



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA
PRIMÁRIA DE UMA FICOBILIPROTEÍNA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea*
musciiformis (WULFEN) LAMOUREUX

FORTALEZA
2015

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA
PRIMÁRIA DE UMA FICOBILIPROTEÍNA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea*
musciformis (WULFEN) LAMOUREUX

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientadora: Dra. Kyria Santiago do Nascimento
Co-orientadora: Dra. Cíntia Renata Costa Rocha

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N671i Nobre, Clareane Avelino Simplicio.
Isolamento, purificação e caracterização parcial da estrutura primária de uma ficobiliproteína da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux / Clareane Avelino Simplicio Nobre. – 2015 .
55f. : il. color., enc. : 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.
Orientação: Profa. Dra. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Dra. Cíntia Renata Costa Rocha.
1. Alga marinha vermelha. 2. Pigmento acessório. 3. ficobiliproteína. I. Título.

CLAREANE AVELINO SIMPLICIO NOBRE

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA
PRIMÁRIA DE UMA FICOBILIPROTEÍNA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea*
musciformis (WULFEN) LAMOUREUX

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior
Universidade Federal do Cariri

Dedico este trabalho à minha família e meus amigos por acreditarem em mim, me apoiarem e por sempre estarmos juntos em todas as caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esses dois anos de mestrado e a capacidade de seguir essa jornada de bastante aprendizado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, que me ajudou, tirando dúvidas, sempre com alternativas e por me incentivar sempre.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por permitir a realização desse trabalho no BioMol- Lab.

Aos professores da Engenharia de Pesca, Celso Shiniti Nagano, Alexandre Holanda Sampaio, Silvana Saker Sampaio e Bartolomeu Warlene Silva de Souza por terem sido fundamentais na minha jornada durante a graduação.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias por participar da banca examinadora e por sua contribuição durante a graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior por sua participação na banca, por sua amizade e atenção.

A profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha por toda orientação e apoio dado a parte experimental.

Aos amigos da Engenharia de Pesca que estarão no meu coração, nunca esquecerei de vocês: Alexandra, Hildi, Winnie, Fernando, Guilherme, Rômulo e Suzete.

As meninas do laboratório que sempre me trataram com atenção, respeito e carinho, obrigada Cláudia, Gleice, Simone, Nágila, Cleane e Mayara.

À Renata Pinheiro que sempre foi atenciosa e de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à todos que me acolheram durante esse último ano de muito aprendizado na Biologia Molecular, agradeço a Lari, Lu, Samia, Greice, Daniel e Ivanice.

Aos meus amigos que fiz no curso de Engenharia de Pesca, em especial, Jacque, Amanda, Mikaely, João Paulo e Diego, pois sempre terão meu respeito e gratidão.

À minha avó Zélia, pelo seu amor e por me permitir realizar um sonho que foi ingressar na Universidade.

Ao meu esposo, Vianney, agradeço todos os dias por seu riso fácil e essa leveza que traz a minha vida e por ser o meu porto seguro.

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

À minha família, em especial, minhas tias Rita, Socorro e Goretti. Aos meus primos Cairo, Carol e Luiza.

Em especial dedico esse trabalho à Maria Clara, minha filha linda e carinhosa. Obrigada pelo seu imenso amor, por ser minha força e por me fazer feliz.

À todos os funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca.

Ao seu Antônio, pelo carinho e atenção dado aos alunos do BioMol-Lab.

Agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma, que com certeza são muitas pessoas, serei sempre grata por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento da bolsa de pesquisa.

Aquele que habita no esconderijo do altíssimo,
à sombra do onipotente descansará. Direi do
senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a
minha fortaleza, e nele confiarei.

(Salmo 91)

RESUMO

As algas marinhas constituem uma rica reserva de substância de interesse biotecnológico, dentre essas substâncias podemos destacar as ficobiliproteínas. Essas moléculas são proteínas solúveis em água ligadas covalentemente a pigmentos com estrutura tetrapirrólica linear denominado bilina, também conhecido como pigmento acessório. Dessa forma, as ficobiliproteínas formam um complexo denominado ficobilissomos, que constitui uma estrutura primordial de captação de luz, apresentando função fotossintética. Essas estruturas são encontradas nas algas marinhas vermelhas e cianofíceas. Ficobiliproteínas isoladas e purificadas, quando caracterizadas, apresentaram subunidades estruturais, como subunidades alfa, beta e gama. Quanto a suas aplicações, essas proteínas foram utilizadas como corantes e estabilizantes de alimentos, marcadores de biomoléculas, agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. Tendo em vista a importância destas moléculas, este trabalho teve como objetivo isolar, purificar e determinar a estrutura primária parcial da cadeia beta de uma ficobiliproteína presente na alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. A ficobiliproteína (HMP) foi isolada através da precipitação do extrato proteico com sulfato de amônio e purificada por cromatografia de troca iônica. A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou que a HMP possui duas bandas proteicas em torno de 20 kDa e 22 kDa. A banda de 22 kDa foi excisada do gel e digerida com a enzima proteolítica tripsina. Os peptídeos oriundos da digestão foram submetidos à fragmentação em espectrômetro de massas. Os fragmentos gerados foram utilizados para sequenciar os peptídeos e estes na identificação de proteínas a partir dos bancos de dados existentes. A partir dessas informações, iniciadores foram desenhados para amplificar o gene da cadeia beta da ficobiliproteína de *Hypnea musciformis* (*bhmp*) a partir do DNA genômico da alga. O gene amplificado foi sequenciado e os dados brutos foram processados pela ferramenta Phred/Phrap/Consed. A sequência processada foi traduzida para obtenção da estrutura primária parcial de *bhmp*. A tradução resultou em uma sequência de 87 resíduos de aminoácidos e HMP apresentou identidade com diversas ficoeritrinas de algas vermelhas.

Palavras-chave: Alga marinha vermelha. Pigmento acessório. Ficobiliproteína.

ABSTRACT

Seaweeds are a rich reserve of substances with biotechnological interest, among these substances it is possible to highlight the phycobiliproteins. These molecules are water-soluble proteins covalently linked to pigments with linear tetrapyrrole structure called bilin, also known as accessory pigment. Thus, the phycobiliproteins form a complex named phycobilisomes, which is a primary structure of light-gathering, showing photosynthetic function. These structures are found in red and Cyanophyceae seaweed. Phycobiliproteins isolated and purified, when structurally analysed, present subunits characterized as alpha, beta and gamma. These proteins can be used as colorants and stabilizers for food, markers of biomolecules, antioxidants and anti-inflammatory agents. In view of the importance of these molecules, this work aimed to isolate, purify and determine the partial primary structure of the beta chain phycobiliprotein present in the red marine algae *Hypnea musciformis*. The phycobiliprotein (HMp) was isolated by precipitation of proteins with ammonium sulphate and purified by ion-exchange chromatography. The polyacrylamide gel electrophoresis revealed that the HMp has two chains around 20 kDa and 22 kDa. The 22 kDa chain was excised from the gel and digested with proteolytic enzyme trypsin. The peptides from digestion underwent fragmentation in mass spectrometer. The generated fragments were used for sequencing peptides and have identified in databases. Primers were designed to amplify the beta chain gene *bhmp* from the genomic DNA of the algae. The amplified gene was sequenced and the tool Phred/Phrap/Consed processed the raw data. The final gene sequence has been translated to obtain the partial primary structure of bHMp. The translation resulted in a sequence with 87 amino acid residues and HMp presented identity with various phycoerythrins of red algae.

Keywords: Red seaweed. Accessory pigment. Phycobiliprotein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ficobilissomo presente na membrana dos tilacóides.....	19
Figura 2 -	Estrutura das ficobilinas	20
Figura 3 -	Cromóforos ligados aos resíduos de cisteínas	22
Figura 4 -	Alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux	26
Figura 5 -	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sephacel	36
Figura 6 -	SDS-PAGE 12% e PAGE 7,5% da ficobiliproteína de <i>Hypnea musciformis</i>	37
Figura 7 -	Sequenciamento <i>denovo</i>	39
Figura 8 -	DNA genômico da alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	41
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose 1% do gene de interesse	42
Figura 10 -	Produto da digestão utilizando EcoRI.....	43
Figura 11 -	Sequência parcial obtida da cadeia beta da ficoeritrina de <i>Hypnea musciformis</i>	44
Figura 12 -	Alinhamento múltiplo da sequência de HMp com ficoeritrinas presentes nos bancos de dados	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ficoeritrinas de algas vermelhas com sequências primárias determinadas.....	23
Tabela 2-	Sequências de aminoácidos dos peptídeos de HMp oriundos da digestão com tripsina.....	39
Tabela 3-	Análise da identidade dos peptídeos sequenciados da cadeia beta com proteínas conhecidas utilizando a ferramenta BLAST.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Considerações gerais	14
1.2	Algas	15
1.2.1	<i>Importância biotecnológica de algas</i>	16
1.3	Ficobiliproteínas	17
1.3.1	<i>Breve histórico</i>	17
1.3.2	<i>Definição</i>	18
1.3.3	<i>Características estruturais</i>	20
1.3.4	<i>Aplicações biotecnológicas</i>	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	Purificação	27
2.1.1	<i>Coleta da alga marinha</i>	27
2.1.2	<i>Extrato proteico e detecção da ficobiliproteína</i>	27
2.1.3	<i>Fracionamento proteico</i>	27
2.1.4	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	28
2.1.5	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	28
2.2	Determinação da estrutura primária por espectrometria de massas	29
2.2.1	<i>Digestão in gel e análise dos peptídeos por espectrometria de massas</i>	29
2.3	Determinação da estrutura primária pelo método terminador de cadeia (dideoxi)	30
2.3.1	<i>Desenho dos primers antisenso e senso</i>	30
2.3.2	<i>Isolamento e purificação do DNA genômico</i>	30
2.3.3	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da gene da cadeia β (gene bhmp)</i>	31
2.3.4	<i>Excisão em gel e purificação do produto da PCR</i>	32
2.3.5	<i>Clonagem molecular do gene bhmp em vetor plasmidial</i>	32
2.3.6	<i>Transformação bacteriana</i>	32
2.3.7	<i>Purificação do DNA plasmidial</i>	33
2.3.8	<i>Sequenciamento dos genes bhmp pelo método terminador de cadeia</i>	34
3	RESULTADOS	35
3.1	Purificação da ficobiliproteína	35
3.2	Análise dos peptídeos por espectrometria de massa	38

3.3	Determinação da estrutura primária pelo método terminador de cadeia	41
3.4	Análise por Bioinformática	44
4	CONCLUSÃO	47
5	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os oceanos abrangem uma imensa biodiversidade com grande parte ainda inexplorada, dessa forma, com a Biotecnologia Marinha é possível explorar essa biodiversidade, tanto da flora quanto da fauna, e extrair diversos benefícios para a humanidade (TRAMPER *et al.*, 2003). Os recursos marinhos são considerados fontes naturais de biomoléculas com potenciais aplicações biotecnológicas. O mercado mundial de produtos provenientes da Biotecnologia Marinha parece bastante promissor, sendo estimado um faturamento de aproximadamente 2,8 bilhões de euros no ano de 2010 (QUERELLOU *et al.*, 2010).

O Brasil possui uma extensa região costeira de 8.698 km com uma biodiversidade invejável. Diversos grupos de pesquisa brasileiro investigam substâncias purificadas e isoladas de algas, bactérias, fungos e invertebrados marinhos bem como o seu potencial biotecnológico contra diversas doenças como câncer, doenças virais, cardiovasculares, neurológicas e outras doenças. A enorme potencialidade dos oceanos para a Biotecnologia permanece em grande parte desconhecida. Os recursos marinhos mais explorados estão relacionados às atividades pesqueiras, exploração de óleo e gás, maricultura, turismo e lazer (BRASIL, 2010).

Dentre todos os organismos marinhos que existem nos oceanos, as algas marinhas merecem um destaque especial, pois oferecem uma grande diversidade tanto em espécies quanto em bioprodutos com importantes aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Diversos estudos mostram que, através das algas marinhas, é possível obter moléculas com potenciais biotecnológicos como, por exemplo, lectinas, polissacarídeos sulfatados (como ágar e carragenana), pigmentos, carotenóides, lipídeos, dentre outras moléculas que também apresentam importantes atividades biológicas (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; SOUSA, 2010; THANGAM *et al.*, 2013; TAKAICHI, 2011). A exploração dessas ferramentas biotecnológicas contribui para o desenvolvimento sócio econômico do país através da geração de produtos que, comercializados, geram emprego e renda para vários setores (VALLE, 2005).

1.2 Algas

As algas marinhas são seres vivos autotróficos e fotossintéticos, importantes para a produção primária, sendo responsáveis pela produção de aproximadamente 50% do carbono orgânico gerado no planeta Terra em um ano (FIELD *et al.* 1998).

O termo não taxonômico “alga” compreende um grupo eucariótico de vários filos, incluindo o filo *Rhodophyta* (algas vermelhas), *Chlorophyta* (algas verdes), *Phaeophyta* (algas pardas), *Bacillariophyta* (diatomáceas) e o grupo procariótico representado pela divisão *Cyanophyta* (alga verde-azul) (VAN DEN HOEKE; MAN; JAHNS, 1995; MOHAMED *et al.*, 2012).

