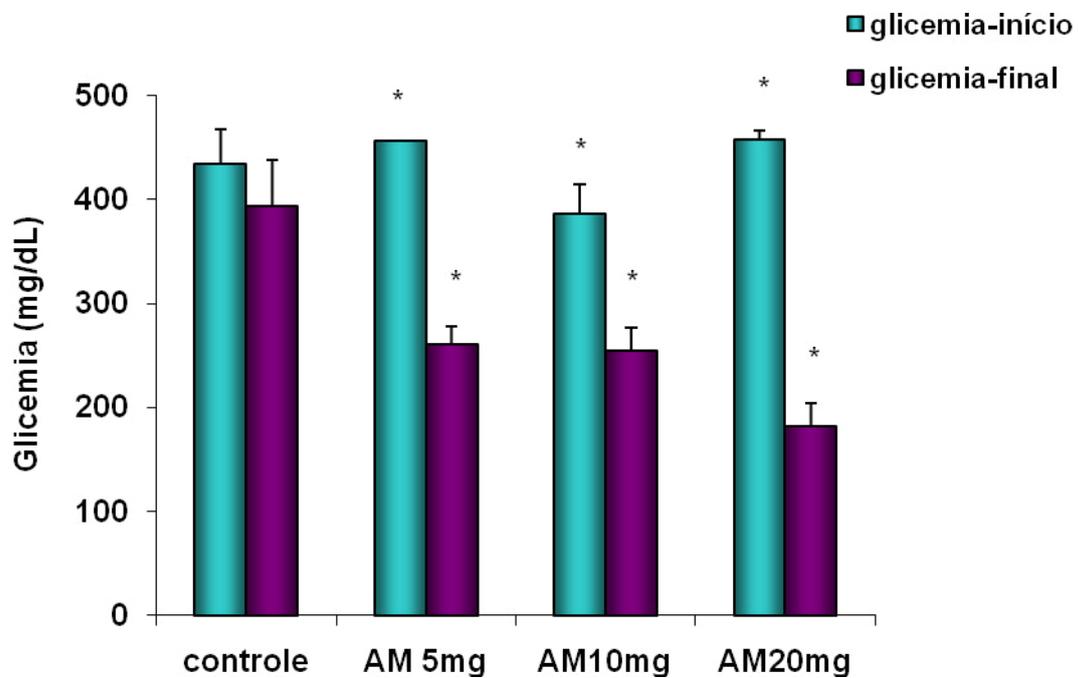
Os ensaios de atividade hipoglicemiante realizados mostraram que a fração 0/70 da lectina de *Amasia multifida* nas doses de 2mg/kg (334,4±19,3 início e 291,1±16,4 final); 5mg/kg (457,1±20,68 início e 260,6±17,66); 10mg/kg (386,3±28,3 início e 254,9±22 final) e 20mg/kg (457,8±8,6 início e 182,7±21,6 final) promoveu alterações significativas em animais com quadro de diabetes induzido por aloxano quando comparadas aos animais do grupo controle (434±33,7 início e 393,8±44 final)(**FIGURA 15**).

Desse modo, verificou-se que a fração protéica de *A.multifida* reduziu em 9%, 43%, 28% e 60% a glicemia dos animais nas doses de 2, 5, 10 e 20mg/kg respectivamente, não tendo se mostrado dose-dependente. A dose de 2mg/kg não apresentou redução significativa quando comparada ao grupo controle, não sendo mostrada, portanto, na figura (**FIGURA 16**).

