



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PESCA**

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MACROALGA MARINHA VERMELHA
Hypnea musciformis POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

**FORTALEZA
2014**

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MACROALGA MARINHA VERMELHA
Hypnea musciformis POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenheiro de Pesca.

Orientadora: Kyria Santiago do Nascimento

**FORTALEZA
2014**

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

-
- N195i Nascimento, Fernando Edson Pessoa do.
Identificação de proteínas da macroalga marinha vermelha *Hypnea Musciformis* por análise proteômica / Fernando Edson Pessoa do Nascimento. – 2014.
62 f. : 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, 2014.
Área de Concentração: Recursos pesqueiros e Engenharia de pesca.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Alga marinha. 2. Alga vermelha. 3. Espectrometria de massa. I. Título.

CDD 469.5

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MACROALGA MARINHA VERMELHA
***Hypnea musciformis* POR ANÁLISE PROTEÔMICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenheiro de Pesca

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Francisco Nascimento Pereira Júnior
Universidade Federal do Ceará

Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, irmã, familiares
esposa e amigos que me incentivaram
de muitas formas e tudo fizeram para
a realização nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde, confiança e impulsão a vencer a jornada de cada ano envolvido na realização de toda minha graduação, desde a época de cursinho até a conclusão do meu curso, não deixando me abater com as dificuldades encontradas ao longo do caminho. E por ter me dado o dom da vida.

Em especial a minha família, minha mãe Maria Cleide Pessoa, minha irmã Cleidiane Cristina Pessoa, e ao meu pai José Valderi do Nascimento que confiaram em mim e acreditaram que eu era capaz de vencer, mesmo conscientes dos difíceis obstáculos que a vida iria me proporcionar, fazendo o possível e impossível para a realização deste sonho.

À minha orientadora Prof. Dra. Kyria Santiago que me acompanhou e me ajudou em seus ensinamentos nesses anos de Biomol-Lab.

Ao Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio pelas contribuições de ensinamentos nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por permitir a realização deste trabalho dando suporte estrutural, científico encontrado no ambiente de trabalho do laboratório, Biomol-Lab.

A Prof(a) Dra. Silvana Saker Sampaio que por muitas vezes me aconselhou em conversas e ensinamentos tão quando lhe procurei.

Ao Prof Dr. Celso Shiniti que por muitas vezes me deu valiosas contribuições de ensino e idéias que me ajudaram a realizar este trabalho.

À todos os professores do curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca que contribuíram com ricos ensinamentos.

À minha esposa Giselle Cristina a qual tenho muito amor e que sempre me apoiou e me deu força, teve paciência comigo, e foi acima de tudo uma companheira, me escutando e entendendo as decepções e dificuldades que tive, me dando conselhos e carinho, necessários de maneira decisiva em meu desenvolvimento pessoal, intelectual.

Aos amigos que fiz no laboratório Lia, Cláudia, Rafael, Helton, Alysson, Júnior, Camila, Alfa, Ito, João Garcia e ao demais que compõem esta família, agradeço pelas contribuições de ensinamentos, e pelos momentos de descontração e risadas que foram dadas nesses anos.

À Sâmia pelos ensinamentos e grandes contribuições neste trabalho.

Ao meu grande amigo Guilherme Lima que enfrentou junto comigo todos os momentos de vida acadêmica durante o curso e que sempre tinha uma nova idéia para conversarmos e analisarmos os problemas que apareciam a todo instante, a qual sempre terá a minha sincera amizade e gratidão.

A minha prima Cláudia e seu esposo Raimundinho que também contribuíram para esta

realização.

Àos meus tios José Cleudes, João Batista, Manoel Rafael, Maria Creuza, Diassis Vasconcelos que por muitas vezes me deram força, compreensão e ajuda ao longo de toda a minha caminhada, sempre me dando apoio e conselhos para que eu escolhesse os melhores caminhos.

Em especial a minha tia Celeste Freitas (*in memoriam*), que estará presente comigo, para toda a eternidade e que neste momento estará bastante orgulhosa, gostaria de tê-la aqui presente.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos e pela infra-estrutura do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas - BIOMOL-Lab.

RESUMO

Atualmente vivemos em uma acirrada competição na pesquisa de desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, o ambiente marinho pode ser visto como uma fonte de materiais biotecnológicos funcionais. Recentemente, estudos demonstram que dentro do ambiente marinho as algas se destacam como organismos com grande potencial biotecnológico por possuírem em sua composição várias moléculas bioativas que apresentam diversas e intensas atividades biológicas. Dentre todos os grupos algais, neste trabalho enfatizamos o das algas vermelhas, a qual a espécie de estudo é a alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen). *J. V. Lamouroux* pertence à ordem *Gigartinales* e a família *Hypneaceae*, abundante no litoral do Ceará. Trabalhos biotecnológicos e científicos são realizados com esta espécie, neste sentido o objetivo principal deste trabalho é identificar e caracterizar proteínas existente neste organismo através de uma abordagem proteômica, que é uma área recente na ciência, que permite bioprospectar um conjunto de proteínas presentes num organismo através do uso de ferramentas analíticas, pois, em condições fisiológicas específicas, o funcionamento do sistema biológico pode ser refletido por análise do proteoma do mesmo, e assim a sua expressão gênica funcional. Considerando a carência de estudos sobre proteômica em algas marinhas e em especial da carragenófito *Hypnea musciformis*, o presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver metodologias de separação de proteínas de extrato protéico de *Hypnea musciformis* e identificar as proteínas expressas pelo organismo. Neste trabalho conseguimos estabelecer uma metodologia de separação de proteínas deste organismo a partir de um extrato fracionado com sulfato de amônio e através de espectrometria de massas, identificar algumas proteínas da alga marinha. Desta forma, sendo de fundamental importância para o enriquecimento na literatura de proteômica de macroalgas marinhas. Os resultados deste trabalho que estão de acordo com o nosso objetivo foi a identificação de 3 proteínas por técnica de espectrometria de massas utilizando ionização do tipo eletrospray da fração protéica 20-40% e a identificação de algumas proteínas através do Mascot

Palavras chave: espectrometria de massas, eletrospray, MALDI; fracionamento protéico.

ABSTRACT

We currently live in a fierce competition in the research development of new biotechnology products, the marine environment can be seen as a source of functional biotechnological materials. Recent studies show that within the marine environment algae stand out as organisms with great biotechnological potential by having in its composition various bioactive molecules that have diverse and intense biological activities, among all algal groups in this study emphasize the of red algae, which the kind of study is red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen). *JV Lamouroux* belongs to the order Gigartinales and Hypneaceae family, abundant on the coast of Ceará. Biotechnological and scientific works are carried out with this species, in this sense, the main objective of this work is to identify and characterize proteins existing in this organism through a proteomics approach, is a new area in science that allows bioprospect a set of proteins in an organism by using analytical tools because under specific physiological conditions the biological functioning of the system can be reflected by the proteome analysis of the same, and thus the functional gene expression. Considering the lack of studies on proteomics in seaweed and in particular the carragenófito *Hypnea musciformis*, this paper aims to develop methods for separating proteins from protein extract of *Hypnea musciformis* and identify the proteins expressed by the organism. In this work we have established a methodology for separating proteins of this organism from a fractionated extract with ammonium sulfate and by mass spectrometry to identify proteins of some kelp, thus being of fundamental importance for the enrichment of macroalgae in the proteomics literature marine. The results of this work are consistent with our objective was the identification of three proteins by mass spectrometry using electrospray ionization type protein fraction of 20-40% and the identification of some proteins by Mascot

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Imagens de géis de eletroforese bidimensional ilustrando métodos de corar os pontos protéicos.	24
Figura 2	Janela da interface do ImageMaster 7.0	26
Figura 3	Janela do servidor Mascot. Mostrando a sequência de todo os parâmetros a serem preenchido para se realizar a busca de uma proteína em bancos de dados .	31
Figura 4	Janela de exibição dos resultados do Servidor Global ProteinLynx (PLGs)	33
Figura 5	Imagens da alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	36
Figura 6	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%.	46
Figura 7	Eletroforese bidimensional de frações proteicas da alga marinha <i>Hypnea musciformis</i> .	50
Figura 8	Foto do Gel (15%) de poliacrilamida da Fração 20-40% da alga marinha <i>Hypnea musciformis</i> que foram submetidos a eletrospray (ESI).	51

LISTA DE TABELAS

1	Parâmetros de voltagens utilizados para a corrida da 1ª dimensão.	41
2	Quantificação de proteínas presentes no extrato proteico e frações (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100)	45
3	Representação no número de spot por fração protéica.	47
4	Identificação e característica do spot 25 da fração 20-40% da alga marinha <i>H. musciformis</i> mostrado na figura 8	48
5	Identificação e característica do spot 15 da fração 20-40% da alga marinha <i>H. musciformis</i> mostrado na figura 8.	49
6	Identificação e característica do spot 13 da fração 20-40% da alga marinha <i>H. musciformis</i> mostrado na figura 8.	49
7	Proteínas identificadas pelo Mascot das frações protéicas da macroalga marinha <i>Hypnea musciformis</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenoamino tetra-acético
EBI	Instituto Europeu de Bioinformática
ESI	Ionização por Eletrospray
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
TOF	Tempo de voo
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial
PBS	Tampão Fosfato de Sódio com Cloreto de Sódio
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
P/V	Relação peso-volume
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIB	Instituto Suíço de Bioinformática
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
U.H.	Unidade hemaglutinante
V/V	Relação volume-volume
2DE	Eletroforese bidimensional
TEMED	N, N, N', N'-tetra metiletlenodiamina
IEF	Focalização isoelétrica
kDa	Quilo Dalton
PMF	Impressão digital de massas peptídicas
mA	Micro ampere
V	Volt
W	Watt