As algas são diferentes em formas, tamanhos e ocupação no ecossistema. Elas constituem um grupo de aproximadamente 40 mil espécies bastante heterogêneo, que se apresentam nas formas uni ou pluricelulares, encontradas na forma micro e macroscópicas, sendo denominadas micro e macroalgas, respectivamente. Por essa razão, elas apresentam um vasto espectro fenotípico que variam desde picoplâncton (0,2 -2,0 μm de diâmetro) até os famosos *kelps* (60 m de comprimento). As algas são conhecidas como “plantas inferiores” pelo fato de não possuírem raízes, caules, folhas e tecidos vasculares bem definidos, mas apresentam a capacidade de realizar fotossíntese (BARSANTI; GUATIERI, 2006). Elas podem apresentar talos cenocítico, parenquimatoso e pseudoparenquimatoso.

A grande maioria das algas marinhas macroscópicas pertence à classe das algas vermelhas (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009; EL GAMAL, 2010). A produção de algas em 2012 foi de 23,8 milhões de toneladas, o que correspondeu a aproximadamente 6,6 bilhões de dólares. Alguns países asiáticos dominam essa produção, sendo as espécies *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma spp.* as mais cultivadas (FAO, 2014).

As macroalgas são cultivadas para serem utilizadas como fonte de alimentos ou substâncias específicas como, por exemplo, iodo, alginato, carragenana e ágar (BARSANTI; GUATIERI, 2006). No Brasil, há diversos cultivos de algas, sendo os gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* os mais cultivados e, recentemente, o gênero *Kappaphycus*. Essas algas possuem importância econômica, pois são utilizadas como principal fonte de produtos naturais com aplicações biotecnológicas em diversas áreas (FACCINI; BERCHEZ, 2000; PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002). As algas marinhas vermelhas possuem importância econômica e ecológica (FLYNN, 2014) e muitas vezes, esse grupo, é considerado como a principal fonte de moléculas biologicamente ativas quando comparadas com outros grupos de algas, podendo ser um dos grupos mais antigos das algas eucarióticas.

1.2.1 Importância biotecnológica de algas

Na Europa medieval, a população já utilizava chá elaborado a partir de algas para combater complicações intestinais (BRANDINI, 2006). Na Ásia, países como Japão, China e Coreia, utilizam as algas marinhas como parte da sua dieta. Estudos com diversas espécies de algas mostram que alguns compostos como o cymobarbatol e o caulerpals sesquiterpeno, apresentam atividade antimutagênica e antifúngica, respectivamente (KIM, 2011).

Além das atividades biológicas voltadas para a área da farmacologia, as algas marinhas fornecem produtos que podem ser aplicados na indústria cosmética e alimentícia. Em macroalgas vermelhas podem ser encontrados dois tipos de hidrocolóides, o ágar e a carragenana, que são carboidratos solúveis em água com grande capacidade de formarem géis (BARSANTI; GUATIERI, 2006). Esses polímeros possuem diversas aplicações no setor alimentício como, por exemplo, função de estabilizar sorvetes e outros produtos à base de leite. No setor farmacêutico, é utilizado em meio de cultura para micro-organismos e como laxantes. Em laboratórios de pesquisa são usados como suportes de matrizes cromatográficas e gel de eletroforese para separação de biomoléculas (FAO, 1990). No caso da carragenana, esse ficocolóide pode ser encontrado nos gêneros *Kappaphycus*, *Hypnea* e *Betaphycus*. A carragenana é utilizada como aditivo alimentar natural e atua principalmente como agente gelificante, espessante e estabilizante, sendo utilizada em alimentos como, por exemplo, os iogurtes. Na área farmacêutica é utilizada na preparação de drogas insolúveis (GRAHAM, GRAHAM, WILCOX, 2009; FAO, 1990; GAMMAL, 2010).

Alguns pigmentos naturais são encontrados nas algas marinhas, dentre eles, podemos citar os carotenóides. Esses pigmentos são divididos em duas classes: (i) as xantofilas (astaxantina, luteína, cantaxantina) que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupos funcionais contendo oxigênio, sendo o pigmento mais abundante na natureza e os carotenos (licopeno, α - e β - caroteno) que apresentam hidrocarbonetos insaturados (SOUSA *et al.*, 2006). O papel dos carotenóides na área da saúde é amplamente estudado pelo fato de apresentarem atividade antioxidante. Alguns estudos relatam a participação dos carotenóides nos processos de envelhecimento e no combate a doenças graves como câncer e derrame (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2004; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

No gênero *Hypnea* é possível encontrar lectinas, um grupo de proteínas, com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (BRASIL, 2010; BITENCOURT *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Dessa forma, as algas marinhas possuem importância econômica, pois são utilizadas como fonte de produtos naturais com aplicações biotecnológicas em diversas áreas. Em um levantamento de patentes feito no Brasil, para produtos biotecnológicos marinhos, foi possível comparar diversos organismos como esponjas, ascídias, pepinos do mar, microrganismos e algas. Dessa forma, constatou-se que as algas marinhas detinham a maior participação, mostrando, portanto, que esses organismos são essenciais para a produção de biomoléculas bastante interessantes (BRASIL, 2010).

As algas vermelhas apresentam diversas moléculas biologicamente ativas com uma grande variedade de aplicações. Alguns estudos mostram a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antimalária de biomoléculas isoladas de algas vermelhas (EL GAMAL, 2010). Tanto a composição bioquímica quanto o valor nutricional desse grupo de algas justificam a sua utilização na nutrição humana e animal (BOURGOUGNON; JACQUOT; GADAL, 2014).

1.3 Ficobiliproteínas

1.3.1 Breve histórico

No ano de 1836, Ness Esebeck trabalhando com *Oscillatoria sp.*, uma cianobactéria, descreveu um pigmento azul brilhante e solúvel em água, o qual chamou de saprocianina. Alguns anos depois, foi possível isolar pigmentos avermelhados e solúveis em água de algas marinhas vermelhas, recebendo a denominação de ficoeritrinas. Em 1854, Stokes realizou as primeiras análises espectroscópicas desses pigmentos, observando a intensa fluorescência dessas moléculas. Ainda no final do século XIX, Molisch Hans (1894) obteve os primeiros cristais de ficobiliproteínas, propondo a natureza proteica dessas biomoléculas, sendo essa teoria reforçada por diversos estudos posteriores (MARSAC, 2003).

No início do século XX foi analisada pela primeira vez a composição de aminoácidos das ficobiliproteínas, sendo a primeira sequência obtida completamente em 1978 de uma ficocianina isolada de *Mastigocladus laminosus* (FRANK *et al.*, 1978).

Durante muito tempo, tanto as ficobiliproteínas quanto os ficobilissomos foram estudados, demonstrando interessantes propriedades físico-químicas e estruturais (MARSAC, 2003).

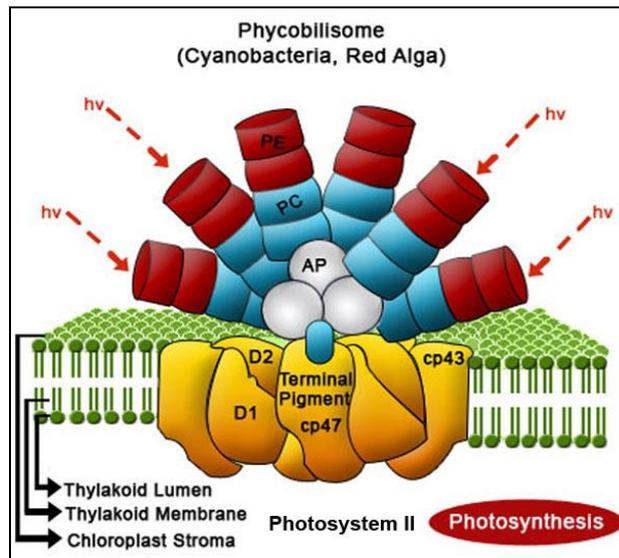
1.3.2 Definição

A fotossíntese ocorre nos cloroplastos dos organismos autotróficos, sendo um processo responsável pela transformação da energia luminosa em energia química, dividida nas fases de reações luminosas e fase de assimilação do carbono (clara e escura). O principal pigmento fotossintético é a clorofila *a*, presente em todos os organismos que realizam fotossíntese (NELSON; COX, 2009).

Clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas são as três classes de pigmentos naturais encontrados nas algas marinhas (PANGESTUTI; KIM, 2011). As ficobiliproteínas são comumente chamadas de pigmentos acessórios ou antenas e participam de uma cadeia eficiente de transferência de energia (ROMAN *et al.*, 2002).

As ficobiliproteínas são constituídas por uma parte proteica (apoproteína) ligada covalentemente a cromóforos denominados bilinas (grupo prostético) encontrados em cianobactérias, algas vermelhas e criptófitas (alga eucariótica unicelular) (GLAZER, 1994). Elas formam um complexo altamente ordenado denominado Ficobilissomo, localizado na membrana dos tilacóides (Figura 1). A energia dos fótons absorvidos pelos pigmentos é conduzida para a clorofila *a* do centro de reação fotossintético (NELSON; COX, 2009). Os ficobilissomos permitem que as ficobiliproteínas se arranjam geometricamente para otimizar a captura de luz e transferência de energia, participando de uma cadeia de transferência em sequência (Ficoeritrina > ficocianina > aloficocianina > clorofila *a*) (KUDDUS *et al.*, 2013). Essa característica é importante para as algas que vivem em ambientes com flutuações de maré, onde a intensidade da luz na coluna d'água pode variar ao longo do dia. Dessa maneira, as ficobiliproteínas absorvem de forma efetiva os comprimentos de ondas da luz solar que a clorofila seria ineficiente na captura.

Figura 1 - Ficobilissomo presente na membrana dos tilacóides



Fonte: <http://www.hashbiotech.com/hashbiotech/files/c-phycocyanin.pdf>

A biossíntese das bilinas já foi estudada, por exemplo, na alga vermelha *Cyanidium caldarium*. As ficobilinas são sintetizadas a partir do succinil-CoA e glicina que produzem o ácido α -aminolevulínico, gerando grupo heme via biliverdina (BEALE; CORNEJO, 1991). Inicialmente, a heme oxigenase cliva o grupo heme para formar a biliverdina IX α , nos organismos fotossintéticos eucarióticos a fotocromobilina sintase converte a biliverdina IX α em fitocromobilina, sendo a ficobilina o produto final da biossíntese (SCHLUCHTER; GLAZER, 1999).

A extração de ficobiliproteínas de algas ocorre por combinação de diversos métodos físicos e químicos como sonicação, trituração, maceração utilizando nitrogênio líquido, fracionamento com sulfato de amônio e uso de tampões fosfatos em diversas concentrações (ROMAN *et al.*, 2002; GALLAND - IRMOULI *et al.*, 2000). Técnicas cromatográficas, como as cromatografias de troca iônica e exclusão molecular, são bastante utilizadas para isolar e obter as ficobiliproteínas com alto grau de pureza e rendimento (ROSSANO *et al.*, 2003, LIU *et al.*, 2005; GALLAND - IRMOULI *et al.*, 2000; MISHRA *et al.*, 2011).

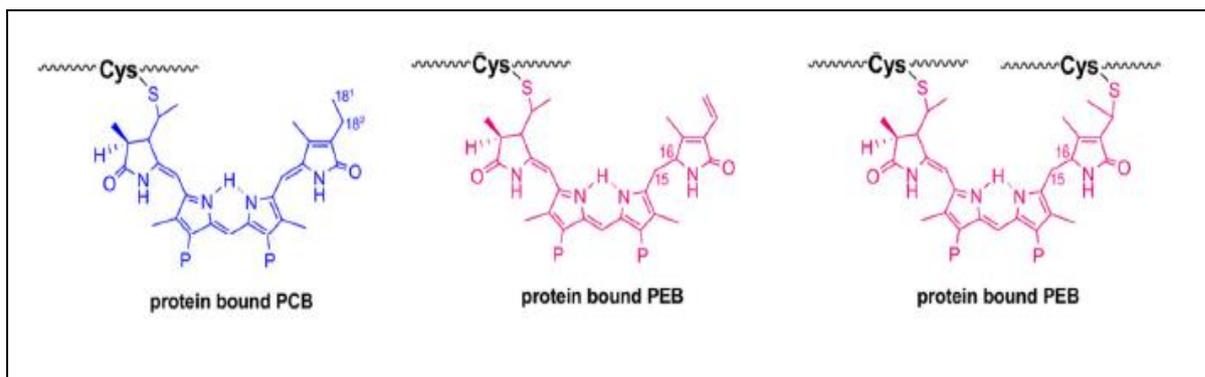
As ficoeritrinas das algas marinhas vermelhas *Griffithsia monilis*, *Portieria hornemannii* e *Palmaria palmata* foram purificadas em apenas um passo cromatográfico. As duas primeiras em cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) e a última através de eletroforese em sistema *Prep Cell* (Bio-Rad) (RITTER *et al.*, 1997; SENTHILKUMAR *et al.* 2013; GALLAND-IRMOULI, 2000).