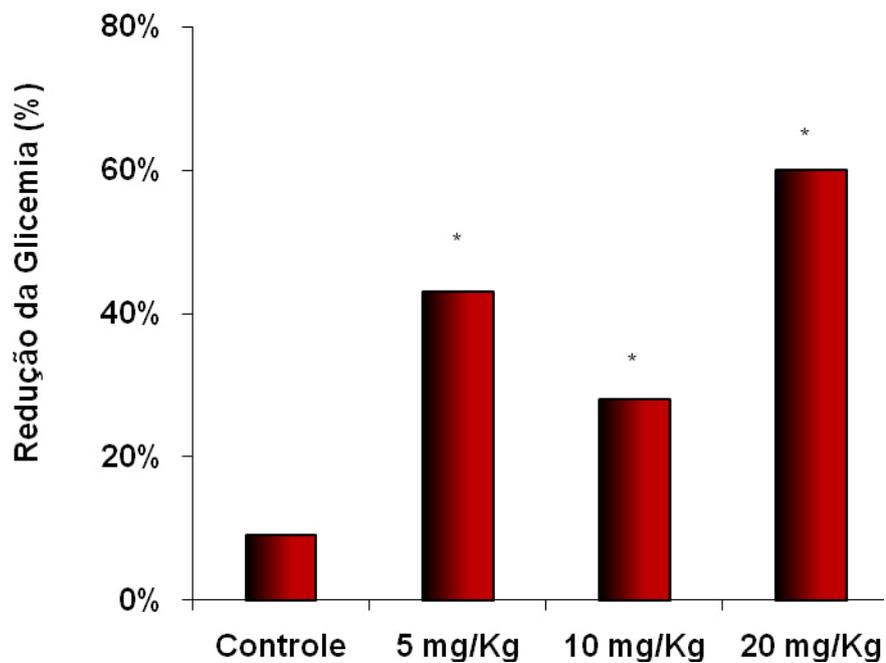
O percentual de morte em relação aos diferentes grupos foi determinado por diferença entre o número de animais no início do experimento e a quantidade restante no final para as diferentes doses testadas, sendo posteriormente comparadas aos respectivos grupos controles. No grupo controle tido como referência para os animais tratados com doses do extrato total a percentagem de morte foi de 40%. Os grupos tratados com a F(0/70) da alga marinha em estudo apresentaram índices de morte de 10, 35, 35 e 20% para as doses de 2, 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente, mostrando portanto, que o índice de mortalidade dos animais tratados com a fração protéica de *A.multifida* foi inferior ao dos animais do grupo controle (**TABELA 3**). No entanto, a dose de 2mg/kg da fração apesar de não ter reduzido significativamente o nível de glucose sanguínea, parece ter tido um efeito protetor da mortalidade dos animais, uma vez que esta dose apresentou um índice de mortalidade menor que o controle e que todas as demais doses testadas.

O aloxano causa o diabetes em ratos por causar danos às células produtoras de insulina, as células  $\beta$ -pancreáticas. Apesar disso, estudos mostraram que o estado diabético promovido por esta droga pode ser reversível após determinado período de tempo. DE Haro-Hernández e colaboradores (2004), relataram a reversibilidade do estado diabético em ratos, após 12 dias de aplicação do mesmo. Isso foi constatado pela redução dos níveis de glucose e pela reação positiva contra anticorpos anti-insulina nos tecidos pancreáticos. No entanto, o potencial da fração protéica da alga em estudo não pode ser contestado quanto a esse aspecto, uma vez que os experimentos foram realizados nos primeiros cinco dias após injeção da droga, período em que o estado diabético ainda estava bem estabelecido.

Estudos realizados com a fração protéica da alga marinha vermelha *Digenea simplex*, demonstraram seu potencial hipoglicemiante frente a ratos diabéticos cujo estado foi induzido por aloxano. A fração foi testada nas doses de 5 e 10mg/Kg, reduzindo cerca de 30 e 37 %, respectivamente, o teor de glicose sanguínea nos animais (ANDRADE, 2006). A fração protéica de *Amansia multifida* apresentou um melhor potencial hipoglicemiante, para a dose de 5mg/kg, reduzindo em 43% o nível de glicose. Estudos com a lectina purificada estão em desenvolvimento para verificar se essa atividade é proveniente dessa proteína.