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Rhodophytas (algas vermelhas)	16
	Hypnea musciformis e seu potencial biotecnológico	17
2	PROTEÔMICA	19
2.1	Metodologias e estratégias aplicadas em análise proteômica	20
3	PROTEÔMICA EM ALGAS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Coleta da alga marinha	36
4.2	Extrações das proteínas totais	36
4.3	Fracionamento protéico com sulfato de amônio	37
4.4	Quantificação de proteínas totais	37
4.5	Eletroforese unidimensional	38
4.6	Preparo da amostra para eletroforese bidimensional	39
4.7	Focalização isoeletrica	40
4.8	Eletroforese bidimensional	41
4.9	Digitalização e análise dos géis	42
4.10	Digestão enzimática de proteínas em gel	42
4.11	Preparo de amostra para ionização em fonte MALDI	43
4.12	Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) - ESI	43
4.13	Identificação de proteínas	44
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

INTRODUÇÃO

Atualmente vivemos em uma acirrada competição na pesquisa de desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Neste sentido e levando em consideração que mais de 70% da superfície da Terra é coberta por oceanos, a grande diversidade de organismos marinhos oferece uma rica fonte de recursos naturais que podem ser explorados quanto a estes produtos. Assim o ambiente marinho pode ser visto como uma fonte de materiais biotecnológicos funcionais, que incluem ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, minerais essenciais, vitaminas, anti-oxidantes, enzimas, proteínas, peptídeos bioativos e etc (KIM, 2010; POMPONI, 1999).

Recentemente, estudos demonstram que dentro do ambiente marinho as algas se destacam como organismos com grande potencial biotecnológico por possuírem em sua composição várias moléculas bioativas que apresentam diversas e intensas atividades biológicas (WIJESEKARA, 2010).

As algas representam um grupo de organismos vegetais polifiléticos, que compõem diferentes linhagens evolucionárias, principalmente de organismos fotoautotróficos. Atualmente, tem-se discutido de maneira muito conflitante a sistemática desses indivíduos (ANDERSON, 1996).

Segundo Graham e Wilcox (2000), as algas são consideradas como sendo um grupo de organismos que têm, na sua grande maioria, as seguintes características: são organismos aquáticos, fotossintéticos, possuem estruturas vegetativas simples, sem um sistema vascular e possuem ainda corpos reprodutivos que não tem uma camada estéril de proteção celular. De acordo com Bold (1985) as algas são organismos muito simples, contendo moléculas como clorofilas e pigmentos fotossintéticos. Estes organismos podem ser uni ou pluricelular, variando muito em tamanho - unicelular de 3-10 μm evoluindo para kelps gigantes de até 70 m de comprimento e crescendo em até 50 cm por dia (HILLISON, 1977).

A sistemática dos grupos de algas é baseada nas características morfológicas convencionais e considerações filogenéticas moleculares modernas. As principais características de cada grupo de algas são descritas de acordo com a sua própria morfologia celular, com a sua forma de vida, com critérios ultraestruturais dos cloroplastos, com seu aparato flagelar, bem como em relação à composição de seus pigmentos (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; LOWE; LA LIBERTE, 2006). No que diz respeito à caracterização

sistemática, de acordo com Vidotti (2004), as algas podem ser inseridas em três diferentes reinos: monera, protista e plantae.

A grande diferença entre um organismo algal e uma planta verdadeira concerne, principalmente, na ausência de sistemas de tecidos e órgãos verdadeiros na sua composição como organismo vivo (LOWE; LA LIBERTE, 2006). No entanto, segundo Bold (1985), as algas são incluídas no reino vegetal e são distinguidas de outras plantas de clorofila com base na reprodução sexual. Em algas unicelulares, os próprios organismos podem funcionar como gametas; em certas algas multicelulares, os gametas podem ser produzidos em células especiais unicelulares ou gametangia; e em outros organismos, ocorre a gametangia pluricelular, em que cada célula gametangial é fértil e produz um gameta. Estas características estão ausentes nas plantas vasculares e formam a base através da qual as algas são estudadas e classificadas.

Em geral, as algas podem viver em diversos ambientes, desde água doce até água com grande quantidade de sal dissolvido. As algas são encontradas em todos os lugares na terra: no mar, rios e lagos, no solo e paredes, em animais e plantas (como simbioses - parceiros colaborando juntos). Na verdade, em quase todos os lugares onde haja luz para realizar a fotossíntese (GAMAL, 2010). No entanto, os mecanismos que controlam a produção líquida de macroalgas marinhas são principalmente limites geográficos para o crescimento, como por exemplo, temperatura e luz, além da remoção de pastagem e perturbação física dentro do ambiente aquático, que constitui seu habitat. Dentro destes limites geográficos, o acúmulo de biomassa é controlado por muitos fatores bióticos e abióticos que interagem entre si, no sentido de aumentar ou diminuir certa biomassa algal. Fatores estes que incluem a qualidade e o movimento da água, as relações ecológicas intra e interespecíficas, competição, herbivoria e perturbação física do meio (FONG, 2008).

Sabemos que as algas marinhas são ricas em polissacarídeos não amiláceos, como a carragenana e o alginato (HOLDT, 2011), substâncias estas que não são degradadas por enzimas de mamíferos e, assim, quando administradas à dieta humana, estes indivíduos se destacam como materiais ricos em fibra (WONG, 2003). Algas também possuem uma enorme variedade de polissacarídeos sulfatados como fucose, fucoidano e outros, os quais possuem uma variedade de atividades biológicas (ZHANG, 2011).

No que diz respeito à presença de proteínas nas algas, podemos dizer que quanto ao aspecto nutricional, as proteínas possuem um alto teor de aminoácidos essenciais (FLEURENCE, 1999), e do ponto de vista funcional, podemos encontrar uma variedade de

famílias de proteínas que são estudadas como matéria prima de produtos biotecnológicos nas mais variadas aplicações (NAGANO, 2002).

As macroalgas marinhas formam diversos ecossistemas produtivos ao longo de plataformas continentais em todo o mundo. Os membros mais abundantes destes organismos estão distribuídos em quatro divisões principais, em *Phaeophyta* (algas marrons), *Chlorophyta* (algas verdes), *Rhodophyta* (algas vermelhas) e *Cyanophyta* (algas azuis) (MOHAMED *et al.*, 2012).

1.1 Rhodophytas (algas vermelhas)

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) são um grupo de seres vivos eucarióticos com diferentes linhagens, cujos membros estão unidos por análises filogenéticas, a partir de ferramentas de biologia molecular através de estudos dos genes de plastídeos e mitocondriais (YOON *et al.*, 2004). Além disso, as algas vermelhas são caracterizadas por um conjunto de caracteres que não ocorrem juntos em qualquer outro eucarioto. Estes incluem, uma completa falta de estágios flagelados e corpos basais, um plastídeo com duas membranas que não tem clorofila b ou c (BHATTACHARYA, 1995), contém tilacóides não empilhados e as reservas armazenadas são na forma de amido das florídeas (GARBARY, 1990; GRAHAM, 2000). De acordo com Lee (2008), as rodophytas são algas que possuem células com clorofila *a*, ficobiliproteínas e tilacóides ocorrendo dentro dos cloroplastos.

Segundo estudos realizados por Garbary (1990), as algas vermelhas pertencem a um grupo de organismos que sistematicamente está dividido em duas principais subclasses, a *Bangiophyceae* (*Bangiophycidae*) e *Florideophyceae* (*Florideophycidae*). As algas da família *Bangiophyceae* foi no passado dividido em seis ordens (Bangiales, Cyanidiales, Compsopogonales, Erythropeltiales, Porphyridiales e Rhodochaetales) e agora é considerado como uma série de ordens que definem as linhagens ancestrais das algas vermelhas (RAGAN *et al.*, 1994).

De acordo com Ragan *et al.*, (1994), as algas da família *Florideophycidae* incluem aspectos complexos, do ponto de vista morfológico, evidenciados em grupos como as Gigartinales os Ceramiales, e é amplamente acreditado para ser derivado das Bangiophytidae, portanto, um grupo monofilético.

1.2 *Hypnea musciformis* e seu potencial biotecnológico

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen). J. V. Lamouroux pertence à ordem *Gigartinales* e a família *Hypneaceae*. Possui tamanho geral entre 3 e 30 cm e 0,5 a 1,0 cm de diâmetro com ramos cilíndricos e cartilagosos, é altamente ramificada, com sua ramificação variável e irregular identificada facilmente pelas extremidades enroladas (ganchos) de seus ramos que se tornam progressivamente mais delgados à medida que alcançam as extremidades do organismo.

A espécie ocorre em costas, estuários e habitats marinhos. É comum encontrá-las em marés calmas e rasas, mais frequentemente encontradas em recifes, bancadas, rochas ou epífitando *Sargassum* e outras algas. No estágio de florescimento, pode ser encontrada flutuando livremente. Está amplamente distribuída pelos oceanos e seu provável sucesso de dispersão deve-se a sua rápida taxa de crescimento, sua capacidade de epifitar outras algas e sua fácil fragmentação, além disso, essa disseminação pode ser reforçada através de viagens quando presas em cascos de barcos (REIS, et al., 2003).

A alga *H. musciformis* constitui uma das fontes de alimento de seres herbívoros marinho, dentre estes, tornou-se parte significativa da dieta alimentar da tartaruga verde, *Chelonia mydas*, considerada uma espécie ameaçada de extinção, porém o valor nutricional da alga ainda não foi determinado (acesso em 28/04/2014 <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=728>).