1.3.3 Características estruturais

Estruturalmente, as ficobilinas (cromóforos) apresentam uma estrutura tetrapirrólica linear, ligadas covalentemente a resíduos de cisteínas da porção proteica das ficobiliproteínas (NELSON; COX, 2009). Essa ligação é do tipo tioéter (Figura 2), podendo envolver um único anel ou mais anéis da estrutura do cromóforo, como mostrado abaixo (SCHEER, ZHAO, 2008).

Em algas vermelhas e cianobactérias, as ficobiliproteínas são divididas geralmente em quatro grupos: ficocianina-PC (λ max = 610-625 nm), aloficocianina-APC (λ max = 650-660 nm), ficoeritrocianina-PEC (λ max = 560-600 nm) e ficoeritrina-PE (λ max = 490-570 nm) (ROWAN, 1989). Em cianobactérias cultivadas com baixa intensidade de luz, as ficobiliproteínas podem chegar a mais de 40% do total de proteínas produzidas (GLAZER, 1994).

Figura 2 - Estrutura das ficobilinas.



Fonte: Scheer e Zhao (2008). PCB (*phycocyanobilin*) e PEB (*phycoerythrobilin*).

As ficoeritrinas são as ficobiliproteínas mais abundantes nas algas vermelhas e algumas cianobactérias unicelulares (GLAZER, 1994). Elas são divididas em três subclasses com base nas propriedades espectroscópicas, classificadas de acordo com o espectro de absorção. São classificadas em C-ficoeritrina (λ max ~ 565 nm), B-ficoeritrina (λ max ~ 495 nm) e R-ficoeritrina (λ max ~ 540- 565 nm) (GLAZER, 1994; HILDITCH *et al.* 1991; GALLAND-IRMOULI, 2000).

No caso das algas marinhas vermelhas, B- e R- ficoeritrina são as ficobiliproteínas mais abundantes (GALLAND-IRMOULI, 2000). As R-ficoeritrinas são proteínas oligoméricas que possuem dois tipos de cromóforos denominados ficoeritrobilina

(*phycoerythrin*-PEB) e ficourobilina (*phycourobilin*-PUB) ligados as suas subunidades proteicas (SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.*, 2011).

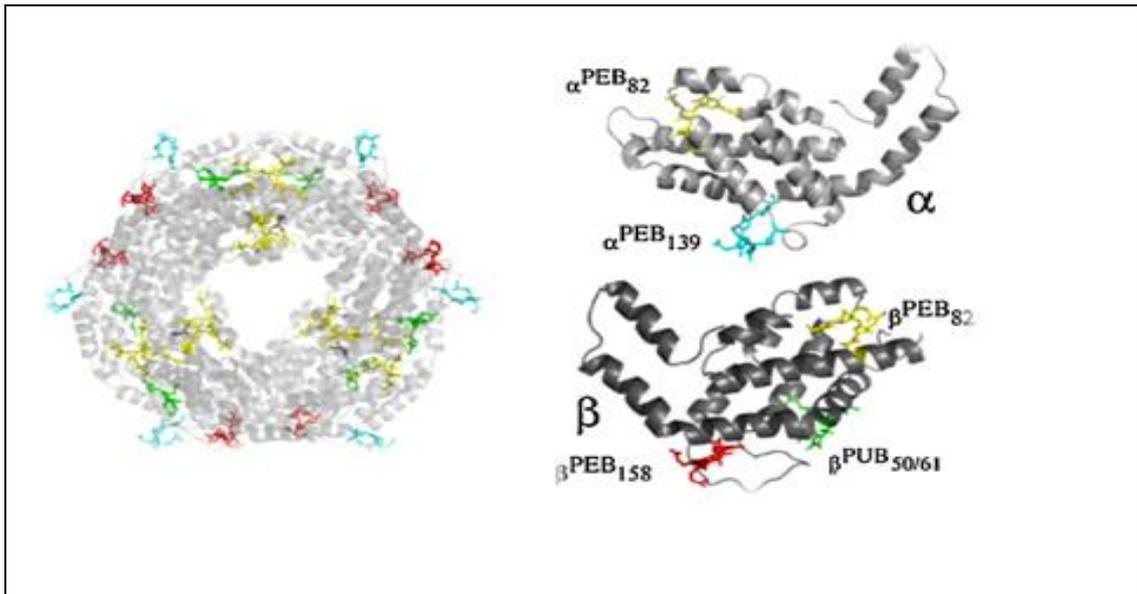
As ficobiliproteínas podem se associar de maneira complexa como trímero ($\alpha\beta$)₃, encontrado na estrutura da ficocianina purificada a partir da cianobactéria *Thermosynechoccus vulcanus*, ou hexâmeros ($\alpha\beta$)₆, formado a partir da R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis* (DAVID; MARX; ADIR, 2011; CONTRERAS-MARTEL *et al.*, 2001). Nas algas vermelhas existem ainda uma terceira subunidade denominada γ que está presente na estrutura do hexâmero, formando um complexo estável (YU *et al.*, 1981). Na alga marinha vermelha *Aglaothamnion neglectum* existem duas diferentes subunidades γ possuindo massa molecular aparente de 31 kDa e 33 kDa denominadas, respectivamente, de γ e γ' (APT; GROSSMAN, 1993). A alga *Rhodella violacea* apresenta também duas diferentes subunidades γ com massa molecular aparente de 30 kDa e 32 kDa (BERNARD *et al.*, 1996).

As cadeias α e β são codificadas pelo genoma do cloroplasto e a subunidade γ pelo genoma nuclear, sendo que a sequência de nucleotídeos desta última não apresenta nenhuma semelhança significativa com qualquer sequência conhecida nos bancos de dados (APT; GROSSMAN, 1993). Apesar do cloroplasto ter genoma próprio e sintetizar parte das próprias proteínas, a maioria de suas proteínas são codificadas pelo genoma nuclear, sendo sintetizadas no citoplasma e transportadas para o cloroplasto. Um bom exemplo desse processo é a enzima fotossintética rubisco que possui 16 subunidades, 8 grandes e 8 pequenas, sendo que as subunidades menores são codificadas pelo genoma nuclear (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os resíduos de cisteínas que realizam ligação covalente com os cromóforos (bilinas), possuem posição bastante conservada na estrutura primária das ficobiliproteínas sendo as posições α 84, α 139, β 50, β 61, β 82 e β 158 mais representativas quanto a conservação. Schirmer, Bode e Huber (1987) trabalhando com a resolução da estrutura tridimensional de C-ficocianina, relataram que o aminoácido aspartato também poderia interagir com o cromóforo, de maneira não covalente.

As ficoeritrinas possuem tanto ficoeritrobilina quanto ficourobilina, conferindo um grande espectro de absorção, podendo apresentar diversas interações com a estrutura polipeptídica (GLAZER, 1994). Cada subunidade α possui duas ficoeritrobilinas-PEB (α 82 e α 139), enquanto a subunidade β possui duas ficoeritrobilinas (β 82 e β 158) e uma ficourobilina- PUB (β 50 e β 61) como mostrado na Figura 3 (SEPÚLVEDA-UGARTE *et al.* 2011).

Figura 3 - Cromóforos ligados aos resíduos de cisteínas.



Fonte: modificado de Sepulveda-Ugarte *et al.* (2011).

Ainda em relação a conservação de resíduos de aminoácidos nos diversos organismos, foi demonstrado que as subunidades da ficocianina da alga vermelha unicelular *Rhodella violaceae* apresenta 85% e 83% de identidade com a cadeia alfa e beta, respectivamente, da alga vermelha unicelular *Porphyridium cruentum* (DRUCRET *et al.*, 1994; BERNARD *et al.*, 1992). A conservação das sequências de aminoácidos de ficocianina é elevada, com uma identidade de aminoácidos que varia 54% entre as cianobactérias e 84% entre B-e R-ficocianinas das sequências de algas vermelhas (ROELL; MORSE, 1993).

Nos bancos de dados é possível observar diversas ficobiliproteínas com estrutura primária determinada, grande parte representadas pelas algas vermelhas como mostrado na tabela seguinte.

Tabela 1 - Ficoeritrinas de algas vermelhas com sequências primárias determinadas.

Ficoeritrina (PHEA / PHEB)	Alga de origem	Referência
GASCO	<i>Gastroclonium coulteri</i>	(KLOTZ; GLAZER, 1985)
AGLNE	<i>Aglaothamnion neglectum</i>	(APT; GROSSMAN, 1993)
POLBO	<i>Polysiphonia boldii</i>	(ROELL; MORSEL, 1993)
PORPU	<i>Phorphyra purpúrea</i>	(REITH; MUNHOLLAND, 1995)
POLUR	<i>Polysiphonia urceolata</i>	(CHANG <i>et al.</i> , 1996)
GRIMO	<i>Griffithsia monilis</i>	(RITTER <i>et al.</i> , 1999)
GRACH	<i>Gracilaria chilensis</i>	(CONTERAS-MARTEL <i>et al.</i> , 2001)
GRIJA	<i>Griffithsia japônica</i>	(LIU; LEE; LEE, 2002)
COROI	<i>Corallina officinalis</i>	(ZHONG; WANG; WU, 2002)
PYRYE	<i>Porphyra yezoensis</i>	(KIM; FUJITA, 2006)
PORPP	<i>Porphyridium purpureum</i>	(LIN; WU; CHEN, 2010)

Fonte: UNIPROT (<http://www.uniprot.org>). PHEA (cadeia alfa de ficoeritrina) e PHEB (cadeia beta de ficoeritrina).

Apesar dos estudos sobre essas biomoléculas não serem recentes, ainda assim, a busca de novos conhecimentos sobre essa classe de proteínas demonstra ser imensamente interessante do ponto de vista científico. Montgomery *et al.* (2004) descreveu a AplA, uma ficobiliproteína purificada a partir de uma cianobactéria, a *Fremyella diplosiphon*, que apresentava uma extensão de 28 aminoácidos em sua estrutura primária, a qual identificou como uma nova classe de ficobiliproteínas, denominando-a de aloficianina-like. Essa ficobiliproteína, interessantemente, não foi encontrada nos ficobilissomos, sugerindo uma nova localização e função dessa molécula na célula.

1.3.4 Aplicações biotecnológicas

Diversos estudos mostram as aplicações biotecnológicas de ficobiliproteínas, muitas delas relacionadas as características espectroscópicas. As aplicações estendem-se desde a indústria farmacêutica até a alimentícia.

Na indústria de alimentos, as ficobiliproteínas podem ser utilizadas como corantes devido a algumas propriedades, dentre elas, pode-se destacar o fato de serem estáveis a baixa temperatura, em condições ácidas e básicas e, também, na presença de conservantes como o ácido cítrico (PATEL *et al.*, 2004; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). C-ficocianina e R-ficoeritrina podem ser utilizadas como pigmento natural em produtos lácteos fermentados, sorvetes, bebidas e sobremesas (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008). Essas propriedades de coloração também possuem grande aplicação na indústria cosmética. Além disso, as ficobiliproteínas podem ser utilizadas como substâncias antioxidantes. Esse papel foi estudado inicialmente a partir de algas marinhas exploradas no Japão, na busca de aditivos para alimentos que substituísse os sintéticos (ROCHA *et al.*, 2007).

Na área da saúde, pode-se destacar seu uso na terapia fotodinâmica (PDT), um tratamento bastante utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer. Nos Estados Unidos, Ásia e Europa, vários fotossensibilizadores foram aprovados para uso clínico. O descobrimento de novas ferramentas que possam ser utilizadas nessa terapia é importante, pois novos fotossensibilizadores podem melhorar as perspectivas para o uso da PDT, não somente no tratamento do câncer, mas também no tratamento de outras doenças (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003). As ficobiliproteínas podem ser utilizadas na terapia fotodinâmica devido a presença de cromóforos (2 PUB e 1 PEB) que, além de apresentarem um melhor efeito na terapia, apresentam baixa toxicidade quando comparada com produtos comumente usados nessa técnica. Sendo assim, as ficobiliproteínas são consideradas uma boa alternativa como agente fotossensibilizante (PAN *et al.*, 2013). Pan *et al.* (2013) verificou que a R-ficoeritrina de *Porphyra haitanensis* aliada a terapia fotodinâmica era, também, bastante eficiente no processo de apoptose celular. Quanto o seu papel antioxidante na área da saúde, sabe-se que os radicais livres derivados de hiperglicemia são considerados como o principal mediador das complicações diabéticas, com isso, uma C-ficoeritrina foi avaliada na redução desse tipo de complicação. Esse trabalho demonstrou que a proteína apresentava atividade antioxidante, através da redução dos danos oxidativos causados ao LDL (*low density lipoprotein*), que aumentava também o nível de açúcar no sangue (SONI; VISAVADIYA; MADAMWAR, 2009). Lissi *et al.* (2000) mostraram que as bilinas de uma ficocianina de

cianobactéria apresentavam uma atividade antioxidante semelhante a antioxidantes potentes, tais como as catequinas.

Em ratos, foi demonstrado que uma C-ficocianina atuou como agente protetor dos danos degenerativos, ocasionados nas doenças do mal de Parkinson e Alzheimer, através da diminuição da lesão em neurônios acometidos por estresse oxidativo (RIMBAU *et al.*, 1999).