**FIGURA 15** - Efeito da F (0/70) da alga marinha *Amansia multifida* (AM) sobre a glicemia dos ratos diabéticos. A figura representa o controle (água destilada 10 ml/Kg v.o.) e os grupos testes com a fração de *A.multifida* (5,10 e 20 mg/kg v.o.), os quais foram tratados durante 5 dias e apresentaram valores reducionais significativos. Os valores representam médias  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. \* $P < 0,05$  comparados ao controle (Student-Newman-Kels-Method).



**FIGURA 16** - Percentagem de redução dos níveis glicêmicos nos ratos tratados com a fração 0/70 de *A.multifida* (5, 10 e 20 mg/kg v.o.), os quais foram tratados durante 5 dias; a fração protéica reduziu em 43%, 28% e 60% respectivamente, a glicemia dos animais.

**TABELA 2:** Efeito da fração protéica F(0/70) da alga marinha vermelha *Amansia multifida* na mortalidade dos ratos diabéticos induzido por aloxano

	Glicose (mg/dl) – glicemia			% de redução
	% de animais mortos			
	Início	Final		
<b>Controle (água destilada)</b>	20	12	40%	
<b>F (0/70) <i>A. multifida</i> (2 mg/Kg)</b>	10	9	10%	
<b>F (0/70) <i>A. multifida</i> (5 mg/Kg)</b>	20	13	35%	
<b>F (0/70) <i>A. multifida</i> (10 mg/Kg)</b>	20	13	35%	
<b>F (0/70) <i>A. multifida</i> (20 mg/Kg)</b>	20	16	20%	

Os valores representam médias  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. O sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital depois de 48h da administração de aloxano (50mg/Kg, i.v.) e 1 h depois da última administração da água destilada (controle) ou das frações. Os animais foram tratados por via oral. \*\*\*P< 0,001; \*\*P<0,01; \*P<0,05 comparados ao mesmo grupo, 48h após a injeção de aloxano (Student-Newman-Kels-Method).

#### 4 - CONCLUSÕES GERAIS

A purificação da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* foi obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepahacel, cujo perfil eletroforético constatou a pureza da lectina pela presença de uma única banda protéica de peso molecular aparente de 30 KDa.

O resultado da eletroforese bidimensional mostrou a presença de cinco “spots” de peso molecular aparente de 30 KDa, assim como observado por eletroforese unidimensional, que diferiram apenas quanto ao ponto isoelétrico (pI), sendo estes considerados bastante próximos e de caráter ácido (5,66; 5,87; 6,05; 6,33 e 6,63). Tendo sido revelados, ainda, três “spots” de peso molecular aparente de 17,6 KDa e pontos isoelétricos de 5,66; 5,87 e 6,32, que coincidem com os pI(s) de três das cinco isoformas observadas, podendo-se sugerir, portanto, que esses “spots” correspondem a possíveis subunidades dessas isoformas. No entanto, uma análise por Espectrometria de Massa seria adequada para comprovar tais resultados.

A seqüência N-terminal de 20 aminoácidos não apresentou similaridade com nenhuma outra seqüência de lectina depositada em bancos de dados, sugerindo-se que ela não pertença a nenhuma classe de lectinas de algas já conhecidas.

Os estudos de caracterização estrutural realizados por técnicas de CD mostraram que a estrutura secundária da lectina é composta por 4% de alfa-hélice, 43% de folha beta, 21% de voltas e 32% de estrutura não ordenada, segundo o programa de desconvolução Contin, tendo 50% de estrutura desnaturada quando submetida à temperatura de 40,2 °C e não sendo capaz de voltar a sua forma estrutural nativa após submetida ao tratamento térmico.

Extremos de pH não promoveram alterações conformacionais na estrutura da lectina, tanto para espectros analisados por CD quanto por fluorescência. A presença de resíduos de triptofano e tirosina foram revelados por análise de emissão de fluorescência, cujo pico máximo foi em 336 nm, aproximadamente.

A fração protéica F(0/70) da alga marinha vermelha apresentou potencial hipoglicemiante, já que reduziu significativamente o nível de glucose sanguíneo no modelo de diabetes induzido por aloxano em ratos.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M. A. F.; Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, 27, 1835 - 1841, 1988.