O conteúdo bioquímico das algas marinhas vermelhas fornece um valor nutritivo elevado, semelhante à encontrada em fontes de alimento vegetal tradicionais. Atualmente, o uso de algas marinhas vermelhas como fontes de proteínas, pigmentos e minerais representa uma valorização deste recurso marinho pelo fato destas biomoléculas serem utilizadas como matérias-primas em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e outros. Lipídeos e celulose têm sido extraídos de algas com sucesso para produção de biocombustíveis, biodiesel e bioetanol, respectivamente (RAVI, 2014).

Devido ao alto potencial econômico da alga marinha *Hypnea musciformis*, nos últimos anos, tem-se havido uma tendência para diminuir essa exploração das algas do seu habitat natural. Para isso, experimentos de cultivo têm sido feitos com diferentes espécies algais dentre elas *Hypnea musciformis*, sendo o sistema de cordas o de maior sucesso para o cultivo (MUÑOZ, 2011). Guist Jr. e colaboradores (1982) relataram também o cultivo desta espécie em tanques com taxa de crescimento ótimo em temperaturas que variam de 18°C a 20°C.

A macroalga *Hypnea musciformis* presente no litoral brasileiro, apresenta potencial econômico pelo fato de ser uma fonte de polissacarídeos do tipo kappa-carragenana (CAMPO, *et al.*, 2009), muito utilizada pela indústria de alimentos por indústrias nacionais e estrangeiras. Além disso, polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas mostraram ser moléculas promissoras com ação anticoagulante (LARA-ISASSI *et al.*, 2009).

Na *H.musciformis* coletada na Índia foi encontrada a estirpe bacteriana *Pseudomonas stutzeri*, capaz de produzir melanina em suplementação com L-tirosina. As bactérias que vivem em simbiose com as algas desempenham um papel protetor pelo fato de liberarem metabólitos secundários na água impedindo a incrustação ou predação das macroalgas (KUMAR, *et al.*, 2013).

Os metabólitos secundários apresentam uma gama de atividades biológicas, dentre elas ação antibiótica, antiviral, anti-oxidante, anti-deposição, anti-inflamatória etc. Dentre os metabólitos de interesse pode-se destacar os carotenoides, fucoxantinas, astaxantina, tocoferóis, entre outros (BALAMURUGAN, *et al.*, 2013).

Em relação as proteínas, poucos são os estudos na literatura que descrevem a potencialidade das proteínas da macroalga *H. musciformis*. Em 2002, uma lectina presente em *H. musciformis* foi isolada e caracterizada (NAGANO, *et al.*, 2002). Cordeiro e colaboradores (2006), relataram a ação antifúngica da fração proteica 40/70 da macroalga *H. musciformis* contra leveduras patogênicas de *Candida albicans* e *C. guilliermondii*.

Na literatura existem vários relatos do potencial biotecnológico de lectinas de macroalgas como atividade antibacteriana (VASCONCELOS, *et al.*, 2014); ação cicatrizante (NASCIMENTO-NETO, *et al.*, 2012); antinociceptiva (FIGUEIREDO, *et al.*, 2010); antitumoral (PINTO, *et al.*, 2009); relaxação muscular (LIMA, *et al.*, 2010); etc.

2. PROTEÔMICA

A proteômica é uma área recente na ciência que permite bioprospectar um conjunto de proteínas presentes num organismo através do uso de ferramentas analíticas. O termo proteômica teve utilização inicialmente em 1995 e pode ser definido pela caracterização e o estudo em larga escala de todas as proteínas presentes numa unidade biológica seja esta uma simples célula até um complexo tecido organizado (WILKINS *et al.*, 1995). Segundo Cánovas *et al.*, (2004), este conceito se tornou mais abrangente, e desta forma, a proteômica se faz capaz de quantificar, localizar, determinar modificações pós-traducionais e, principalmente, atribuir funções as proteínas identificadas em um estudo.

As proteínas são moléculas bioativas composta de aminoácidos, que exercem uma infinidade de funções importantes nos sistemas biológicos, além, de serem responsáveis pelo fenótipo da célula e por diversas atividades biológicas específicas que podem ser evidenciadas de maneira sozinha ou em sinergismo com outras moléculas, possuem também modificações e níveis de expressão que descrevem um determinado sistema biológico.

Atualmente, a comunidade científica tem desenvolvido vários trabalhos referentes a mapas genômicos. No entanto, sabe-se que o estudo isolado dos genes é insuficiente para explicar uma diversidade de eventos biológicos e padrões de expressão gênica do mRNA, nem sempre estas se correlacionam com o nível de expressão protéica (ANDERSON, 1997). Por outra parte, as proteínas, são as responsáveis diretas pelo fenótipo das células e organismos (GRAVES, 2002).

Neste sentido surge à ciência denominada de proteômica, no intuito de explicar estas lacunas de entendimentos entre o transcrito e a proteína expressa, e responder alguns questionamentos, como por exemplo: como, onde, quando e quais são as centenas de milhares de proteínas individuais produzidas em um organismo ou tecidos? Como ocorre a interação entre proteína-proteína? Como estas proteínas comandam e agem no sentido de desencadear respostas e desenvolver mecanismos que facilitem a vida destes organismos no ambiente o qual vivem? (GONZALEZ, 2011).

Em condições fisiológicas específicas, o funcionamento do sistema biológico pode ser refletido por análise do proteoma do mesmo, e assim a sua expressão gênica

funcional, no entanto, esta se mostra bastante dinâmica, e desta forma a melhor opção para se entender o funcionamento dos genes é estudando o seu produto final, as proteínas, o que pode ser feito através de abordagens proteômicas (DUTT, 2000). Vale ressaltar que o proteoma de um organismo é altamente mutável, ele varia de acordo com as condições e os estímulos os quais o organismo se expõe em um determinado período de tempo (WILKINS *et al.*, 1999).

2.1 Metodologias e estratégias aplicadas em análise proteômica

A estratégia de escolha mais utilizada atualmente para o estudo de proteomas, e que tem demonstrado ser eficiente, é a combinação de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional com espectrometria de massas. A eletroforese permite a separação de proteínas de um dado sistema biológico com alta resolução e reprodutibilidade, enquanto que a espectrometria de massas permite, através de alta demanda e sensibilidade, a identificação de proteínas presentes em um *spot* do gel (GÖRG *et al.*, 2004).

No entanto, atualmente, ocorre um advento de novas estratégias de análise de proteomas que não é baseada em gel de poliacrilamida para a quantificação relativa de proteínas, tais como ICAT (*isotope-coded affinity tag*) que significa etiqueta de afinidade por isótopo codificado (GYGI, 1999) e SILAC (*stable-isotope labelling by amino acids in cell culture*) que significa ligações estáveis de isótopos em aminoácidos em culturas de células (ONG *et al.*, 2002). Estas abordagens têm permitido a análise automática de um grande número de amostras comparando-se duas ou mais situações fisiológicas de um mesmo sistema biológico.

Abordagens que usam cromatografia líquida de alta resolução (cromatofocalização combinada com fase-reversa), para a purificação e fracionamento de proteínas e de peptídeos de uma amostra, também têm sido desenvolvidas e aplicadas com sucesso (VALLEDOR, 2011).

Os estudos proteômicos são muito complexos, haja vista que quando realizamos uma extração proteica não necessariamente estamos apenas separando proteínas; pode ser que venham atreladas ao material de interesse outras moléculas contaminantes. Para cada tipo de amostra biológica, seja esta uma célula, tecido ou fluido corporal, deve-se, como medida de preparação da amostra, envolver fundamentalmente o rompimento celular, inativação ou remoção de substâncias interferentes e solubilização maximizada das proteínas (PENQUE,

2009).

O objetivo da preparação da amostra para a eletroforese bidimensional (2-DE) é converter o material biológico nativo em um estado físico adequado para a primeira dimensão: a focalização isoeletrica (IEF), preservando a carga nativa dos constituintes das proteínas e, assim, constitui um passo simples e importante no estudo proteômico de uma amostra biológica (CARPENTIER *et al.*, 2005).

No entanto, o método específico de preparação da amostra depende prioritariamente da separação das proteínas pelo pesquisador. Vale ressaltar que o objetivo da maioria das aplicações de amostras em gel 2-DE é para resolver o maior número de proteínas possível dentro de uma determinada faixa de pI (ponto isoelétrico) e Mr (massa molecular relativa), para facilitar a comparação entre um conjunto de dados oriundos de amostras com características biológicas diferentes (SHAW, 2003).

No geral, podemos dizer que os principais contaminantes encontrados em estudos proteômicos nas amostras biológicas de natureza vegetal são compostos em paredes celulares e vacúolos. Estes por sua vez, estão associados com inúmeras substâncias tais como compostos fenólicos, compostos proteolíticos e enzimas oxidativas, terpenos, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibidores e principalmente carboidratos. Vale ressaltar que estes compostos contaminantes devem ser retirados da amostra, a fim de termos um material protéico mais puro (MEYER *et al.*, 1988).

Os protocolos de extração e preparo de amostras protéicas são todos desenvolvidos baseados no princípio de lise celular, precipitação e concentração das proteínas, metodologias de retirada de contaminantes pós-extração, entre outros (RABILLOUD, 1996; O'FARRELL, 1975; GALDOS, 2009).