Outra aplicação bastante importante observada para as ficobiliproteínas é sua interação com outras moléculas, dentre elas, as lectinas. Em trabalho realizado em 2009 por Pandey e colaboradores foi possível constatar a interação de uma ficocianina com a jacalina (lectina de *Artocarpus integrifolia*), possivelmente por interações hidrofóbicas independente do sítio de ligação a carboidratos. Komath, Kavitha e Swamy (2006) relataram que moléculas de origem porfirina poderiam interagir com lectinas. Estudos que mostram interação do tipo proteína-proteína são importantes, no caso das ficobiliproteínas que apresentam aplicação em terapia fotodinâmica é ainda mais relevante, pois o fato de interagir com uma lectina pode tornar essa ferramenta ainda mais potente (PANDEY *et al.*, 2009).

Em recente estudo, foi demonstrado a interação de uma ficobiliproteína com a β -secretase, uma enzima que catalisa a proteólise amiloide, a proteína precursora responsável pela formação de placas insolúveis durante a evolução do mal de Alzheimer. Essa interação demonstrou ser energeticamente mais favorável do que outras moléculas com ação inibidora da β -secretase. A ligação favorável entre as duas moléculas (ficobiliproteína e β -secretase) pode fornecer um mecanismo molecular importante na terapia contra o Alzheimer (SINGH *et al.*, 2014).

O fato das ficobiliproteínas apresentarem importância biológica e biotecnológica é inquestionável, podendo ser visto através do número de patentes gerados por diversos países, 297 patentes até 2008. A produção de patentes é representada principalmente pelo os Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa, sendo a capacidade de serem utilizadas como marcadores fluorescentes a mais representativa (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

Como base no exposto até o momento, o presente trabalho objetivou isolar, purificar e caracterizar a estrutural parcial de uma ficobiliproteína presente na alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* utilizando ferramentas de química de proteínas e de biologia molecular. Para tanto, os objetivos específicos detiveram-se ao isolamento da ficobiliproteína a partir do extrato proteico com auxílio de precipitação com sulfato de amônio, a purificação em matriz cromatográfica de troca iônica, determinação da pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida e caracterização parcial da sequência primária por sequenciamento de alguns

peptídeos por espectrometria de massas seguido do sequenciamento gênico pelo método terminador de cadeia desenvolvido por Sanger.

Adentrando no objeto de estudo do presente trabalho é importante ressaltar que o gênero *Hypnea* apresenta um total de 67 espécies amplamente distribuídas no ambiente marinho (GERALDINO *et al.*, 2010), mas até o momento não foi possível encontrar nos bancos de dados ficobiliproteínas extraídas e purificadas das algas marinhas pertencentes a esse gênero. Espécies de *Hypnea* são abundantes nos substratos rochosos da costa do Ceará sendo a alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* uma epífita pertencente a seguinte classificação taxonômica: Domínio: Eukaryota, Reino: Plantae, Filo: Rhodophyta, Classe: Florideophyceae, Ordem: Gigartinales, Família: Cystocloniaceae, Gênero: *Hypnea*, Espécie: *Hypnea musciformis*.

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Figura 4) pode ser encontrada próximo a estuários e recifes epifitando outras algas como as do gênero *Sargassum* (<<http://www.algaebase.org/search/species/detail/>> acesso em 03/01/2015).

Figura 4 – Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux.



Fonte: www.algaebase.org

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Purificação

2.1.1 Coleta da alga marinha

A alga marinha *Hypnea musciformis* foi coletada na praia do Pacheco, município de Caucaia, estado do Ceará, em substratos rochosos durante as marés de sizígia. A alga foi armazenada em sacos plásticos e transportada para o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade federal do Ceará. Após serem removidos da alga fauna e flora acompanhante, a alga foi lavada com água corrente, macerada em nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo até a obtenção de um fino pó que, foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

2.1.2 Extrato proteico e detecção da ficobiliproteína

A alga macerada foi submetida a extração proteica em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl na proporção de 1:4 (p/v) sob agitação constante por 4 horas a 4 °C. O material foi filtrado em tecido de nylon, centrifugado a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado de extrato proteico total, foi submetido a uma varredura de absorção (entre 200 e 700 nm) para a detecção de ficobiliproteínas utilizando o espectrofotômetro Ultraspec 2100 pro (GE Healthcare).

2.1.3 Fracionamento proteico

Após a detecção da ficobiliproteína, o extrato proteico total foi submetido ao fracionamento de proteínas com sulfato de amônio na fração 20-40%. O material foi deixado em repouso a temperatura ambiente e, após 4 horas, as proteínas precipitadas foram concentradas por centrifugação à 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dialisado exaustivamente contra água destilada, seguido de dialise contra tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.

2.1.4 Cromatografia de troca iônica

A fração proteica foi aplicada em matriz cromatográfica de troca DEAE-Sephacel previamente equilibrada com tampão 0,05 M de Tris-HCl pH 7,6. As proteínas não retidas foram eluídas da matriz com o mesmo tampão e a proteína retida, denominada HMp, foi eluída com gradiente “step wise” de concentrações crescentes de NaCl em 0,05 M de Tris-HCl pH 7,6 utilizando um fluxo de 2 mL.min⁻¹. As frações foram coletadas em volume de 2 mL e analisadas em espectrofotômetro a 280 nm e 565 nm.

2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A proteína isolada em matriz cromatográfica teve seu grau de pureza analisado e massa molecular aparente investigada através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE) na presença de β-mercaptoetanol, através do método descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de placas de vidro verticais (BIO-RAD System). Também foi realizada a eletroforese na ausência de SDS e β-mercaptoetanol para verificação da massa molecular aparente da proteína na sua forma nativa.

Para isso, o gel de empilhamento utilizado foi confeccionado com uma concentração de 4% de poliacrilamida em 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 e o gel de separação a uma concentração de 12% de poliacrilamida em 0,1 M de Tris-HCl pH 8,8. Os materiais analisados (proteínas eluídas da cromatografia) foram liofilizados e diluídos, separadamente, em tampão de amostra (0,08 M de Tris-HCl pH 6,8, contendo 5% de glicerol, 2% de SDS e 0,05% de azul de bromofenol) na concentração de 4:1 (p:v). Em seguida, foram adicionados 2 μL de β-mercaptoetanol e, posteriormente, a amostra foi aquecida e desnaturada à temperatura de 100 °C durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 5.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e 15 μL (60 μg de proteína) de cada amostra foram aplicados no gel PAGE-SDS. Para efeito comparativo, foi utilizado um marcador de massa molecular com proteínas conhecidas: fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). As placas da eletroforese foram submersas em tampão de corrida contendo 0,25 M de Tris-HCl, pH 8,8, contendo 1,92 M de glicina e 1% de SDS. A migração das proteínas foi através das seguintes condições: voltagem variando até 150 V, potência de 10 W e amperagem constante de 25 mA. Para o PAGE nativo, tanto o tampão de corrida quanto o de amostra não apresentaram SDS, e as amostras não foram aquecidas. Após o término da

corrida, a proteína foi revelada pelo método de coloração com a solução contendo 1% de azul brilhante de Coomassie R-250 em metanol, ácido acético e água, por um período de 12 horas. O descoramento foi realizado através da solução composta de 40% de etanol e 20% de ácido acético em água destilada.

2.2 Determinação da estrutura primária por espectrometria de massas

2.2.1 Digestão *in gel* e análise por espectrometria de massas

O protocolo de digestão das proteínas foi modificado a partir de Shevchenko *et al.* (2006). Para isso, bandas de proteínas com área de aproximadamente 1 mm x 1 mm foram excisadas do gel de poliacrilamida e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de água deionizada até posterior utilização. Em seguida, a água foi removida e o gel foi descorado com 200 μ L de acetonitrila a 50% contendo 0,1 M de bicarbonato de amônio, desidratado com 40 μ L de acetonitrila a 100% e seco em concentrador a vácuo (LABCONCO) por um período de 2 horas. Em seguida, a amostra foi reduzida com 40 μ L de 10 mM de dietiotreitol (DTT) e incubada a 56°C por 30 minutos. Para o processo de alquilação da amostra foi utilizado 40 μ L de 55 mM de iodoacetamida (IAA) à temperatura ambiente na ausência de luz por 20 minutos. Para a digestão da proteína, o gel foi reidratado com 50 mM de bicarbonato de amônio contendo tripsina (Promega) na proporção de 1:50 (peso/peso; enzima/substrato). A reação foi deixada por 16 horas a 37°C em termobloco. A reação de digestão foi interrompida com adição de 2% de ácido fórmico.

Os peptídeos obtidos da digestão com tripsina foram extraídos com uma solução contendo 5% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila durante 15 minutos sob agitação, sendo o processo repetido 3 vezes. Todo sobrenadante que continha os peptídeos foi acondicionado em um mesmo tubo de microcentrífuga, concentrados a vácuo e solubilizados em 25 μ L de 0,1% de ácido fórmico. Os peptídeos foram injetados em um sistema nanoAcquity (Water Corp) acoplado a uma fonte de ionização nano eletrospray (SYNAPT-HDMS-Waters Corp). A amostra foi aplicada em uma coluna de fase reversa C18 (75 μ m x 100 mm) e os peptídeos eluídos em um gradiente de 10% a 80% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

O espectrômetro de massas operou em modo positivo, com a temperatura da fonte a 90°C e voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (*Data Dependent Aquisition* – Aquisição Dependente de Dados), os íons precursores com carga entre 2+ e 4+ foram selecionados para análise de MS/MS e

fragmentados através de CID (*Collision Induced Dissociation* – Dissociação Induzida por Colisão). Os dados coletados foram processados e analisados pelos programas MassLynx v4.1 (Waters Corps). Os peptídeos obtidos foram comparados com sequências proteicas presentes nos bancos de dados utilizando os programas ProteinLynx (Waters Corps) e Mascot (Matrix Science). Os espectros de fragmentação foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq e comparados com proteínas presentes nos bancos de dados utilizando o programa MultiAlin (*Multiple Sequence Alignment*).

2.3 Determinação da estrutura primária pelo método terminador de cadeia (dideoxi)

2.3.1 Desenho dos primers senso e antisenso

Os iniciadores utilizados para o processo de amplificação foram desenhados com base no alinhamento das sequências de ficobiliproteínas similares através dos dados obtidos por espectrometria de massas e através de comparação com dados genômicos disponíveis no NCBI. Todos os iniciadores (*primers*) foram analisados pelo programa OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) no qual foram calculadas as temperaturas de *melting* (T_m), investigadas a formação de dímeros e grampos entre os *primers*. A síntese dos *primers* foi feita pela IDT (Integrated DNA Technologies).

2.3.2 Isolamento e purificação do DNA genômico

Para este procedimento, a alga coletada foi armazenada em freezer – 80 °C. Para extração e isolamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi utilizado o talo da alga macerado em nitrogênio líquido e o método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas alterações. Inicialmente, 100 mg do fino pó da alga transferido para um tubo de microcentrífuga estéril, livres de DNase e RNase, contendo 1,5 mL de tampão de extração CTAB (0,1 M de Tris pH 8, 0; 2% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,02 M de EDTA e 0,2% de 2-mercaptoetanol) e 1% de PVP (polivinilpirrolidona) pré-aquecido a 60°C. Para a extração do DNA, o material permaneceu em incubação por 1 hora a 60 °C, sendo homogeneizada a cada 10 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado e o sobrenadante transferido para um novo tubo, seguido da adição de 1 volume da solução de clorofórmio com álcool isoamílico (25:1, v/v), no qual permaneceu em agitação

por 5 minutos. O material foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo, em seguida, adicionado 0,3 volumes de isopropanol, misturado por inversão e incubada por 20 minutos em gelo.

A mistura foi centrifugada $10.000 \times g$ por 10 minutos para promover a precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de 70% de etanol. O DNA foi recolhido, transferido para um tubo de microcentrífuga e submetido a uma nova centrifugação ($10.000 \times g$ por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto à temperatura ambiente até a evaporação completa do álcool. O DNA isolado foi ressuspenso em $70 \mu\text{L}$ de água ultrapura estéril e estocado em geladeira a 4°C até posterior utilização. A integridade do DNA foi avaliada através da quantificação das relações de absorvância $A_{260}/_{280}$ e $A_{260}/_{230}$ que indicam possíveis contaminações com proteínas e carboidratos, respectivamente utilizando espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare). Ainda em relação a integridade e pureza do DNA extraído foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% contendo $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio (EtBr) como método de revelação do DNA. A corrida eletroforética foi submetida a uma voltagem constante de 100 V. O gel foi submerso em tampão de corrida TBE (0,08 Tris-Borato, pH 8,8 contendo 0,002 M de EDTA). O DNA foi visualizado através de exposição do gel à iluminação ultravioleta, utilizando um transluminador *Hoefer Macrovue* UVis-20 (Amersham Biosciences).

2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da cadeia β (gene *bhmp*)

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um microtubo estéril de 0,2 mL contendo 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, tampão da enzima, iniciadores gene específicos (sendo e antisenso), 25 mM de MgCl_2 , DNA genômico da alga, dNTP Mix e água. Foi realizado também um controle negativo, uma reação na ausência do DNA genômico. O volume final da reação foi de $25 \mu\text{L}$. A reação de amplificação ocorreu em um termociclador (Eppendorf). A programação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C , seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento) e 90 segundos a 72°C (extensão). Após o término do último ciclo, realizou-se uma última fase de extensão prolongada (72°C por 5 min). Após a fase de extensão, a reação permaneceu a 4°C antes de ser analisada. O produto da reação foi quantificado e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de marcador de DNA e revelado com brometo de etídeo.