AGRAWAL, B. B. L., GOLDSTEIN I. J. Specific Binding of Concanavalin A to Cross-Linked Dextran Gels. **Biochem. J.** 96, 23c, 1965.

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B. Mapurunga S. Comparative study on hemagglutinins from the red alga *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 7 (1): 15-19, 1995.

AMICO, V. Marine brown algae of family Cystoceiraceae: chemistry and chemotaxonomy. **Phytochemistry**, 39 (6): 1257-1279, 1995.

ANDRADE F. K., **Caracterização Bioquímica e Algumas Propriedades Farmacológicas da Alga Marinha Vermelha *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh**. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2006.

BENEVIDES, N.M.B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A.L.P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 8(2): 117-122, 1996.

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, 2001.

BIESSELS, G., J., STAEKENBORG, S., BRUNNER, E., BRAYNE, C., SCHELTENS, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurol.** v, 5: p. 64-74, 2006.

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, n. 213-218, 1993.

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

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

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

BREVIGLIERI, E; **Monografia de Conclusão de Curso**, Universidade do Vale do Itajaí, Brasil, 1997.

BROADHURST, C. L.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Insuline-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. **Journal Agric. Food Chemistry**, v. 48, p. 849-852, 2000.

BROEKAERT,W.F., NSIMBA-LUBAKI,M., PEETERS,B. & PEUMANS, W. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemical Journal**, **221**: 163-164, 1984.

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 marina algae *Bryothaminion triquetrum* defines a novel lectin struture. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.57,p.343-350, 2000.

CAMMUE B. P. A.; PEETERS, B.; PEUMANS, W., J. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. **Planta**, v. 169, p. 583-588, 1986.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos dobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1; p. 99 – 105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; **Quim. Nova**, **23**, 680, 2000.

CHERNG, JONG-YUH e SHIH, MEI-FEN. Improving glycogenesis in streptozotocin (STZ) diabetic maice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sciences*, **78**, 1181-1186, 2006.

CHERNG, JONG-YUH e SHIH, MEI-FEN. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*, 77, 980-990, 2005.

COLLIP, J. B. A new hormone present in plant tissue. **Journal of Biological Chemistry**. 513-544, 1923.

COSTA, F.H.F.; SAMPAIO, A.H.; NEVES, S.A.; ROCHA, M.L.A.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P. Purification and partial characterization of a lectin the alga *Amansia multifida*. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, 5: 53-61, 1999.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e Funcional**. 5<sup>a</sup>.ed., editora Guanabara. 1277p., 1996.

COWAN, M.M.; Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K.M.; **Journal. Nat. Prod.** 60, 52, 1997.

CUMMINGS, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In glyco-sciences, status and perspectives. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Chapter 10. **Published by Champman & Hall GmbH**, Weinheim, Germany, p. 191-199, 1997.

DANEMAN, Denis. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 58, p. 367-847, 2006.

DE HARO-HERNANDEZ, R., CABRERA-MUÑOZ, L., MÉNDEZ, J. D. Regeneration of beta cells and neogenesis from small duct function in allox-treated rats. *Arch Med Research*. V.35, p. 114-120, 2004. Citado por ANDRADE, 2006.

DE SOUZA M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A., BELLA CRUZ, R.C. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. (Editores). **Ciências Farmacêuticas**: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, Itajaí, 2003

EDMAN, P. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. V. 4; p. 283-293, 1950.

ETZLER, M.E. Plant lectins molecular and biological aspects. **Ann. Ver. Plant. Physiol.** **36**: 209-234, 1985.

FARIAS, W. R. L. **Purificação, Caracterização Parcial e Atividade Biológica da lectina da Alga Marinha Vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson.** Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 104 pp. Fortaleza, 1995.

FABREGAS, J., MUÑOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A. Purification and partial characterization of tomentine: an N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stackh. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **124**: 21-30, 1988.

FAVERO, J. Lectins in AIDS research. **Glycobiology**, Cary, v. 4, p. 387-396, 1994.