De acordo com Cremer (1985), as proteínas são geralmente precipitadas pela adição de altas concentrações de sal, ânions e solventes orgânicos miscíveis em água, ou uma combinação de solventes orgânicos e íons. O processo de solubilização tem como objetivo quebrar as interações macromoleculares (incluindo todas as interações não covalentes e as pontes dissulfeto). O rompimento de interações não covalentes ocorre quando utilizamos no processo de extração protéica, agentes caotrópicos, como a uréia e a tiouréia (HERBERT,1999).

A uréia é um reagente desnaturante que altera o solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes e as ligações iônicas entre os resíduos de aminoácidos, pois rompe os elementos de estruturas secundárias de modo que os grupos ionizáveis fiquem completamente expostos à solução. Por esse motivo, quando usado

em altas concentrações de uréia (comumente 8 mol L^{-1}), esse reagente facilita a solubilização das proteínas (RABILLOUD *et al.*, 1997; RABILLOUD, 1998).

Função semelhante à uréia também é exercida pela tiouréia que é um agente caotrópico mais eficiente do que a uréia, mas pouco solúvel em água. A mistura de uréia e tiouréia tem sido muito utilizada, pois é mais eficiente do que a uréia sozinha (RABILLOUD *et al.*, 1997).

Na tentativa de também ajudar na solubilização da amostra, podemos utilizar detergentes não iônicos como Tween 80, NP-40 e Triton X-100, são suaves e retêm as atividades enzimáticas (KLOSE, 1975). Além desses, podemos utilizar também detergentes híbridos, como CHAPS, “[3-Cholamidopropyl) dimethylammido]-1-propanesulfonate” também comumente empregados, pois além de auxiliar na solubilização das proteínas, previne a agregação através de interações hidrofóbicas (ROCHA *et al.*, 2005). Em geral, e segundo estudos realizados por Lestra (1983), estes detergentes são normalmente utilizados nas concentrações entre 0,4 - 4% em solução aquosa.

Agentes redutores também são utilizados no preparo de amostras para a focalização isoelétrica, como β -mercapetanol, DTT (ditiotreitól), DTE (ditioeritritól) e TBP (tribulfosfina). No entanto, o β -mercapetanol não é mais utilizado, pois promove uma ação de tamponamento destruidora da região básica das tiras (RIGHETTI, 1982), desta forma passou-se a utilizar mais rotineiramente o DTT, que é mais eficiente e age sobre as pontes dissulfetos (ROCHA *et al.*, 2005).

O processo de extração de proteínas envolve uma série de passos que engloba a desnaturação das moléculas protéicas e, assim, se proporciona a exposição de uma grande quantidade de proteases que deverão ser inibidas, a fim de evitar a perda e degradação do material protéico. Dentre os principais inibidores de proteases utilizados em estudos proteômicos. Podemos citar: APMSF (inibidor de serino protease de plasma) com uma concentração de utilização recomendada pelo fabricante de 10-20 μM , a Bestatin (aminopeptidase) com recomendações de 40 $\mu\text{g/mL}$, e o PMSF (inibidor de serino protease) com recomendações de 100 -1000 μM e etc (SHAW, 2003).

Apesar de suas limitações definidas, 2-DE é a técnica mais utilizada para separação de proteínas, de baixo custo e é o método mais adequado para os estudos proteômicos de espécies que não possuem o genoma totalmente sequenciado. A preparação das amostras é um passo crítico e é absolutamente essencial para um bom resultado (CARPENTIER, 2005).

Atualmente todos os projetos de proteômica de certo material biológico se iniciam

pela técnica de separação e identificação de proteínas através de eletroforese bidimensional. No entanto, experimentos envolvendo metodologias de eletroforese para estudos de proteínas datam da década de 30 (TISELIUS, 1937). Apesar destes primeiros estudos, foi somente em 1959 que a eletroforese se destacou como ferramenta bem primordial para estudos protéicos, através da adequação da técnica sobre um suporte de gel formado por polimerização reticulada denominada de Cyanogum (GARRELS, 1979), um nome comercial para o gel formado a partir de dois monômeros orgânicos, o agente acrilamida e a bisacrilamida, que recebeu o nome de PAGE pelo pesquisador Raymond e Weintraub (1959).

No decorrer da evolução das pesquisas com material protéico, Svensson em 1962 realizou os primeiros experimentos eletroforéticos com adaptações de géis de poliacrilamida utilizando focalização isoeletrica com um gradiente de pH estável. A partir destas experiências, no final dos anos de 1960 se iniciaram de fato os primeiros trabalhos com 2-DE, combinando assim focalização isoeletrica (IEF), para separar as proteínas não desnaturadas segundo sua carga e gradiente, e SDS-PAGE para uma segunda separação, de acordo com a sua massa molecular (1970).

Somente por volta de 1975, estudos realizados por O'Farrell possibilitaram o desenvolvimento de focalizações isoeletricas em condições de desnaturação, como é conhecido até os dias de hoje, combinado com 2-DE - PAGE. Essas evoluções possibilitaram estudos descritivos de padrões de 2-DE de proteínas a partir de células, tecidos ou organismos inteiros.

Atualmente a eletroforese bidimensional se caracteriza, basicamente, pelas seguintes etapas: a) coleta de amostras biológicas de interesse de estudo; manipulação e preparação de misturas protéicas com o mínimo de contaminates possível; b) primeira dimensão, também denominada de focalização isoeletrica (IEF), onde separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico; segunda dimensão (SDS-PAGE), separação pela massa molecular aparente; visualização de padrões de proteínas de 2-DE (métodos de corar géis); c) análise assistida por computador dos perfis protéicos; seleção e digestão de spots de proteínas; d) identificação por espectrometria de massas (MS) (GÖRG, 2004).

A focalização isoeletrica (IEF) envolve a separação de moléculas anfóteras que podem apresentar-se com uma carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo da sua estrutura e do pH do meio a qual está inserida, de forma que submetida a um campo elétrico, ocorre a migração da molécula para a posição do gradiente onde sua carga líquida é zero caracterizando assim, seu ponto isoeletrico (NELSON, 2002).

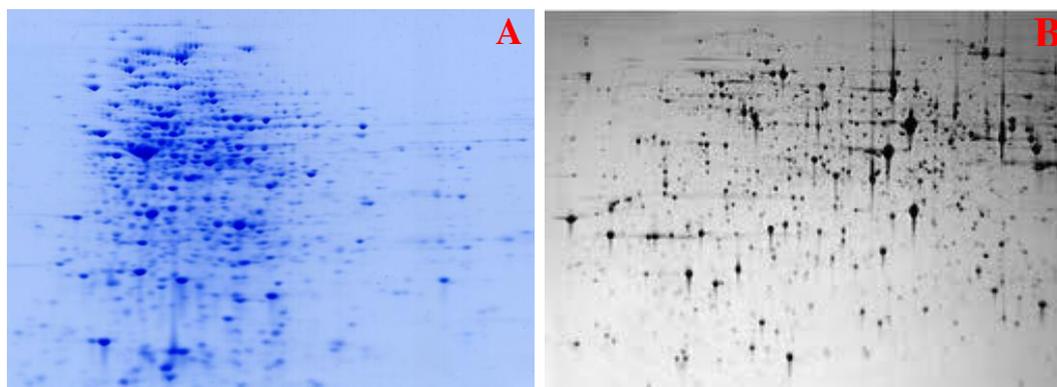
A primeira dimensão passou por uma grande inovação e tecnologia com o advento

das tiras de pH imobilizadas produzidas e vendidas comercialmente, denominadas de IPG's (Gradientes de pH Imobilizados), estas se encontram em uma ampla variedade de tamanhos e faixas de pH (GÖRG,2000), estas sendo ainda lineares e não lineares. Vale ressaltar que, com estes IPG's a reprodutibilidade dos géis foi aumentada e a comparação de dados entre laboratórios melhorados. Estes avanços contribuíram para a generalizada aplicação de 2-DE em proteômica.

A segunda dimensão constitui a etapa da eletroforese bidimensional que ocorre logo após a focalização isoeétrica, na qual se utiliza de gel de poliacrilamida na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), e as proteínas são separadas pela sua massa molecular (ROCHA, 2005).

O resultado da eletroforese bidimensional é um perfil de distribuição de spots formados por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas (PENNINGTON; DUNN, 2001). As proteínas que são separadas nos géis podem ser visualizadas por vários métodos de coloração dos pontos protéicos, utilizando para isso, vários corantes específicos para proteína (Figura 1), no entanto, o mais utilizado é a coloração com o azul brilhante de coomassie R-250, devido principalmente ao seu baixo custo em relação a outros métodos, facilidade de uso (PATTON, 2002), e por apresentar uma compatibilidade com a técnica de espectrometria de massas (PINK *et al.*, 2010).

Figura 1 – Imagens de géis de eletroforese bidimensional ilustrando métodos de corar os pontos protéicos.



A- Gel corado com azul brilhante de coomassie R- 250. B- Gel corado com prata. Fonte: www.google.com/search?hl=pt-BR&site=img&tbm

Após a produção de um gel com pontos protéicos, devemos digitalizá-los para analisar os dados obtidos na imagem visual de um padrão de proteínas de um gel 2-DE e, assim, converter a imagem a um formato digital que nos possibilite interpretar os dados complexos gerados por 2-DE em informações biológicas válidas através de análise computacional, de maneira que nos permita identificar e detectar spots de proteínas, analisar a intensidade dos pontos e até mesmo fazer comparações entre um estado dito controle com ensaios testes (MILLER *et al.*, 2006).