2.3.4 Excisão em gel e purificação do produto da PCR

A banda visível no gel de agarose, denominada *bhmp*, foi excisada com auxílio de uma lâmina, transferida para um tubo de microcentrífuga e submetida a purificação do gel. Esse procedimento foi realizado com auxílio do kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Invitrogen™/ Life Technologies). A banda foi misturada ao tampão L3 (solubilização) na proporção de 1:3 (p/v) e aquecida por 10 minutos a 50°C. Posteriormente, o material foi aplicado em uma coluna fornecida pelo kit e centrifugado a 12.000 *x g* por 1 minuto a 4°C. O material eluído foi descartado e, na coluna foi aplicado 500 µL do tampão W1 (lavagem). A coluna foi novamente submetida a centrifugação a 12.000 *x g* por 1 minuto a 4°C e o material eluído descartado. Para eluição do produto de PCR, foi adicionado 30 µL de água estéril na coluna e a mesma submetida a nova centrifugação 16.000 *x g* por 1 minuto a 4°C. O material eluído foi quantificado e armazenado a – 20° C até posterior utilização.

2.3.5 Clonagem molecular do gene *bhmp* em vetor plasmidial

O produto purificado do gel de agarose foi clonado ao vetor plasmidial pGEM-T *Easy Vector* (Promega, USA). A reação de clonagem seguiu o protocolo fornecido pelo fabricante. Assim, o inserto foi ligado na região de inserção do sítio múltiplo de clonagem do tipo T/A. O cálculo da razão inserto: vetor foi realizado através da fórmula fornecida pelo manual do fabricante, sendo a razão de 10:1 (inserto:vetor) aplicada na fórmula seguinte:

$$\frac{[\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)}] \times \text{razão}}{\text{tamanho do vetor (pb)}} = \text{inserto (ng)}$$

Para a reação de ligação, foi utilizado 25 ng do vetor de clonagem com tamanho de 3.000 pb, 20,8 ng de inserto e a enzima T4 ligase. A reação de ligação foi incubada a 4°C por um período de 16 horas.

2.3.6 Transformação bacteriana

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação bacteriana da cepa DH5α da bactéria *Escherichia coli* através do método de choque térmico. Para a transformação, foi utilizado 200 µL de 0,1 M de CaCl₂, uma colônia de *E. coli* DH5α crescida

em meio LB ágar sólido e o produto da reação de ligação. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos, seguido de um choque térmico a 42°C por 90 segundos e novamente em banho de gelo por 2 minutos. Após esse processo, as células foram transferidas para um tubo de 15 mL contendo 800 µL de meio SOC (2% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,05 % de 2,5 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose) pré-aquecido a 37°C, sendo incubadas por 2 horas a 37°C com agitação de 200 rpm. Com o auxílio da alça de *Drigalsk*, 200 µL do meio contendo as células transformadas foram plaqueadas em meio SOB ágar na presença de ampicilina (100 µg/mL), 0,5 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) e X-GAL (40 µg/mL). As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. Após esse período, foi possível visualizar as colônias brancas, consideradas transformadas. Cada colônia foi crescida em 5 mL de meio LB Broth contendo 5 µL de ampicilina (100 µg/mL), permanecendo em agitação a 37 °C por 16 horas.

2.3.7 Purificação do DNA plasmidial

Os clones obtidos a partir da transformação bacteriana foram submetidos a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit comercial *AxyPrep Plasmid Miniprep kit* (Axygen biosciences), com algumas modificações.

A cultura crescida em meio LB Broth foi centrifugada em um tubo de microcentrífuga a 4.000 x g por 3 minutos a 4 °C para precipitação das células transformadas. O precipitado foi ressuspendido em 250 µL de tampão S1 (tampão de equilíbrio) e homogeneizado em agitador. Em seguida, foram adicionados 250 µL do tampão S2 (tampão de lise) e misturado por inversão. Na solução, foram adicionados 350 µL do tampão S3 (tampão de neutralização), misturado por inversão e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos e a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna miniprep, centrifugado a 12.000 x g por 1 minuto a 4°C e o material eluído foi descartado. Na coluna foi adicionado 700 µL de tampão W2 (tampão de lavagem), seguido de centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto a 4°C e o material eluído foi descartado novamente. A coluna foi transferida para um novo microtubo (tubo de eluição), adicionado 40 µL de água ultrapura que permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos. Os plasmídeos foram eluídos da coluna por centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto a 4°C, quantificados por espectrofotometria e armazenados a – 20°C até posterior utilização.

A confirmação da transformação foi feita através da reação de digestão utilizando 1 µL dos plasmídeos purificados, 2 unidades da enzima de restrição EcoRI e tampão de

reação. A digestão foi incubada por 3 horas a 37 °C e o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de um marcador de DNA. As amostras referentes aos clones positivos, que apresentaram a banda referente ao inserto, foram submetidas a reação de sequenciamento.

2.3.8 Sequenciamento dos genes *bhmp* pelo método terminador de cadeia

Os plasmídeos recombinantes foram submetidos a reação de sequenciamento pelo método de Sanger também conhecido como método terminador de cadeia. Para isso, foi utilizado o sequenciador automático MegaBACE (GE Healthcare). A reação de sequenciamento foi feita utilizando o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare) contendo nucleotídeos modificados (ddG, ddA, ddT e ddC) pela ligação de marcadores fluorescentes. A reação de sequenciamento consistiu de uma reação de PCR que utilizou 0,2 pmol de DNA plasmidial, 5 pmol de cada primer (SP6 e T7), água e reagente de sequenciamento pré-mix constituído de dNTPs, ddNTPs, DNA polimerase termoestável. A reação procedeu-se através de 25 ciclos de desnaturação (95°C, por 20 segundos), anelamento (50°C, por 15 segundos) e extensão (60°C, por 60 segundos). Ao final da reação, foram adicionados 2 uL de tampão acetato de sódio/EDTA, seguido de 80 uL de 95% de etanol e o material foi centrifugado para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 70% de etanol e deixado a temperatura ambiente até total evaporação do etanol. Posteriormente, ao precipitado foram adicionados 10 uL de solução MegaBACE solution e em seguida, o material foi misturado em vortex por 20 segundos e injetado no sequenciador. Os dados brutos das sequências gerados foram analisadas pelo programa Phred-Phrap-Consed (EWING *et al.*, 1998). A tradução foi feita utilizando a ferramenta do EXPASY e Vivo Colostate. A comparação das sequências foi feita utilizando dados do NCBI e CLUSTAL W2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

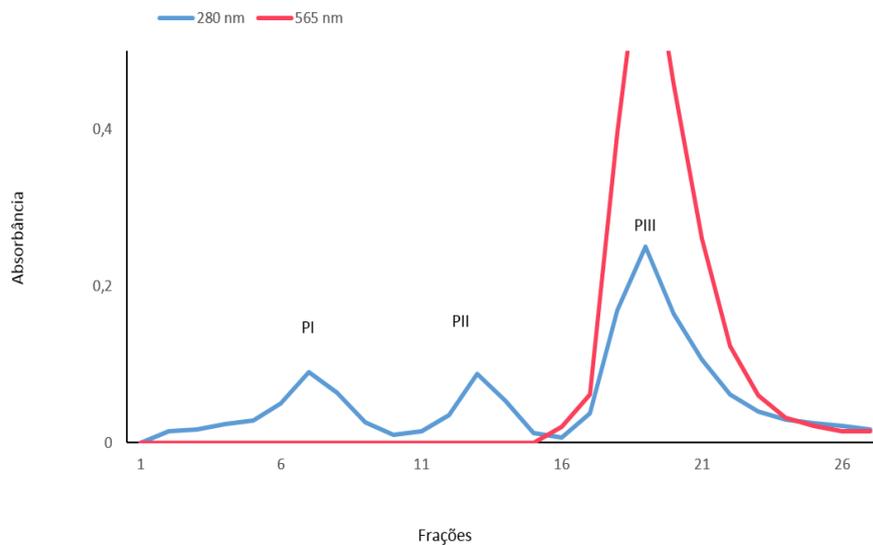
3.1 Purificação da ficobiliproteína

O extrato proteico total foi utilizado para a realização de uma varredura espectral resultando em um pico acentuado a 280 nm, correspondente a parte proteica, e outro pico a 565 nm, correspondendo ao grupo bilina de uma R-ficoeritrina. Com base nesse resultado, esse comprimento de onda foi utilizado para monitorar a purificação da ficobiliproteína durante a etapa cromatográfica.

Assim, a fração resultante do fracionamento proteico por sulfato de amônio foi aplicada em matriz de DEAE-Sephacel e a ficobiliproteína da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* foi purificada em apenas um passo cromatográfico. Algumas ficobiliproteínas também foram purificadas de maneira semelhante, utilizando apenas um passo cromatográfico, dentre elas, as pertencentes as algas marinhas vermelhas *Griffithsia monilis*, *Portieria hornemannii* e *Palmaria palmata*, as duas primeiras utilizaram cromatografia em coluna de troca iônica (Q-Sepharose) e a última utilizou eletroforese em sistema *Prep Cell* (Bio-Rad) (RITTER *et al.*, 1997; SENTHILKUMAR *et al.* 2013; GALLAND-IRMOULI, 2000). A metodologia de purificação realizada com a alga marinha *Portieria hornemannii* é bastante semelhante a que foi utilizada para a ficoeritrina de *H. musciformis*, pois foi feita em coluna de troca iônica e a eluição em forma de *step wise* com concentrações de NaCl variando entre 25 mM a 200 mM.

Durante a eluição do pico retido da ficoeritrina de *Hypnea musciformis* foi possível observar a presença do pigmento e seu monitoramento foi feito a 565 nm (Figura 5). Picos de absorvância a 565 nm são observados em ficobiliproteínas pertencentes a classe de R-ficoeritrinas. Como exemplos, podemos citar as R-ficoeritrinas de *Heterosiphonia japônica*, *Gracilaria verrucosa*, *Palmaria palmata* e *Polysiphonia urceolata* (SUN *et al.*, 2009; WANG, 2002; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; NIU, WANG, TSENG, 2006). A relação de absorvância A_{565}/A_{280} é considerada uma boa indicação do nível de purificação de ficobiliproteínas, que aumenta ao decorrer dos passos de purificação. Essa relação foi observada para R-ficoeritrina de *Palmaria palmata*, que inicialmente apresentava uma relação de 0,5 correspondente ao extrato total na presença de diversas impurezas e 3,2 após a cromatografia (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). No caso da ficobiliproteína de *Hypnea musciformis* essa relação foi de 2,82, sendo que esse valor pode variar entre as diferentes espécies de algas.

Figura 5 - Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sephacel.



Cromatografia em matriz de DEAE Sephacel. O tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 foi utilizado para equilibrar a matriz e eluir as proteínas não retidas no gel (PI). As proteínas retidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl (PII) e, posteriormente, a proteína pigmentada foi eluída com Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,5 M de NaCl (PIII). A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas. Em azul estão as proteínas monitoradas a 280 nm e em vermelho o monitoramento realizado a 565 nm.

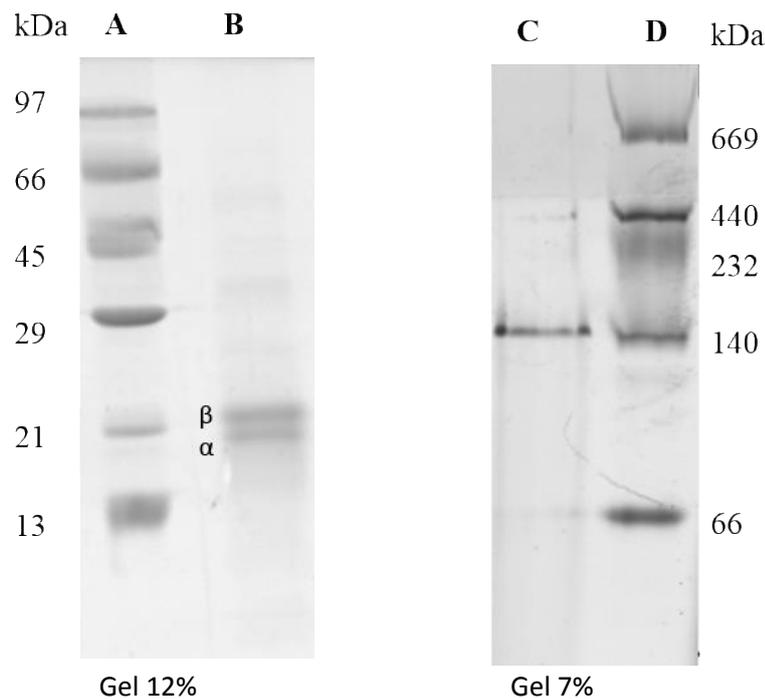
Essas moléculas são interessantes do ponto de vista econômico, no entanto, seu uso tem sido limitado pelas técnicas empregadas para sua purificação que muitas vezes tornam-se dispendiosas. Além disso, a purificação pode ser prejudicada pela presença de grandes quantidades de polissacarídeos nas algas (NIU, WANG, TSENG, 2006). Métodos de extração e purificação tornam-se eficientes quando são simples e rápidos.