FLEURENCE, J. ; CATHERINE, L. C.; MABEOU, S.; MAURICE, M.; LANDREIN, A. Comparison of different extractive procedures for proteins from yhe edile seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. **Jornal Appl. Phycol.**, **7**: 577-583, 1995.

FREITAS, C, D, T. **Identificação, Purificação, Caracterização e Atividade Biológica de Proteínas do Látex de *Calotropis procera* envolvidas na Defesa da Planta.** Tese de Dotourado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 190 pp. Fortaleza, 2009.

GANNON, M. C., NUTTALL, F. Q. Control of blood glucose in type 2 diabetes without weight loss by modification of diet composition. **Nutrition & Metabolism**, v. 3 (16), 2006.

GILETTO A., C.N. PACE, IN: N.C. Price (Ed.), Protein Stability in Proteins Labfax, **Bios Scientific Publishers**, Oxford, pp. 233-239, 1996.

GRAY ALISON M. & FLATT, PETER R., Actions of the traditional antidiabetic plant, *Agrimony eupatoria* (agrimony): effects on hyperglycaemia, cellular glucose metabolism and insulin secretion. **Bitish Jornal of Nutrition** **80**. pp. 109–114 (1998).

GRAY ALISON M. & FLATT, PETER R., Pancreatic and extra-pancreatic actions of the traditional anti-diabetic plant, *Eucalyptus globulus* (eucalyptus). **Jornal of Nutrition** **128** pp. 2319–2323, 1998.

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**, London, v. 52, p. 225-227, 1995.

GUPTA, M.P., ed. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**; Talleres de Editorial Presencia, Santafé de Bogotá: Colombia, p. 347, 1995.

GUYTON, A. C.; HALL J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, Décima Edição, 973 pp, 2002.

HINCHCLIFFE, M., ILLUM, L. Intranasal insulin delivery and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, p.199-234, 1999.

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, 1986a.

HORI, K.; MATSUDA, H.; MIYAZAWA, K. & ITO, K. A mitogenic agglutinin from red alga *Carpopeltis flabellata*. **Phytochemistry**, **26(5)**: 1335-1338, 1987.

HORI, K.; IKEGAMI, S.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Mitogenic and antineoplastic isogglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2063-2067, 1988b.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; KEISUKE, M. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red algae, *Hypnea japonica*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1474,p.226-236, 2000.

IGNARRO, L. J, BALESTRIERI, M. L., NAPOLI, C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 326-340, 2007.

JOHNSON C.M., A.R. FERSHT, Protein stability as a function of denaturant concentration: the thermal stability of barnase in the presence of urea, **Biochemistry** **34**; 6795–6804 (1995).

JOSEPH R. LAKOWICZ. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Third Edition, p. 5-25 2006.

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

KANNUR D.M., HUKKERI V.I. AND AKKI K.S.; Antidiabetic activity of *Caesalpinia bonducella* seed extracts in rats **Fitoterapia**, Volume 77, Issues 7-8, p. 546-549. 2006

KOSKI, R., R. Practical Review of Oral Antihyperglycemic Agents for Type 2 Diabetes Mellitus. **Pharmacy update**, v. 32 (6), p. 869-877, 2006.

KRAL, L.P.; LEVINE, R.; BARNET, D. The history of diabetes. In: **Joslin's diabetes mellitus**. Kahn, C.R. e Weir G.C. (eds.) Lea and Febiger, Philadelphia, 13 ed., pp. 1-81, 1994. Citado por Rocha M.L.A., Tese de Doutorado, 2006)

KRITTANAI C., W.C. JOHNSON Jr., Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains, **Anal. Biochem.** 253: 57– 64, 1997 (Citado por SHARON, 2005)

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos. In: **Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São paulo: Savier, p. 222-241, 2002

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

LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higher plants. *The biochemistry of plants* v. 6, p. 371-447, 1981.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Ver.**, **98**: 637-674, 1998.