A análise dos géis digitalizados pode ser realizada por uma série de programas computacionais que existem comercialmente disponíveis no mercado. De maneira geral estes softwares são projetados para detecção de pontos automatizados no gel (spots), avaliar a correspondência entre estes pontos em diferentes imagens digitais e avaliar a normalização e a quantificação destes pontos protéicos. No entanto, uma forma totalmente automática de análise de imagens de géis ainda não é permitida, uma vez que a correção por intervenção do usuário é necessária no momento de análise do gel por um determinado programa computacional (MILLER *et al.*, 2006).

Dentre os programas mais utilizados podemos destacar o Alpha- GelFox™ 2D Proteína que é um programa de análise de géis avançado no qual utiliza algoritmos de decoro para identificar proteínas em um curto espaço de tempo. Este programa é capaz de analisar uma variedade de amostras, o software fornece velocidade de análise, integridade de dados e facilidade de uso em genômica funcional, proteômica e pesquisa de descoberta de drogas, além disso, ele pode operar em modo de detecção totalmente automático, semiautomático ou manual (<http://www.highbeam.com/doc/1G1-105517210.html>) Acessado em 21/02/2014.

O Delta - 2D é outro programa de análise de géis que foi criado com base em estudos de especialistas de análise de gel 2D para fornecer um produto que ajudasse a estudar os mapas protéicos de forma mais simples, mais rápida e mais confiável (DECODON, 2013).

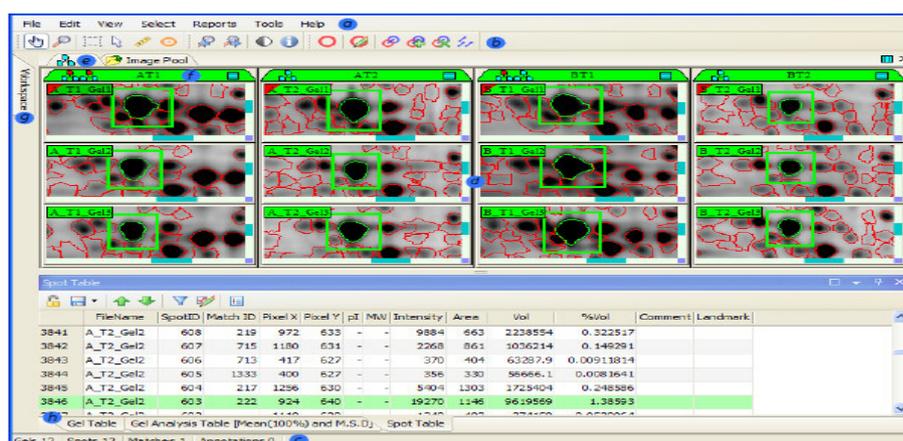
Dymension é um software revolucionário que pode analisar uma imagem típica de gel 2D rapidamente. Ele apresenta novos algoritmos para a subtração de fundo, filtragem de ruído, alinhamento preciso, detecção de ponto, correspondência rápida, além de ter reduzido o tempo de edição da imagem. Usando seu algoritmo de detecção de ponto, Dymension localiza instantaneamente e analisa spots de proteínas, tornando-se o pacote de software mais rápido disponível no momento para análise de gel 2D. (<http://www.syngene.com/dymension/>. Acessado em 21/02/2014).

No entanto, o pacote de software mais acessível para a maioria dos pesquisadores em proteômica é o ImageMaster, este é um programa desenvolvido pelo Instituto Suíço de

Bioinformática em colaboração com o GeneBio e a GE Healthcare. O ImageMaster 2D Platinum é alimentado pelo software inovador e amplamente utilizado em análise de gel, o Melanie. Ele simplifica e melhora a análise de géis 2D e a identificação de marcadores de proteína de interesse (BJÖRKGATAN, 2008) (Figura 2).

A espectrometria de massas é uma técnica antiga que veio se desenvolvendo com o passar do tempo e hoje é muito importante na descoberta de novas drogas, na caracterização de proteínas, e até mesmo no diagnóstico de doenças. O avanço desta tecnologia de análises de biomoléculas foi possível, graças a uma junção de conhecimentos ramificados da física, química e nas últimas duas décadas da biologia (CAÑAS *et al.*, 2006).

Figura 2 – Janela da interface do ImageMaster 7.0



Fonte – Manual do usuário do programa ImageMaster versão 7.0

A história da espectrometria de massas iniciou-se com Joseph John Thomson, da Universidade de Cambridge, quando o mesmo fez estudos investigativos experimentais sobre a condução de eletricidade pelos gases que levou à descoberta do elétron em 1897 e, assim, na primeira década do mesmo século, a construir o primeiro espectrômetro de massas (chamado então de parábola espectrógrafa), em que os íons eram separados por suas diferentes trajetórias parabólicas em campos eletromagnéticos, e sua detecção era realizada por íons marcados com substância fluorescente em tela ou placa fotográfica (BORMAN, 2003).

Atualmente a espectrometria de massas é uma técnica que está em ampla ascensão

e atualmente estamos na era de inovações tecnológicas da mesma, relacionando com estudos de diversas moléculas biológicas (lipídeos, carboidratos, proteínas, compostos fenólicos e etc.). A instrumentação utilizada para a técnica de MS (Espectrometria de Massas) é o espectromômetro de massas, aparelho que é constituído de uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (CANTÚ *et al.*, 2008).

No início, a utilização da técnica não era aplicada a macromoléculas como as proteínas, pois estas não eram fáceis de ionizar e, assim, formar íons intactos, e por suas características de grande polaridade poderiam facilmente ocorrer fragmentações e decomposição das mesmas (CAÑAS *et al.*, 2006).

O aparelho de espectrometria de massas separa e detecta os íons em fase de gás e, por conseguinte, antes que ocorra qualquer separação por MS, as moléculas devem ser ionizadas e convertidas a gás utilizando técnicas diferentes (DASS, 2007). De uma maneira geral o espectrometro de massas é um equipamento que mede a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (GROSS, 2004).

No espectrometro de massas são realizados separações de íons que são influenciados por campos elétricos ou magnéticos gerados dentro do próprio instrumento que servem para agir na trajetória espacial, velocidade e direção das moléculas ionizadas desde a parte do analisador até a parte do detector. Os efeitos de um campo eletromagnético sobre o movimento dos íons em um ambiente a vácuo é inversamente proporcional a sua massa e diretamente proporcional a sua carga elétrica (CAÑAS *et al.*, 2006).

As primeiras técnicas de ionização utilizadas para as proteínas foram a (FAB) Bombardeamento atômico rápido (BARBER *et al.*, 1981), (PD) dessorção por plasma (MCFARLANE, 1983) e termodifusão (BLAKLEY, 1983). Atualmente a MS é a principal ferramenta para estudos proteômicos.

Temos como fontes de ionização mais utilizadas em espectrometria de massas para análises proteômicas a ionização por Electrospray (ESI) e dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI), que tanto ionizam as moléculas como fazem a dessovaltação em fase gasosa das mesmas (LAIKO *et al.*, 2000).

Na ionização do tipo ESI o que ocorre é que quando se aplica uma voltagem elevada ao líquido que flui através de um tubo capilar estreito, no qual se formam pequenas gotículas carregadas e uma pulverização; destas que auxilia no processo de evaporação até que o número de cargas em sua superfície torna-se muito elevada e ultrapasse o limite de Rayleigh, formando o denominado cone de Taylor. Em seguida, elas explodem novamente formando micro-gotas ainda menores (WHITEHOUSE, 1985). O limite de Rayleigh constitui

no máximo de densidade de carga que uma gotícula pode suportar, até que, por ação da força de repulsão de Coulomb, é superada a tensão superficial e ocasione uma explosão da gotícula, formando novas gotículas cada vez menores (RAYLEIGH, 1882). Este processo é repetido várias vezes até que analitos ionizáveis presentes na solução de microgotas escape e sofram dessolvatação na interfase do tubo, contido dentro do espectromêtro de massas, em seguida são direcionados de um capilar aquecido com nitrogênio quente ou contracorrente elétrica para o analisador de partículas (WHITEHOUSE, 1985).

No sentido de evitar a formação de aduto com sais ou detergentes, presentes na amostra ou analito a ser ionizado por ESI, estes podem ser previamente purificados através de colunas cromatográficas de fase reversa (WHITEHOUSE, 1985). Vale ressaltar que os íons gerados por ESI são multiplamente carregados, o que faz ser uma vantagem no que diz respeito à energia de ativação necessária a protonação de um determinado analito.

A ionização do tipo MALDI se baseia na absorção de energia através de uma matriz orgânica por um feixe de luz sob-radiação ultravioleta (UV) denominado de laser, que permite a vaporização de moléculas biológicas não voláteis. Estas matrizes são em sua maioria ácidos orgânicos sólidos, cujo comprimento de absorção de onda é próximo ao do laser utilizado na ionização dos analitos (KARAS, 1988; MANN *et al.*, 2001).

Segundo Mann e colaboradores (2001) a função da matriz é de impedir a degradação da amostra pela força do laser, bem como de absorver e transferir a energia para o analito, auxiliando assim no processo de ionização do mesmo, sendo ainda de extrema importância para estudos de espectrometria de massas de moléculas protéicas.

Na ionização do tipo MALDI, a matriz e a amostra são misturadas no solvente apropriado, geralmente um ácido, e depositada sobre uma placa, que normalmente analisa dezenas a centenas de amostras por vez. O solvente é deixado evaporar e co-cristalizar juntamente com as moléculas de analito embutidas na matriz (KARAS, 2000). A placa de MALDI é colocada no MS, sob alto vácuo, quando a placa é atingida pelo feixe de laser pulsante, a energia é absorvida pela matriz, e o que é parcialmente vaporizado e transportado são as moléculas do analito intacto que se transportam para a fase gasosa (HILLENKAMP *et al.*, 1991).