No gel de poliacrilamida em condições desnaturantes é possível observar as cadeias alfa e beta bem definidas no gel com massa molecular aparente de 20 e 22 kDa, respectivamente (Figura 6). A cadeia alfa pode variar entre 16 e 20 kDa, enquanto a beta varia entre 18 e 22 kDa aproximadamente (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013; ROMAN *et al.*, 2002; GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000; BENEDETTI *et al.*, 2006). Como já relatado anteriormente, essas cadeias podem se oligomerizar nas formas $(\alpha\beta)_3$ e na forma $(\alpha_2\beta_2)_3\gamma$ quando a terceira cadeia, denominada gama, está presente. A cadeia gama pode ser identificada por eletroforese ou características espectroscópicas e, quando presente, possibilita a conexão das duas formas triméricas em hexaméricas $(\alpha\beta)_3-\gamma-(\alpha\beta)_3$, permanecendo no cavidade central do hexâmero (CHANG *et al.*, 1996).

No gel em condições nativas é possível observar a presença de uma única banda de proteína, comprovando a homogeneidade da ficobiliproteína (Figura 6). Em comparação

aos marcadores de peso molecular, pode-se estimar que essa molécula apresenta aproximadamente 140 kDa na sua conformação nativa. Esse dado de massa aparente corrobora para que, muito possivelmente, a proteína purificada apresente-se na sua forma trimérica, além disso, no SDS-PAGE não foi possível visualizar a cadeia gama, ausente na alga em estudo. Ficobiliproteínas, em especial R-ficoeritrinas de algas vermelhas, apresentam massa molecular em torno de 240 kDa, devido a forma hexamérica que as cadeias se encontram (GALLAND-IRMOULI *et al.*, 2000). Um fato importante que deve ser ressaltado é que tais moléculas podem apresentar forma dimérica, trimérica e hexamérica (DUERRING; SCHMIDT; HUBER, 1991; PATEL *et al.* 2005). Ficobiliproteínas, podem ainda formar heterodímero, como a purificada a partir da alga vermelha *Corallina elongata*, onde o autor verificou a presença no gel de uma banda de 55 kDa correspondente a α/β (ROSSANO *et al.*, 2003).

Figura 6 - SDS-PAGE 12% e PAGE 7,5% da ficobiliproteína de *Hypnea musciformis*.



SDS-PAGE 12% e PAGE 7,5%. Foram aplicados 60 μ g de proteína em cada poço. Linha A: marcador de massa molecular em daltons (fosforilase B 97.000, BSA 66.000, ovoalbumina 45.000, anidrase carbônica 29.000, ovomucóide 21.000 e ribonuclease 13.700); Linha B: ficobiliproteína na presença de SDS mostrando a cadeia alfa e beta; Linha C: ficobiliproteína na conformação nativa; Linha D: marcador de alto peso molecular em daltons (tiroglobulina 669.000, ferritina 440.000, catalase 232.000, lactato desidrogenase 140.000, BSA 66.000).

Essas características heterogêneas de ficobiliproteínas em SDS-PAGE foram comprovadas, recentemente, por Zhao *et al.* (2013) com a ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata*, que formavam agregados de $\alpha\beta$ e $\beta\gamma$. Essas interações acontecem mesmo em amostras tratadas com uréia e SDS. A exposição a luz também interfere nesses agregados, onde o aumento do tempo de exposição ajuda nas interações das subunidades. A ficobilina PUB parece estar relacionada a formação desses heterodímeros. Esses estudos mostram a diversidade de conformações assumidas pelas subunidades de ficoeritrinas, justificando o fato de que a ficoeritrina de *H. musciformis* se comporta de forma incomum a maioria das ficoeritrinas de algas vermelhas, ou seja, apresenta-se na forma trimérica ao invés de hexamérica em gel nativo. Essa característica, pode estar associada a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Na superfície dos ficobilissomos, a ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata* comporta-se de três formas diferentes, formando hexâmero com subunidade γ , hexâmero com subunidade γ' e na forma trimérica sem a subunidade γ (ZHAO *et al.*, 2014).

3.2 Análise dos peptídeos por espectrometria de massas

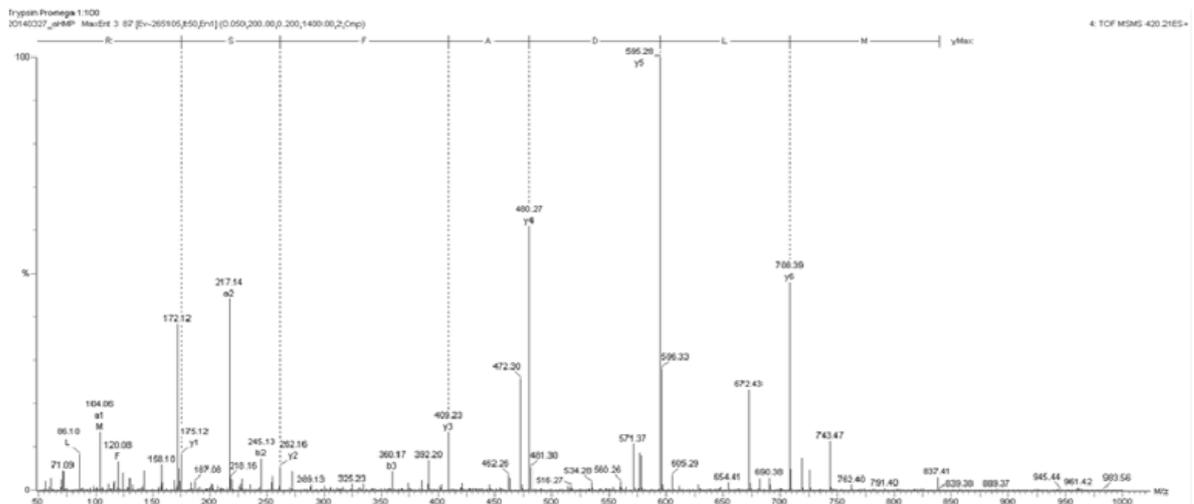
As bandas referentes as duas cadeias (alfa e beta) foram excisadas do gel de poliacrilamida em SDS-PAGE, digeridas com tripsina e o produto da digestão teve sua massa analisada e fragmentado em um espectrômetro de massas. Os espectros de MS/MS foram comparados com outras proteínas através da ferramenta MASCOT, apresentando similaridade com as sequências de aminoácidos das ficoeritrinas das rodófitas *Aglaothamnion neglectum* e *Griffithsia monilis*. A ficobiliproteína purificada de *Aglaothamnion neglectum*, por exemplo, possui cadeia α com 163 aminoácidos (UniProt P28559) e a cadeia β com 176 aminoácidos (Uniprot P28560), sendo as bilinas ligadas de forma covalente aos resíduos cisteínas Cys82 e Cys139 na cadeia α , Cys50, Cys61, Cys82 e Cys158 na cadeia β . A digestão realizada com a enzima tripsina originou 9 peptídeos de variados tamanhos pertencentes as cadeias alfa e beta. Na Tabela 2 encontra-se as sequências de aminoácidos dos peptídeos trípticos que foram determinados por MS/MS.

Tabela 2 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos de HMP oriundos da digestão com tripsina.

Peptídeo HMP	Massa observada	Massa calculada	Sequência	Δ (Da)
Cadeia alfa				
T1	1207,605	1207,6084	ALSDNYEAVVK	0
T2	948,4095	948,4124	DIDHYMR	0
T3	1762,903	1762,8274	FPSSSDLESVQGNLQR	-0,07
T4	1464,7244	1464,7096	LLNYSLVTGGR	-0,06
T5	1282,6501	1282,6023	GPLDCWAIAGAR	-0,02
Cadeia beta				
T6	838,3948	838,4007	MLDASFR	0,01
T7	1060,525	1060,54	AAYVGGSDLEDLKK	0,02
T8	1235,5852	1235,5718	LAPGGQCYTNR	-0,01
T9	677,3654	677,3782	SVTIMK	0,01

Os peptídeos T, corresponde ao tratamento com a enzima tripsina.

A interpretação dos espectros de fragmentação foi realizada manualmente (sequenciamento *de novo*). A Figura 7 ilustra o espectro MS/MS do peptídeo T6.

Figura 7 - Sequenciamento *de novo*.

Espectro MS/MS produzidos por CID do íon duplamente carregado com m/z 838,39 cuja série de ions -y foi utilizada para a determinação da sequência de aminoácidos.

A sequência de aminoácidos do peptídeo T6 foi submetida a uma busca por homologia de sequência com outras proteínas nos bancos de dados do NCBI utilizando o programa BLASTp (*protein blast*). A sequência desse peptídeo correspondeu a 100% de identidade com o N-terminal de diversas ficoeritrinas de algas vermelhas, podendo, assim, ser utilizado para o desenho do iniciador específico senso (*forward*) para a amplificação do gene *bhmp*. A Tabela 3 destaca algumas dessas ficoeritrinas. O peptídeo AAYVGGSDLEDLKK, apresentou no máximo uma identidade de 86% com as ficoeritrinas de algas vermelhas.

Tabela 3 - Análise da identidade dos peptídeos sequenciados da cadeia beta com proteínas conhecidas utilizando a ferramenta BLAST.

Cadeia beta (peptídeos)	
Identidade	Espécie
MLDAFSR	
100%	<i>Griffithsia monilis</i>
100%	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>
100%	<i>Porphyra haitanensis</i>
100%	<i>Rhodella violácea</i>
AAYVGGSDLEDLKK	
86%	<i>Pyropia kanakaensis</i>
85%	<i>Griffithsia monilis</i>
79%	<i>Cryptomonas sp</i>
79%	<i>Pyropia perforata</i>
LAPGGNCYTN	
100%	<i>Polysiphonia urceolata</i>
100%	<i>Callithamnion corymbosum</i>
100%	<i>Aglaothamnion hookeri</i>
100%	<i>Ptilota gunneri</i>

As propriedades de uma determinada proteína estão totalmente relacionadas a sua estrutura primária, uma vez que ela define a estrutura secundária e terciária e, conseqüentemente, sua função biológica.

Dentre as ficoeritrinas que apresentaram identidade com a análise da sequência da HMP está a pertencente a alga marinha *Porphyra haitanensis*, uma R-ficoeritrina que apresentou efeito antitumoral através da expressão de genes envolvidos em apoptose, além de apresentar aumento da imunidade e da secreção de TNF- α , podendo a R-PE ser uma droga potencial na prevenção do câncer (PAN *et al.*, 2013).

3.3 Determinação da estrutura primária pelo método terminador de cadeia

A extração do DNA total a partir de 100 mg do talo da alga marinha pelo método CTAB resultou em uma solução contendo 28 ng/ μ L de DNA. A Figura 8 mostra a qualidade do DNA em gel de agarose 1%. Esse método tem a capacidade de extrair o DNA nuclear, mitocondrial e cloroplastidial (LUTZ *et al.*, 2011).

Figura 8 - DNA genômico da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.



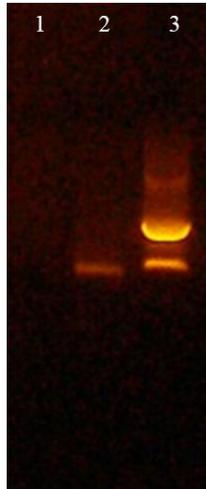
Poços 1 e 2- DNA genômico da alga marinha *Hypnea musciformis*.

Na literatura existem diferentes métodos utilizados para isolar e purificar o DNA genômico de algas vermelhas. Os métodos caseiros tem sido os mais utilizados como foi feito para isolar o DNA genômico de algas vermelhas dos gêneros *Griffithsia*, *Gracilaria*, *Chondria*, *Gelidium*, *Phorphyra*, *Ceramium* e outros. Os trabalhos mostraram que os polissacarídeos têm sido um grande obstáculo para se isolar o DNA genômico de algas vermelhas e que a qualidade do DNA isolado reflete nos experimentos posteriores. Dessa forma, métodos caros e demorados como cloreto de lítio e ultracentrifugação têm sido utilizados para aumentar a pureza do material. Para *H. musciformis* o método do CTAB foi rápido, barato e de grande sucesso quanto a pureza e rentabilidade.

Após a extração do DNA, foi realizado a PCR para amplificação do gene de interesse utilizando iniciadores específicos. Foi possível obter a amplificação de um único fragmento correspondente ao gene da ficoeritrina de *H. musciformis* (Figura 9). Nenhuma banda apareceu na PCR do controle negativo, mostrando a eficácia da amplificação e as boas condições dos iniciadores utilizados.

Antes de serem submetidos a sequência pelo método do dideoxi, os clones foram avaliados para verificar a presença do inserto.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR do gene de interesse.



1- PCR do controle negativo; 2- PCR do gene de interesse da cadeia beta; 3- Marcador 870 pb e 500 pb.