LOVELESS, R. W. & ROGERS, D. J. Biochemical studies on the lectins from subspecies of *Codium fragile*. **Br. Phycol. J.** **20**: 188, 1985.

MATHEWS, CHRISTOPHER K.; VAN HOLDE, K. E.; **Biochemistry**, 2<sup>a</sup> ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC (1995).

MATHEUS, A., S., M.; COBAS R., A.; GOMES, M., B. Dislipidemias no Diabetes Melito Tipo 1: Abordagem Atual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**; v. 52/2:334-339, 2008).

MATSUBARA, K.; SUMI, H. and HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia** 52, pp540-543, 1996.

MELO, M.R.S. **Isolamento, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Carboidratos das Algas Marinhas Vermelhas *Agardhiella ramossissima* (Harv.) Kylin e *Gracilaria cornea* (J.agardh)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 102f. Fortaleza, 2001.

MONTEIRO-MOREIRA. A. C. O. **Caracterização Estrutural de Três Lectinas com Especificidades por Açúcar Distintas, Isoladas de Sementes de Fruta-Pão (*Artocarpus incisa* L.)**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – 2002.

MOREIRA, R.A . MONTEIRO, A . C.O. HORTA, A . C. G. OLIVEIRA, J.T.A . & CAVADA, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. mergacarpa seed lectin **Phytochemistry**,46 (1): 139-144, 1997.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JR. C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, 9 (2): 159-165 (7), 2002.

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

NEGRI, G. Diabetes Melito: Plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41 (2), 2005.

NEVES, S.A.; BARUFFI-DIAS, M.; FREITAS, A.L.P.; ROQUE BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine alga lectins. **Inflammation research**, **50 (10)**: 486-490, 2001.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.M.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas**: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, 2003.

NOWEL, P.C. Phytohemagglutinins na initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, **20**,462p., 1960.

OKAMOTO, R.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. & ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia**, **46**: 975-977, 1990.

OLIVEIRA A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; XAVIER-NETO, J.; PEREIRA, A., C.; VIEIRA, J. G. H.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36: 1167-1173, 2003.

OLIVEIRA A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; XAVIER-NETO, J.; PEREIRA, A., C.; VIEIRA, J. G. H.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. **Protein and Peptide Letters**. 6:15-21, 1999.

OLIVEIRA, J. E. P., MILECH, A. **Diabete Mellitus: clinica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2004, 362p.

PANORAMA DE AQUICULTURA. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. V. 7, nº 41, 1997.

PEREIRA, G. R.; GASPARETTO, A.; GAIO, A. Análise Comparativa dos Níveis de Glicose Capilar x Glicose Venosa. **NewsLab**, ed. 79, p. 104-108, 2006.

PEREZ-LORENZO, S.; LEVI-BENSHIMOL, A.; GOMEZ-ACEVEDO, S. Presença de lectinas, taninos e inibidores de proteass em algas marinhas de lãs costas venezuelanas. **Acta Científica Venezuelana**, 49:141-151, 1998.

PEUMANS & VAN DAMME, Proposal FOR A Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins, **Lectins**, 10:105-117, 1994/1995.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, v. 904 p. 2004.

RATNER, E. R. 2001 Controlling Postprandial Hyperglycemia. **Am J Cardiol**, v. 88 (suppl) p. 26H–31H, 2001.

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

REES, S. A., ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet. Med.**, v. 22, p. 359-370, 2005.

RIBES, G., SAUVAIRE, Y., DA COSTA, C., BACCOU, J.C. AND LOUBATIERES-MARIANI, M.M. Antidiabetic effects of subfractions from fenugreek seeds in diabetic dogs. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine** 182, pp. 159–166, 1986.

ROCHA, M.L.A., **Uso das lectinas de algas marinhas no diagnóstico de diabetes mellitus e em atividade antinociceptiva e antiedematogênica**. Tese de Doutorado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2006.

RODRIGUEZ-LOPEZ, M. Action of the *Chlorella pyrenoidosa* on experimental diabetes in rats. **Med. Exp. Int. J. Exp. Medical** 10, 381-386, 1964. Citado por CHERNG, JONG-YUH e SHIH, MEI-FEN, 2005.