Deste processo se resulta uma pluma de MALDI que contém prótons que serão trocados entre os analitos e formarão moléculas monocarregadas positivamente ou negativamente, no processo que ainda não é bem entendido pela comunidade científica (KARAS, 2000).

As matrizes mais utilizadas para análises proteômicas por MALDI são o ácido

sinapínico e α -ciano-4-hidroxicinâmicos, embora o ácido 2,5-dihidroxibenzóico seja frequentemente utilizado no mapeamento de peptídeos (BILLECI, 1993).

O analito, após ser ionizado, será encaminhado a outro compartimento do espectrômetro de massas, denominado de analisador. Os analisadores mais utilizados em estudos proteômicos são: o quadrupolo, o tempo de voo (TOF), e armadilha de íons (YATES, 1998; MCLUCKEY, 2001). Dentre tais, o mais comum é o do tipo TOF (Time-of-Flight), na qual os íons são fortemente submetidos a um campo elétrico que os força a entrar em um tubo analítico de comprimento conhecido e percorrem a uma velocidade proporcional a sua relação m/z em direção ao detector. Com isso, ocorre a separação dos íons segundo m/z com o tempo que o mesmo leva para percorrer o tubo (WYSOCKI *et al.*, 2005).

No analisador do tipo quadrupolo, o analito é separado devido a um campo elétrico criado por quatro hastes paralelas, que têm uma seção hiperbólica ou cilíndrica amplamente usada (LEARY, 1996). Os quadrupolos possuem hastes opostas que são eletricamente conectadas em duas correntes de tensões contínua (DC) e uma frequência de rádio (RF) de corrente alternada (AC). As hastes contíguas têm polaridade oposta DC e uma corrente alternada fora de fase entre elas gerando assim um campo elétrico de voltagem que é controlada de acordo com o interesse do pesquisador (STEEL, 1998).

Dentro deste campo elétrico oscilante, os íons descrevem trajetórias complexas e somente aqueles com trajetórias estáveis vão viajar ao longo do quadrupolo até atingir o detector. Quando as tensões (DC) e (RF) são aumentadas, mantendo as suas realções constantes, os íons com valores crescentes de razão m/z são selecionados e encaminhados aos detectores (LEARY, 1996).

Os analisadores do tipo armadilha de íons funcionam aprisionando os íons analitos dentro por campos elétricos tridimensionais, e estes podem ser analisados quantas vezes o pesquisador necessitar (YATES, 1998).

A identificação das proteínas foi por muito tempo realizado através das técnicas de Degradação de Edman e pela utilização de anticorpos monoclonais, no entanto, a primeira requer muito tempo de análise, e a segunda é rápida e sensível, porém, requer a disponibilidade de um grande conjunto de sondas de anticorpos específicos. Com o advento de equipamentos contendo a ionização MALDI associado ao analisador por tempo de voo (MALDI-TOF) foi possível identificar uma grande quantidade de proteínas em pouco tempo de análise. Segundo Thiede e colaboradores (2005), a técnica de Impressão digital de massas peptídicas (PMF) se baseia no conceito de que se uma proteína é digerida com uma enzima que apresenta uma dada especificidade de sequência, ela gera um conjunto de fragmentos com

massas únicas e previsíveis, que podem ser considerados uma espécie de “impressão digital” da proteína, na qual os produtos da clivagem são analisados no espectrômetro de massas.

Neste experimento, os dados obtidos experimentalmente, chamados de espectros de fragmentação, podem ser comparados com massas teóricas obtidas através de uma clivagem *in silico*, utilizando-se de sequências presentes nos bancos de dados (HENZEL *et al.*, 2005). Neste sentido, existem vários algoritmos utilizados para a busca de sequência em bancos de dados com espectros provenientes de análises de MS/MS não processados, como por exemplo, Mascot, Sequest, PeptideSearch, ProteinProspector e Sonar MS/MS (MANN *et al.*, 2001).

O Mascot é um servidor de pesquisa público e gratuito onde são realizadas pesquisas de identificação de proteínas de sequência primária por dados de espectrometria de massas através de PMF (Peptide Mass Fingerprint) em bancos de dados públicos (Figura 3) . (http://www.matrixscience.com/help/pmf_help.html)

A primeira escolha que você tem que fazer é qual banco de dados para pesquisa se deve utilizar, deste modo, o site público gratuito tem apenas algumas das bases de dados públicas mais populares, mas um servidor em casa pode ter uma centena ou mais. Alguns bancos de dados contêm sequências de um único organismo. Outros contêm entradas de vários organismos, mas geralmente incluem a taxonomia para cada entrada, de modo que as entradas para um organismo específico pode ser selecionado durante uma pesquisa usando um filtro de taxonomia. (http://www.matrixscience.com/help/pmf_help.html)

Os bancos de dados mais utilizados para pesquisa de PMF na plataforma Mascot é o SwissProt e o NCBIInr. No entanto alguns outros parâmetros devem ser pré-estabelecidos para se realizar uma determinada busca de informações na plataforma do Mascot.

O SwissProt consiste em uma seção do banco de dados UniProt que trabalha em colaboração entre o Instituto Europeu de Bioinformática, o Instituto Suíço de Bioinformática e o Recurso de Informações de Proteínas. O Swiss-Prot (criado em 1986) é um banco de dados de alta qualidade de sequências de proteínas não redundante, anotados manualmente, que reúne os resultados experimentais, os recursos apurados e conclusões científicas. (www.uniprot.org)

Figura 3 – Janela do servidor Mascot. Mostrando a sequência de todo os parâmetros a serem preenchido para se realizar a busca de uma proteína em bancos de dados.

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Fernando Email: nandopesca2007@yahoo.com.br

Search title:

Database(s): **SwissProt** (dropdown) Enzyme: Trypsin (dropdown)

NCBIInr
contaminants
cRAP

Allow up to: 1 missed cleavages

Taxonomy: All entries (dropdown)

Fixed modifications: --- none selected --- (dropdown) > < Acetyl (K)
Acetyl (N-term)
Acetyl (Protein N-term)
Amidated (C-term)
Amidated (Protein C-term)
Ammonia-loss (N-term C)
Biotin (K)
Biotin (N-term)
Carbamidomethyl (C)
Carbamyl (K)
Carbamyl (N-term)

Display all modifications

Variable modifications: --- none selected --- (dropdown) > <

Protein mass: kDa Peptide tol. ± 1.2 Da (dropdown)

Mass values: MH⁺ M_n M-H⁻ Monoisotopic Average

Data file: Selecionar arquivo... Nenhum arquivo selecionado.

Query

Data input:

Decoy Report top: AUTO hits (dropdown)

Start Search ... Reset Form

Fonte: <http://www.matrixscience.com>

A anotação manual consiste de análise, comparação e fusão de todas as sequências disponíveis para uma determinada proteína, bem como uma revisão crítica da dos dados experimental associados. Os curadores do UniProt extraem informação biológica da literatura e realizam várias análises computacionais e assim dentro da seção UniProtKB / Swiss-Prot visam fornecer todas as informações relevantes sobre uma proteína particular. (www.uniprot.org).

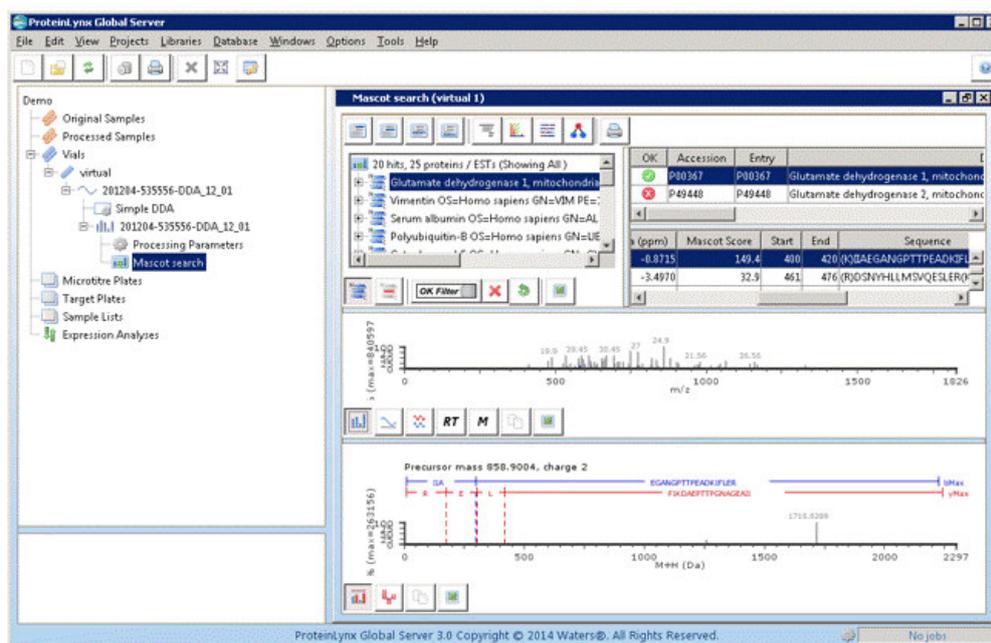
Com estas análises os curadores são capazes de descrever, em um único registro, os diferentes produtos derivados de uma proteína de um certo gene a partir de uma dada espécie, incluindo cada proteína derivada por splicing alternativo, polimorfismos e / ou pós-tradução modificações. Famílias de proteínas e grupos são regularmente revisados para manter-se com as descobertas científicas atuais.