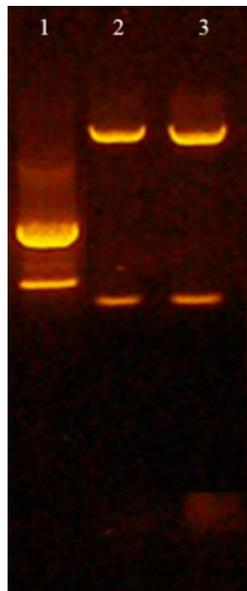
A estratégia da PCR é comum para se isolar genes que sequenciados são utilizados para caracteriza-los. A caracterização e tradução dos genes das subunidades alfa e beta da ficoeritrina da alga vermelha *Rhodella violacea* mostrou sua forte homologia com cianobactérias e outras rodófitas. Em *Polysiphonia boldii*, além dos genes de ficoeritrina (cadeia alfa e beta), os operons desses genes foram clonado e seus nucleotídeos sequenciados. Os genes que codificam as cadeias α e β de aloficocianinas, ficocianinas e ficoeritrinas da alga vermelha *Aglaothamnion neglectum* foram isolados e caracterizados. A sequência dos aminoácidos dessas ficobiliproteínas da alga *A. neglectum* foram deduzidas a partir da sequência de nucleotídeos e mostraram 65-85% de identidade com proteínas análogas em outras algas vermelhas e cianobactérias.

Os clones transformados foram confirmados através da digestão do plasmídeo pGEM-T-*easy* com a enzima de restrição EcoRI (Figura 10). Um total de 7 clones foram selecionados e sequenciados pelo método do dideoxi. As leituras foram analisadas pelo programa Phred-Phrap-Consed e resultou na formação de uma *contig*. A tradução da *contig* por bioinformática resultou em uma sequência de 87 aminoácidos que foi comparada com os peptídeos sequenciados por MS/MS e com outras proteínas presentes nos bancos de dados através da ferramenta BLAST.

Os clones analisados pelo método do dideoxi resultaram em uma sequência que corresponde a aproximadamente 50% da estrutura primária das cadeias beta de ficoeritrinas

encontradas nos bancos de dados. Os peptídeos sequenciados por MS/MS foram correspondentes aos resultados obtidos por análise do método do dideoxi.

Figura 10 - Produto da digestão utilizando EcoRI.



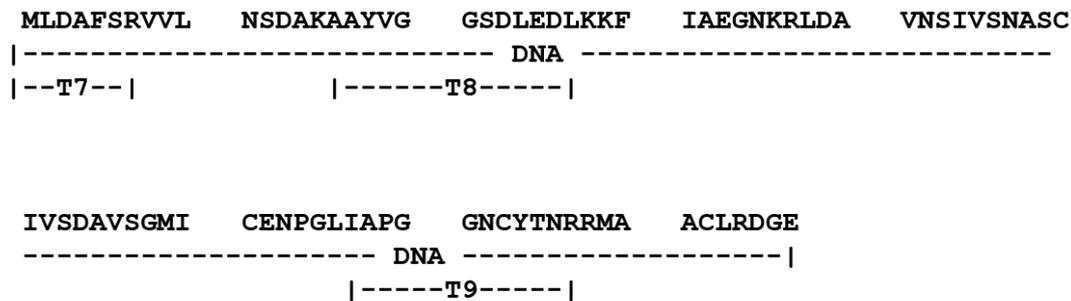
Poço 1- Marcador 500 e 870 pb; Poço 2 e 3- digestão dos plasmídeos recombinantes.

As ficobiliproteínas e os tipos de ficobilinas podem variar entre as diversas espécies, mas o sítio de ligação, ou seja, as posições das cisteínas as quais esses cromóforos se ligam são bastante conservadas na estrutura primária dessas moléculas (ISAILOVIC *et al.*, 2004, NIU *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2013). Na estrutura primária parcial da HMP é possível observar as cisteínas em posições conservadas em β 50, β 61 e β 82, onde pode se ligar, os cromóforos, como por exemplo, PUB, PUB e PEB nas ficoeritrinas. O tipo de cromóforo não foi investigado neste trabalho. Os resultados obtidos a partir da sequencia parcial de HMP são corroborados com os dados presentes na literatura no que diz respeito a conservação dos resíduos de cisteína, presença de subunidades alfa e beta e massa molecular aparente das subunidades proteicas. A literatura mostra que o cromóforo PUB apresenta dois sítios de ligação, envolvendo dois anéis da sua estrutura, com as cisteínas na posição 50 e 61. Essa interação é importante para a conformação estrutural das ficobiliproteínas. As propriedades fotofísicas das ficobiliproteínas na forma nativa, tornam essas moléculas excelentes fotorreceptores. As adaptações moleculares para atingir essas características fotorreceptoras ainda estão parcialmente compreendidas, mas envolvem extensivas interações da proteína com o cromóforo pelo qual podem sofrer modulações (SHEER; ZHAO, 2008).

Através do método terminador de cadeia foi possível obter uma sequência parcial (Figura 11) correspondente aos peptídeos sequenciados por MS/MS.

O espectrômetro de massa não distingue aminoácidos isobáricos, como leucina e isoleucina, tornando a análise por biologia molecular muito importante nesse aspecto.

Figura 11 - Sequência parcial obtida da cadeia beta da ficoeritrina de *Hypnea musciformis*.



A estrutura primária parcial foi obtida por combinação de sobreposição de sequências de peptídeos trípticos (T) e da sequência de aminoácidos traduzidas da *contig* do DNA da cadeia beta da ficoeritrina (HMP).

Quando submetida a ferramenta BLASTn, que utiliza as sequências de nucleotídeos e compara com as proteínas dos bancos de dados, foi possível verificar que a HMP pertence a superfamília das globinas.

3.4 Análise por bioinformática

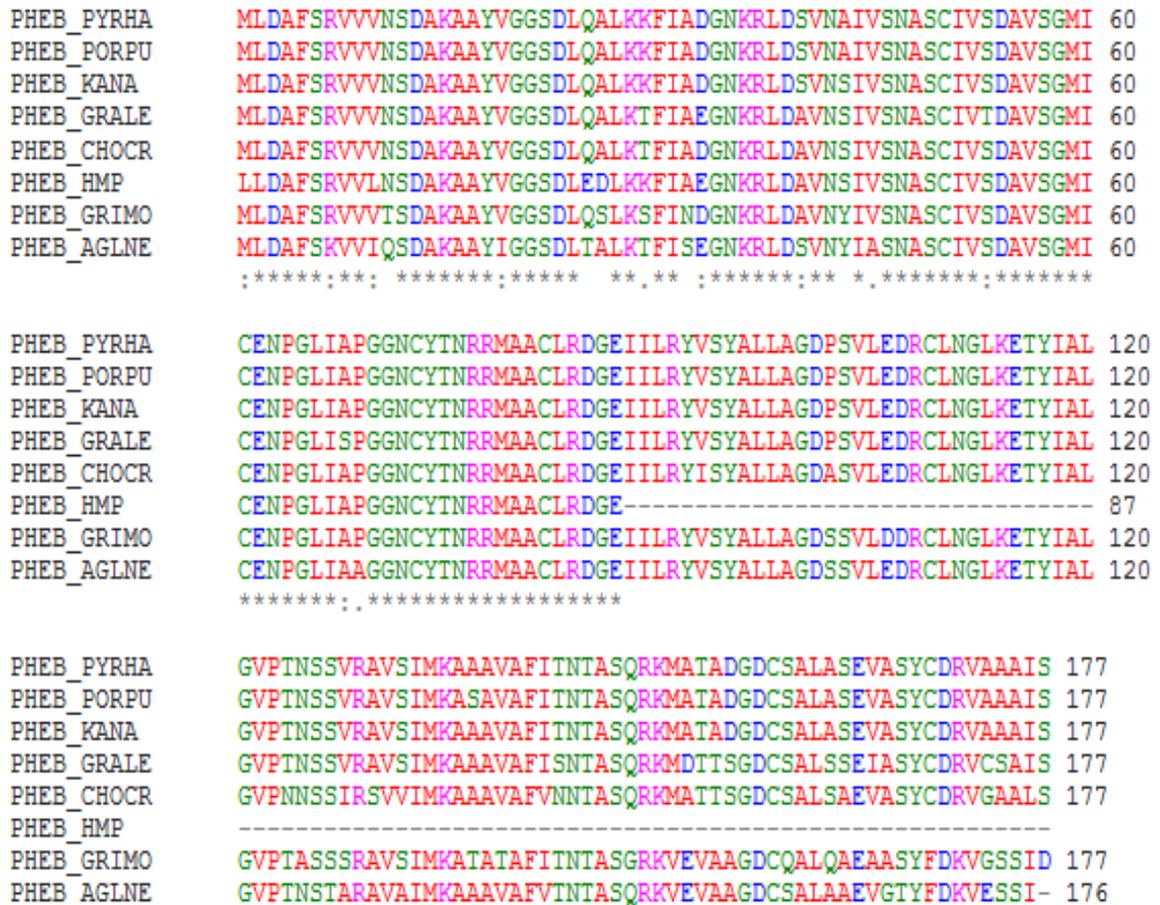
Para fazer a análise das diversas sequências, utilizou-se o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), que permitiu o alinhamento de sequências de aminoácidos através de alinhamentos múltiplos. Este programa calculou o melhor alinhamento para as sequências selecionadas, e mostrou as identidades, similaridades e diferenças obtidas.

Até o momento, o único estudo que avaliou a presença de ficobiliproteínas em *Hypnea*, foi realizado por Senthilkumar *et al.* (2013), em que este deteve-se apenas a quantificação dessas biomoléculas, sendo demonstrado que a quantidade de R-ficoeritrina era de 0,416 mg/g de alga fresca na espécie *Hypnea esperi*. No presente estudo, foi realizada a purificação e a análise da sequência primária parcial por espectrometria de massa e sequenciamento de nucleotídeos de uma alga bastante abundante no litoral cearense.

Os estudos que utilizam a espectrometria de massas para a análise de ficobiliproteínas, resumem-se apenas a identificação por *fingerprint*, uma técnica que

identifica a sequência apenas pela massa do peptídeo, obtendo uma espécie de impressão digital da proteína, como o estudo realizado com a ficoeritrina da alga vermelha *Portieria hornemannii*, utilizando a fonte de ionização MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) (SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). A obtenção de peptídeos sequenciados manualmente torna a identificação mais eficaz, permitindo a análise, interpretação e sequência total da proteína.

Figura 12 - Alinhamento múltiplo da sequência de HMP com ficoeritrinas presentes nos bancos de dados.



As cores ilustram as propriedades físico química de cada resíduo de aminoácido. As cores vermelha, verde, rosa e azul representam os aminoácidos hidrofóbicos, polares, carregados positivamente e carregados negativamente, respectivamente.

É importante ressaltar que na literatura, em relação a sequência primária de proteínas de algas *versus* função dentro da Ordem Gigartinales e Família: Cystocloniaceae foram encontradas apenas 161 proteína estudadas, algumas delas com estrutura tridimensional já determinada. A identificação dessas proteínas estava restrita principalmente a função fotossintética como proteínas de fotossintemas, citocromo oxidase, rubisco e ficobilirpteínas.

Nos bancos de dados estão disponíveis dados de 36 genomas de rodófitas, o que contribui bastante para a identificação da ficoeritrina de HMp.

4 CONCLUSÃO

Uma nova ficobiliproteína presente na alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* foi purificada através de um único passo cromatográfico em coluna de DEAE-celulose. Essa proteína apresentou uma única banda em eletroforese nativa e duas cadeias quando submetida à SDS-PAGE. Análise da sequência primária parcial apresentou similaridades com algumas ficoeritrinas de algas vermelhas já estudadas. Novos estudos devem ser realizados para caracterização total da proteína. Através da obtenção da ficobiliproteína (HMp), será possível investigar, futuramente, seu potencial como ferramenta biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- APT K.E.; GROSSMAN A. R. Characterization and transcript analysis of the major phycobiliprotein subunit genes from *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta). **Plant molecular biology**, v. 21, p. 27- 38, 1993.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. Flórida CTC, Taylor & Francis. 2006, 301 p.
- BEALE, S. I.; COMEJO, S. Biosynthesis of phycobilins: 15,16-dihydrobiliverdin IXa is a partially reduced intermediate in the formation of phycobilins from biliverdin IXa. **J. biol. Chem**, v. 266, p. 22341-22345, 1991.
- BEI, H.; GUANG-CE, W.; CHEN-KUL, Z.; ZHEN-GANG, L. The experimental research of R- phycoerythrin subunits on cancer treatment - A new photosensitizer in PDT. **Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals**, v. 17, p. 35–42, 2002.
- BENEDETTI, S.; RINADULCCI, S.; BENVENUTI, F.; FRANCOGLI, S.; PAGLIARANI, S.; GIORGI, L.; CANESTRARI, F. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga, *Aphanizomenon flos-aquae*. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 12–18, 2006.
- BERNARD, C.; ETIENNE, A. L.; THOMAS, J. C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilissome in *Rhodella violacea* (rhodophyta) **Journal of phycology**, v. 32, p. 265-272, 1996.
- BERNARD, C.; THOMAS, J. C.; MAZEL, D.; MOUSSEAU, A.; CASTETS, A. M.; MARSAC, T. D.; DUBACQ, J. P. Characterization of the genes encoding phycoerythrin in the red alga *Rhodella violacea*: evidence for a splitting of the rpeB gene by an intron. **Proc Natl Acad Sci**. v. 89 (20), p. 9564-9568, 1992.
- BITENCOURT, F. D. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R. L.; BEZERRA, C. C. R.; SILVESTRE, P. P.; VALE, M. R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. Naunyn Schmiedebergs **Arch Pharmacol**, v. 377, p. 139–48, 2008.
- BOURGOUGNON, N.; JACQUOT, J.; GADAL, P. Advances in Botanical Research. **Sea plants**, v.71, 1ª edição, 2014.
- BRANDINI, Frederico. Farmácias Vivas Marinhas (2006). Disponível em <http://www.oeco.com.br/todos-os-colunistas/50-frederico-brandini/17097-oeco16948>. Acesso em 24 de agosto de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do estado da arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**, Brasília, 2010.