RODRIGUEZ-LOPEZ, M., LOPEZ-QUIJADA, C. Plasma-glucose and plasma-insulin in normal and alloxanized rats treated with *Chlorella*. *Life Sciences* 10, 57-60, 1971. Citado por CHERNG, JONG-YUH e SHIH, MEI-FEN, 2005.

ROGERS, D. J.; BLUNDEM, G.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med. Lab. Sciences**, **34**: 193-200, 1977.

ROGERS, D. J.; BLUNDEM, G. Structural properties of the anti-b lectin from the red alga *Ptilota plumosa* (Huds.) C. Ag. **Bot. Marina**, **23**: 459-462, 1980.

ROGERS, D.J. & FANGLU, H. Lectins from *Codium* species. **Br. Phycol. J.** **26**: 95-96, 1991.

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

ROSA, I.G. **Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.: Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose.** Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 114f. Fortaleza, 2000.

SAMPAIO A. H., ROGERS D. J., BARWELL C. J., SAKER-SAMPAIO S., COSTA F. H. F. AND RAMOS M. V. A new procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **Journal Applied Phycology** **10**: 539–546, 1998.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. 126p. Chapman and Hall, London, 1989.

SHARON M. K., THOMAS J. J., NICHOLAS C. P. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta** **1751**. 119 – 139, 1995.

SHARON M. K., NICHOLAS C. P. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function **Current Protein and Peptide Science**, **1**, 349-384, 2000.

SILVA, L. B., SANTOS, S. S. S., AZEVEDO C. R. The leaves of green plants as well as a cyanobacterium, red alga, and fungi contain insulin-like antigens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **35**: 297-303, 2002.

SMIT, J. A.; Medical and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Jornal of Applied Phycology**, **16**:245-262, 2004.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S.Y.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, **Anal. Biochem.** **287**: 243– 251(2000).

SRIVASTAVA Y., VENKATAKRISHNA- BHATT, H., VERMA, Y., VENKAIAH, K. Antidiabetic and adaptogenic properties of *Mormodica charantia* extracts. **Experimental and Clinical Evaluation Phytotherapy research.** 7: 285-289,1993).

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.

TESKE, M; TRENTINI, A.M. M.; **Compêndio de Fitoterapia**; Herbarium Lab. Botânico, Curitiba: Paraná, 1995.

UGAZ, O. L.; **Investigación Fitoquímica**; Fondo Editorial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima: Peru, 1994.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDESTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasilienses*) latex. **Planta**, v.183, p. 258-262, 1991.

VAN DAMME, E.J.M.; BALZARINI, J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose – binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycoconjugates jornal**, v. 11, p. 321-332,1994.

VAN DAMME, E.J.M., BRIKÉ, F., WINTER H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN I.J.; PEUMANS W. J. Molecular cloning of two different mannose – binding lectins from tulip bulbs. **European journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A . K. & PEUMANS, W.J.. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthun nivalis*) bulbs. **Febs Letters**, **215** (1)140-144, 1987a.

VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A . K. & PEUMANS, W.J. Leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol**,**85**: 566-569, 1987b.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, **27** (1): 139-145, 2004.

WANG, S.; ZHONG, F.D.; ZHANG, Y. J.; LIN, Q.Y.; XIE, L.H. Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n.2, p. 111-117, 2004.

WHITTAKER, R.H. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science** **163**: 150-160, citado por Câmara (1994), 1969.

WYNNE, M. J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western atlantic: first revisio (Nova Hedwigia). Berlin Stuttgart. J. Cramer, 150 p, 1998.

ZHANG, Z.Y., YE, H.Y., YU, M.H., YOU, L., YAN, Y.Q. and YANG, X.F. Effects of astragalus polysaccharide on the myocardial ultrastructure of diabetic rats. **Journal of Fudan University (Medical Sciences Edition)** **28**, pp. 476–478, 2001.