O NCBIInr consiste no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), uma divisão da National Library of Medicine (NLM) dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América, é uma empresa líder na área de bioinformática que

fornece aos usuários uma ampla quantidade de informações e ferramentas de estudos de bioinformática que são registrados na literatura através de publicações on-line e depósitos de informações em bancos de dados como PubMed, PubMed Central, e GenBank (KENT, 2008).

O Sequest é um algoritmo utilizado para estudos proteômicos que auxilia na identificação de sequências de aminoácidos na base de dados que corresponde à massa do peptídeo medido por MS, além de realizar comparações entre os íons fragmentados por MS/MS gerando uma pontuação preliminar para cada sequência de aminoácidos (MOORE, 2002).

Figura 4 – Janela de exibição dos resultados do Servidor Global ProteinLynx (PLGs)



Fonte : Manual do usuário

A pontuação de correlação cruzada é dada a qualquer jogo de peptídeo (Xcorr). O sistema de pontuação é essencialmente probabilístico e opera através da estimativa de que uma identificação de proteínas surgiu por acaso. A probabilidade é baseada em o número de peptídeos identificados a partir da proteína, o número total de peptídeos identificados, e a fração de peptídeos trípticos distintos a partir da base de dados que se encontram presentes na proteína identificada (MOORE, 2002).

O Sequest correlaciona os espectros de massa em tandem não interpretado de peptídeos com sequências de aminoácidos a partir de bancos de dados de proteínas e nucleotídeos. O Sequest irá determinar a sequência de aminoácidos e, portanto, as proteínas dos organismos que correspondem ao espectro de massa a ser analisado (YATES, 1995).

3. PROTEÔMICA EM ALGAS

A maioria dos estudos de proteômica em algas concentra-se nas microalgas, estes estudos se destacam como forma de entendimento destes organismos a resposta a diferentes fontes de estresse ou sinais ambientais (ROLLAND *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2005) e questões relacionadas à taxonomia (WANG *et al.*, 2008), adaptações a realização de fotossíntese (WINCK *et al.*, 2012) e identificação de espécies potencialmente nocivas (VON *et al.*, 2009).

De acordo com o trabalho de Choi e colaboradores (2013), podemos perceber que além dessas vertentes de investigações proteômicas utilizando microalgas, foi relatado neste trabalho a diferença entre o perfil protéico de *Chlamydomonas reinhardtii* relacionado com o aumento de composição lipídica entre uma cepa selvagem e uma cepa mutante do organismo cultivado.

Quanto a estudos em macroalgas, existe uma grande escassez, devido a grande dificuldade em isolar, do material biológico algáceo, uma amostra somente de proteínas (WONG *et al.*, 2006). No entanto, pesquisadores do mundo todo vêm incentivando pesquisas proteômicas em macroalgas marinhas.

Segundo trabalho realizado por Wong, *et al.* (2006) observou-se o resultado de um estudo proteômico realizado na alga marinha de grande valor comercial *Gracilaria changii*, o qual se utilizou de diferentes métodos de extração proteica incluindo métodos de precipitação de proteínas para análise proteômicas.

Neste trabalho inicialmente, foram testados quatro metodologias de precipitação de proteínas, incluindo a por ácido tricloroacético e acetona, a lise direta usando tampão de úrea, tampão Tris e extração com fenol e clorofórmio, sendo comparados quanto ao sua melhor performance no gel de eletrofoorese bidimensional (2-DE) O método do fenol e clorofórmio de proteínas apresentou-se como a melhor metodologia pois obteve a melhor resolução de 2-DE das proteínas. através de espectrometri de massas foi possível identificar proteínas pigmentares, enzimas metabólicas e transpotadoras de íons (WONG *et al.*, 2006).

Recentemente temos relatos de trabalhos proteômicos em alga marron como a *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) na qual foi verificada a correlação entre as diferentes proteínas expressas nesta alga e o efeito da sazonalidade dentro do ambiente em que elas vivem (YOTSUKURA *et al.*, 2010).

Outro trabalho sobre proteômica de algas marinhas marrons foi descrito por Contreras e colaboradores (2010), onde foi possível identificar novas proteínas envolvidas na

tolerância de cobre na alga marinha *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae), na qual este organismo foi cultivado em água do mar, sem cobre (amostra controle) ou suplementado com o metal a $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

Segundo estudos realizados por Kim e colaboradores (2008), abordagens proteômica também podem ser realizadas em análise de caracterização genética através de perfis de proteínas em mapas de eletroforese bidimensional que diferenciam grupos de macroalgas vermelhas da espécie *Bostrychia radicans*, permitindo um caráter de diferenciação taxonômica entre espécies.

Perfis de proteína, determinados por estudos proteômicos, podem ser utilizados para identificar as proteínas marcadoras de uma determinada situação de vida do organismo algal, tais como aqueles que respondem a alterações no ambiente, como temperatura, salinidade e etc, isso leva a uma alteração em seu crescimento podendo ser anormal ou não (YOTSUKURA, 2012).

O entendimento do metabolismo das algas é de extrema importância para a compreensão das várias funções que estes organismos podem ter na área de biotecnologia, ou seja, na produção de compostos bioativos e biocombustíveis, bem como a sua utilização em sistema de biorremediação e na aquicultura integrada. Neste sentido, a proteômica é cada vez mais vista como uma importante ferramenta biotecnológica (NGUYEN *et al.*, 2011).

Considerando a carência de estudos sobre proteômica em algas marinhas e em especial da carragenófito *Hypnea musciformis*. O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver metodologias de separação de proteínas de extrato protéico de *Hypnea musciformis* e identificar as proteínas expressas pelo organismo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Coleta da alga marinha

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, espécie pertence à Família *Hypneaceae*, Ordem *Gigartinales*, Divisão *Rhodophyta* foi coletada na Praia de Pacheco, Caucaia – CE durante as marés de sizígia, no mês de novembro de 2012.

O material foi transportado em sacos plásticos e, no laboratório, foi lavado em água corrente seguida de água destilada para remoção de sal da água do mar. Posteriormente, a alga foi macerada em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até obtenção de um fino pó e armazenada em freezer -20°C.

Figura 5 – Imagens da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*



Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 – Extrações das proteínas totais

A extração das proteínas totais da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de WONG *et al.*, (2006). Aproximadamente, 100 mg de alga macerada foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL contendo tampão Tris-HCl pH 8,8 com NaCl 0,15M e deixada sob agitação por 4 horas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 9.000 xg a 4°C por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o

sobrenadante armazenado para uso em etapas posteriores.

4.3 - Fracionamento proteico com sulfato de amônio

A fim de remover os contaminantes da amostra e concentrar as proteínas, o extrato protéico foi fracionado através do método de precipitação de proteínas com sulfato de amônio, em diferentes concentrações (GE Healthcare, 2004). Para isso, o volume de extrato total foi medido, adicionado em um béquer e deixado em agitação constante (agitador magnético Fisaton). Em seguida, foi adicionado lentamente, sulfato de amônio (113g de sulfato de amônio por litro de solução) correspondente a 0-20% de saturação final.

O material foi deixado sob agitação lenta por 1 hora para solubilizar completamente o sal, seguido de repouso por 4 horas a 4°C para precipitar parte das proteínas presentes no extrato proteico. Posteriormente, o material foi submetido à centrifugação 9.000 x g por 10 minutos a 4°C.

O precipitado denominado de Fração 0-20 foi ressuspendido em 5 mL de tampão Tris-HCl 40 mM pH 8,8 com NaCl 0,15, seguido de diálise exaustiva contra água deionizada. O sobrenadante teve seu volume medido e foi submetido a uma nova etapa de precipitação de proteínas com sulfato de amônio (121g de sulfato de amônio por litro de solução), correspondendo a 20-40% de saturação. O processo de precipitação prosseguiu como descrito anteriormente, sendo obtidas as seguintes frações: Fração 0-20 (113g de sulfato de amônio por litro de solução), 20-40 (121g de sulfato de amônio por litro de solução), 40-60 (130g de sulfato de amônio por litro de solução), 60-80 (140g de sulfato de amônio por litro de solução) e 80-100 (152g de sulfato de amônio por litro de solução). Após diálise exaustiva contra água deionizada, cada fração foi centrifugada 9.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi liofilizado para posterior utilização.

4.4 – Quantificação de proteínas totais

A concentração das proteínas solúveis presentes no extrato total foi determinada segundo método de Bradford (1976). Para isso, 100 µL de amostra foi adicionado a 2,5mL do

reagente de Bradford. O material foi deixado em repouso por 20 minutos e posteriormente foi submetido à medida espectrofotométrica em comprimento de onda de 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O valor absorvância foi comparado a uma curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações.

As proteínas solúveis presentes nas frações protéicas obtidas por sulfato de amônio foram pesadas após liofilização.

4.5 – Eletroforese unidimensional

Para avaliar a qualidade do material proteico (do extrato total e frações proteicas) foi realizada eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) utilizando sistema desnaturante descontínuo de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptado para placas verticais. A eletroforese foi realizada no sistema vertical Mini-PROTEAN 8.6 x 6.7 x 0.1 cm (Biorad).

Para a confecção do gel de aplicação da amostra ou *stacking gel* foi utilizado (4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8); o gel de separação ou *resolving gel* foi constituído por (12% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8).

A amostra protéica foi solubilizada em tampão na concentração final de 4mg/mL (tampão Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, contendo glicerol 5%, SDS 2%, azul de bromofenol a 0,05%) contendo 2 μ L de β -mercaptoetanol. O material foi submetido a desnaturação por calor a 100°C por 5 minutos e centrifugado a 9.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para realização da eletroforese, sendo 60 μ g de amostra aplicados no gel.