- CHANG, W. R.; JIANG, T.; WAN, Z. L.; ZHANG, J. P.; YANG, Z. X.; LIANG, D. C. Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.** v.262, p. 721-731, 1996.
- CONTRERAS-MARTEL, C.; MARTINEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M.; LEGRAND, P.; PIRAS, C.; VERNEDE, X.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. **Acta Crystallogr.**, v. 57, p. 52-60, 2001.
- CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. Antioxidants from macroalgae potential applications in human health and nutrition. **Algae**, v. 25, n. 4, p. 151-171, 2010.
- DAVID, L.; MARX, A.; ADIR, N. High-resolution crystal structures of trimeric and rod phycocyanin, **J. Mol. Biol.** v. 405, p. 201–213, 2011.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O.; Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 40 (3), p. 173- 289, 2000.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**, v. 3, p. 380- 387, 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DUCRET, A.; SIDLER, W.; FRANK, G.; ZUBER, H. The complete amino acid sequence of phycocyanin-1 alpha and beta subunits from the red algae *porphyridium cruentum*- Structure and phylogenetic relationships of the phycocyanins within the phycobiliprotein families. **Eur J Biochem.**v 221, p. 563- 580, 1994.
- DUERRING, M.; SCHMIDT, G. B.; HUBER, R. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 217 (3), p. 577–592, 1991.
- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical journal**, Amsterdam, v. 18, p. 1- 25, 2010.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FACCINI, A. L.; BERCHEZ, F. Management of natural beds and standing stock evaluation of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta) in south-eastern Brazil. **Journal of Applied Phycology** **12**, v. 2, p. 101–103, 2000.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. 2014. The state of world fisheries and aquaculture, Rome, 2014.
- FAO- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. Training Manual on *Gracilaria* Culture and Seaweed Processing in China (1990). Disponível em:

<<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E00.htm#TOC>>. Acesso em: 20 de agosto de 2014.

FIELD, C. B.; BEHRENFELD, M. J.; RANDERSON J. T.; FALKOWSKI, P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, v. 281, p. 237-240, 1998.

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

FLYNN, A. **Farmed Seaweed**. Monterey Bay Aquarium Research Institute, USA. 2014.

FRANK, G.; SIDLER, W.; WIDMER, H.; ZUBER. The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Hoppe Seyler's **J Physiol Chem**, v. 359, p.1491–1507, 1978.

GALLAND-IRMOULI, A. V.; PONS, L.; LUC, M.; VILLAUME, C.; MRABET, N. T.; GUEANT, J. L. Fleurence One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Chromatogr. B**, p.117–123, 2000.

GERALDINO, P. J. L.; RIOSMENA-RODRIGUEZ, R.; LIAO, L. M.; BOO, S. M.; Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) with description of *H. caespitosa*. **J. phycol.** V. 46, p. 336- 345, 2010

GLAZER A.N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **J Appl Phycol**, p. 105–112, 1994.

GRANHAM, L. E.; GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education. 2009. 616 p.

HILDITCH, C. M.; BALDING, P.; KAKINS, R.; SMITH, A. J.; ROGERS, L. J. C-Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanizomenon halophytica*. **Journal of Applied Phycology**. v. 3, 345- 354, 1991.

ISAILOVIC, D.; LI, H. W.; YEUNG, E. S. Isolation and characterization of R-phycoerythrin subunits and enzymatic digests. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, p. 119–130, 2004.

KIM, B. K.; FUGITA, Y. Nucleotide sequence analysis of the phycoerythrin encoding genes in *Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 45(4), p. 217-224, 2006.

KIM, S. K. **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology**. Wiley Blackwell. 1ª edição. 2011.

KLOTZ, A.V.; GLAZER, A. N. Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 4856-4863, 1985.

KOMATH, S. S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Org. Biomol. Chem.**, v. 4, p. 973–988, 2006.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological. Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**. Hindawi, p. 1-9, 2013.

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

LIN L. Q.; WU, Y.C.; CHEN. B. L. Cloning and sequence analysis of phycoerythrin gene of *Porphyridium purpureum*. EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: **Nucleotide sequenc**. 2010.

LISSI, E. A.; PIZARRO, M.; ASPEE, A.; ROMAY, C. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1051–1055, 2000.

LIU, C. L., LEE, Y. K., LEE, H. K. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em < <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7XYZ7>>. 2002.

LIU, L.; CHEN; XI-YING, Z.; YU-ZHONG, Z.; ZHOU, B. C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**. p. 91–100, 2005.

LUTZ, K. A.; WANG, W.; ZDEPSKI, A.; MICHAEL, T. P. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. **BMC Biotechnology**, p. 1-9, 2011.

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

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

MISHRA, S. Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine *cyanobacterium Pseudanabaena sp.* **Protein Expression and Purification**, v. 80, p. 234–238 , 2011.

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

MÖLISCH, H. Das phycoerythrin, seine Krystallisirbarkeit und chemische **Natur Bot Z.** v. 52, p. 177–189, 1894.

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

MOREIRA, R. A.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, N. A.; MARQUES, V. B. Produção e qualidade de frutos de pitaiia-vermelha com adubação orgânica e granulado bioclático. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 33, n. 1, p. 762-766, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** –. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. 1273 p.

NIU, J.; WANG, G.; TSENG, C. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. **Protein Expression and Purification**, v. 49, p. 23–31, 2006.

PANDEY, G.; FATMA, T.; SUDHA, M.; COWS, S. M.; KOMATH, S. S. Specific interaction of jacalin with phycocyanin, a fluorescent phycobiliprotein. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 97, p. 87–93, 2009.

PANGESTUTI, R.; KIM, S.K., Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, p. 255–266. 2011.

PAN, Q.; CHEN, M.; LI, J.; WU, Y.; ZHEN, C.; LIANG, B. Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. **Biol Res.**, v. 46, p. 87-95, 2013.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycoerythrin from cyanobacterial species of marine and fresh water habitat. **Protein Expr Purif**, v. 40(2), p. 248–255, 2005.

PATEL, A.; PAWAR R.; MISHRA S.; SONAWANE, S.; GHOSH, P. K. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycoerythrin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254-257, 2004.

PAULA, E. J.; PEREIRA, R.T. L.; OHNO, M. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, v. 50, p. 1-9, 2002.

QUERELLOU, J.; BORRESEN, T.; BOYEN, C.; DOBSON, A.; HÖFLE, M.G.; IANORA, A.; JASPARS, M.; KIJOA, A.; OLAFSEN, J.; RIGOS, G.; WIJFFELS, R.; COMPÈRE, C.; MAGOT, M.; OLSEN, J.L.; POTIN, PH.; VOLCKAERT, F. Marine biotechnology: a new vision and strategy for Europe. *ESF Marine Board Position Paper*, 15. **European Science Foundation**, 2010, 91 p.

REITH, M. E.; MUNHOLLAND, J. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. **Plant Mol. Biol. Rep.** v.13, p. 333-335, 1995.

RIMBAU, V.; CAMINS, A.; ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; PALLAS, M. Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, **Neurosci. Lett.**, v. 276, p. 75-78, 1999.

RITTER, S.; HILLER, R. G.; WRENCH, P. M.; WELTE, W.; DIEDERICHS, K. Crystal structure of a phycocouobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. **J Struct. Biol.** v.126 (2), p. 86-97, 1999.

RITTER, S.; HILLER, R. G.; WRENCH, P. M.; WELTE, W.; DIEDERICHS, K. Purification, crystallization and preliminary X- ray of a phycourobilin-containing phycoerythrin. **Protein and peptide Letters**, v. 4, p. 69- 74, 1997.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(4), p. 631-639, 2007.

ROELL, M. K.; MORSE, D. E. Organizations, expression and nucleotide sequence of the operon encoding R-phycoerythrin α and β subunits from the red algae *Polysiphonia boldii*. **Plant molecular biology**, v. 21, p. 47-58, 1993.

ROMÁN, R.B.; ALVAREZ-PEZ J. M.; FERNANDEZ F.G. A.; GRIMA E. M. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 73-85, 2002.

ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 207-216, 2003.

ROSSANO R.; UNGARO N.; D'AMBROSIO.; LIUZZI, G.M.; RICCIO P. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander, **Journal of Biotechnology**, p. 289-293, 2003.

ROWAN, K.S, **photosyntetic pigments of algae**, Cambridge University press, Cambridge, 1989, 334 p.

SCHEER, H.; ZHAO, K. H. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. **Mol Microbiol**, v. 68, p. 263-276, 2008.

SCHIRMER, T.; BODE, W.; HUBER, R. Refined Three-dimensional Structures of Two Cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å Resolution, **J. Mol. Biol.**, v. 196, p. 677-695, 1987.

SCHLUCHTER, W. M.; GLAZER, A. N. Biosynthesis of Phycobiliproteins in Cyanobacteria. **The Phototrophic Prokaryotes**. P. 83-95, 1999.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 113–136, 2008.

SENTHILKUMAR, N.; SURESH, V.; THANGAM, R.; KURINJIMALAR, C.; KAVITHA, G.; MURUGAN, P.; KANNAN, S.; RENGASAMY, R. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **Int J Biol Macromol**, v. 55, p. 150-160, 2013.

SEPULVEDA-UGARTE, A. J.; BRUNET, J. E.; MATAMALA, A. R.; MARTINEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M. Spectroscopic parameters of phycoerythrobilin and phycourobilin on phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219, p. 211–216, 2011.

SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLIS J, OLSEN JV, MANN M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**. p. 2856-2860, 2006.

SIDLER, W.; KUMPF, B., SUTER, F.; KLOTZ, A.V., GLAZER, A. N.; ZUBER, H. The complete amino-acid sequence of the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin from the rhodophytan alga *Porphyridium cruentum*. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 370 (2), p.115-124, 1989.

SINGH, N. K.; HASAN, S. S.; KUMAR, J.; RAJ, I.; PATHAN, A. A.; PARMAR, A.; SHAKIL, S.; GOURINATH, S.; MADAMWAR, D. Crystal Structure and Interaction of Phycocyanin with β -Secretase: A Putative Therapy for Alzheimer's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, p. 691-698, 2014.

SONANI, R. R.; SINGH, N. K.; KUMAR, J.; THAKAR, D.; MADAMWAR, D. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya sp.* A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1757–1766, 2014.

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

SOUSA, A. A. S. **Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (turner) lamouroux: respostas na inflamação e nocicepção**. 121p. 2006. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas)- Centro de Ciências da Saúde, UECE, Fortaleza, 2010.

SOUSA, I.; BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; EMPIS, J. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 44–52, 2006.

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**. v. 64, p. 146–154, 2009.

TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions. **Marine drugs**, v. 9, n. 6, p. 1101-1118, 2011.

THANGAM, R.; SURESH V.; PRINCY W. A.; RAJKUMAR M.; KUMAR N. S.; GUNASEKARAN P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN C.; KAVERI K.; KANNAN S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**. v. 1402, p. 62–272, 2013.

TRAMPER J.; BATTERSHILL C.; BRANDENBURG W.; BURGESS G.; HILL R.; LUITEN E.; MULLER W.; OSINGA R.; RORRER G.; TREDICI M.; URIZ M.; WRIGHT P.; WIJFFELS R. What to do in marine biotechnology? **Biomolecular Engineering**. v. 20, p. 467-471, 2003.

VALLE, M. G. **O sistema nacional de inovação em biotecnologia no Brasil: possíveis cenários.** 2005. 249 p., Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnologia) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H.M. **Algae: An introduction to phycology.** Cambridge University Press, Cambridge. 1995, 623p.

WANG, G. Isolation and purification of phycoerythrin from red algae *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed- absorption and exchange-chromatography. **Chromatography**, v. 56, p. 509-513, 2002.

YU, M. H.; GLAZER, A. N.; SPENCER, K. G.; WEST, J. A. Phycoerythrins of the red algae *Callithamnion*. Variation in phycoerythrobilin and phycourobilin content. **Plant Physiol.** v. 68, p. 482–488, 1981.

ZHAO, M.; SUN, LI.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 58–64, 2014.

ZHAO, M.; SUN, LI.; SUN, S.; GONG, X.; FU, X.; CHEN, M. The 42.1 and 53.7 kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 405– 411, 2013.

ZHONG, F.; WANG, S.; WU, Z. cDNA of phycoerythrin beta and alpha subunit from *Corallina officinalis*. **Nucleotid Sequence (Uniprot)**, 2002.