O marcador de peso molecular (GE Helathcare) utilizado consistiu na seguintes proteínas: 97 kDa (fosforilase b), 66 kDa (albumina), 45 kDa (ovoalbumina), 30 kDa (anidrase carb6nica), 21 kDa (inibidor de tripsina) e 14,4 kDa (α -lactoalbumina), sendo 8 μ L aplicados no gel.

A corrida eletroforética foi realizada com auxílio de tampão de corrida apresentou Tris 0,025M, Glicina 0,192M pH 8,3 e SDS 0,1%, onde o preparo da amostra foi feito a uma concentração de 4 mg/mL, onde cada amostra liofilizada foi dissolvida em tampão de amostra (Tris-HCl 0,08M pH 6,8, contendo glicerol 5%, SDS 2%, e 0,05% de azul de bromofenol) contendo 2 μ L de β -mercaptoetanol. Cada material foi aquecido e desnaturado em banho

maria a uma temperatura de 100°C por 5 min. O material foi centrifugado por 2 minutos a temperatura ambiente a 5.000 x g e 15 µL de cada amostra foram aplicadas no gel PAGE-SDS confeccionado, em potência 150 V, com corrente constante de 30 mA e 10 W (fonte BioRad) durante 1 hora e 10 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi deixado em repouso em solução de Comassie Brilliante Blue R-250 a 1% em metanol: ácido acético:água (40:10:60) por 18 horas.

Posteriormente, uma solução descorante composta de 40% de etanol e 20% de ácido acético em água destilada foi utilizada para remover o excesso de corante depositado no gel. Sucessivas lavagens com solução descorante foram feitas no gel, até a visualização de bandas protéicas.

4.6 - Preparo da amostra para eletroforese bidimensional

As amostras protéicas, antes de serem submetidas a eletroforese 2-DE, foram tratadas com o “2D Clean-Up Kit”. A fração protéica de *Hypnea musciformis*, após liofilizada, foi pesada 1 mg em um micro tubo e ressuspendido em 100 µL de uréia/tiorúeia. A esta mistura foi adicionada 300 µL da solução precipitante do kit, agitado durante 3 minutos no modo contínuo e com velocidade de 600 x g e deixado em repouso e em gelo durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 300 µL da solução co-precipitante do kit, o material foi então misturado manualmente, e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4°C.

Posteriormente, foi removido o sobrenadante e centrifugado novamente nas condições anteriormente descritas, e realizada a remoção de resíduos de sobrenadante. Após este procedimento, foi adicionado 40 µL de co –precipitante no topo do “pellet” e deixado em repouso durante 5 minutos em gelo, depois o material foi centrifugado a 12000 x g, 5 minutos e 4 °C e descartou –se o sobrenadante. Ao “pellet” foram adicionados 25 µL de água deionizada, 1 mL da solução “*wast buffer*” do kit acompanhados de 5 µL da solução “*wast additive*” do mesmo, agitando-se durante 20 a 30 segundos e deixado em repouso durante 10 minutos, depois este foi centrifugado a 12000 x g, 5 minutos e 4°C e o sobrenadante descartado. Este último procedimento foi realizado 3 vezes e por fim deixado 10 minutos evaporando para secar e posterior utilização da amostra na reidratação (primeiro procedimento da etapa de focalização).

4.7 – Focalização isoeétrica

Os géis de SDS - PAGE foram preparados através do procedimento experimental de eletroforese bidimensional descrito por Shagger (1987) com adaptações. Esta metodologia seguiu inicialmente cinco etapas bem diferentes, para obtermos no final do processo uma boa resolução das proteínas. As etapas podem ser indicadas como: 1) a reidratação das fitas de gel (DryStrip`s); 2) a focalização isoeétrica (1ª Dimensão); 3) o equilíbrio das fitas de géis (DryStrip`s) com um tampão contendo solução de Tris HCl 50 mM, glicerol 87%, uréia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol; 4) eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE (2ª Dimensão) e 5) a revelação dos géis.

As fitas de DryStrip`s utilizadas na reidratação da amostra protéica possuíam intervalo de pH de 4-7 e 11 centímetros de comprimento, estas eram do tipo IPG (Gradientes imobilizados de pH) linear.

Ao pellet protéico, que foi originado do procedimento de limpeza com o kit “2D Clean-Up Kit” da GE, foram adicionados 300 µL de solução tamponante e de re- hidratação contendo Uréia 7 M, Tiouréia 2 M, DTT 65 mM, IPG buffer 0,5% de pH 3-10, CHAPS 0,5% e traços de azul de bromofenol. Em seguida, as fitas de pH foram embebidas com esta solução protéica e acondicionadas em temperatura ambiente dentro dos “*strip holder*” (suportes de porcelana que acomodam os géis com sua solução protéica) durante 18 horas.

Posteriormente, foi adicionado ao “*strip holder*” 1 mL de óleo mineral sobre as fitas afim de impedir a evaporação e desidratação da amostra durante o processo, além de evitar a cristalização da uréia. O material foi então deixado em repouso sob temperatura ambiente por 16 horas. A focalização isoeétrica ocorreu logo após a re-hidratação.

Os “*strip holder*” foram levados ao aparelho de focalização ETTAN™ IPGphor III™ da GE Healthcare os quais foram submetidas a uma programação de uma série de voltagens por períodos de tempo diferentes conforme expresso na tabela 1.

Tabela 1 : Parâmetros de voltagens utilizados para a corrida da 1º dimensão.

PASSOS	MODALIDADES	VOLTAGEM (V)	TEMPO (h)
1	Step	200	1
2	Step	500	1
3	Step	1000	1
4	Gradiente	5000	1
5	Step	5000	1
6	Gradiente	8000	0,5
7	Step	8000	2,25
8	Step	150	20

4.8- Eletroforese bidimensional

Logo após a focalização isoeletrica as fitas foram submetidas a 2º dimensão, onde as mesmas foram previamente equilibradas com uma solução contendo Tris HCL pH 8,8 1,5 M, Glicerol 87%, Uréia 6,0 M, SDS 2%, traços de azul de bromofenol e água deionizada, adicionado de 57,8 mg de DTT (Ditiotreitol) e posteriormente 69,3 mg de IAA (Iodoacetamida) em intervalos de 15 minutos de um para o outro.

Em seguida, foi realizada a segunda dimensão em gel de poliacrilamida SDS – PAGE 12%. O marcador molecular padrão consistiu de proteínas com peso molecular conhecido, a saber: 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 21 kDa e 14 kDa.

A solução de corrida consistiu em SDS a partir da diluição do tampão 10x concentrado que era composto de Tris-HCl 0,25M pH 8,8, Glicina 1,92M, SDS 1% e água deionizada. A corrida foi realizada sob os seguintes parâmetros: 300 V, 40 mA e 20 W. Após a corrida os géis foram retirados das placas de vidro, fixados e corados com 5ml do corante Coomassie Blue G-250 (Blue silver) por 72 horas e por fim descorados para analisar a presença de proteínas separadas no gel.

4.9 – Digitalização e análise dos géis

Os géis foram scaneados em equipamento digitalizador (ImageScanner III- GE), e foram obtidas imagens em formato de arquivo “*mel*”, as imagens obtidas em duplicata foram analisadas pelo programa Image Master versão 7.0. Para obtenção dos dados foram realizados, basicamente, quatro etapas de processamento dos arquivos dos géis: melhora da imagem dos géis e detecção dos spots, criação de *matches*, criação de classes e obtenção dos resultados dos dados gerados pelo processamento.

4.10 – Digestão enzimática de proteínas em gel

A digestão enzimática foi realizada tal como anteriormente descrita por SHEVCHENKOVIN *et al.* 2006, onde inicialmente foi realizada a excisão das bandas com auxílio de uma ponteira e transferido para placas de 96 poços com 100 µL de água deionizada para posterior digestão enzimática.

Nas placas de 96 poços seguiu-se com o descoramento da amostra utilizando para isso o robô Digester. Para descorar foram realizados três ciclos de adição e retirada de 100 µL da solução 100 µM de Bicarbonato de amônio (B.A) com acetonitrila (ACN) (1:1 v/v), a cada ciclo as placas foram deixadas sob agitação por 30 minutos em mesa agitadora e posterior recolhimento do sobrenadante dos poços da placa. Logo após foi adicionado 100 µL ACN 100% e as placas foram então secas no *speed vac*.

O gel descorado, após o procedimento de secagem anteriormente descrito, foi então submetido à digestão com a enzima tripsina (Tripsina Promega), a qual foi ativada com B.A 10 mM, com ACN 10% e deixada em repouso e contato, durante 16 horas a 37°C, com as proteínas contidas no pedaço de gel.

Em seguida, foi realizada a remoção dos peptídeos (sobrenadante) utilizando novamente o robô Digester, com sucessivas lavagens com ácido fórmico 5% com 50% de ACN sob agitação por 15 minutos. Após a extração peptídica, os poços das placas foram secos no *speed vac*.

4.11- Preparo de amostra para ionização em fonte MALDI

Na seqüência do procedimento experimental os peptídeos foram transferidos para as placa de MALDI, onde foi adicionado ao poço da placa de limbo com 5 μL de ácido trifluoacético (TFA) 0,1% e aliqotado 1 μL na placa de MALDI, juntamente com a solução saturada de matriz ácido α -cyano-4-hydroxycinnamico em 50% de acetonitrila contendo ácido trifluoroacético 0,1% na proporção de 1:1., utilizando como amostra de referência o peptídeo [Glu]-fibrinopeptídeo B (20 fmol/ μL) de m/z 1570,57. Em seguida inseridas no espectrômetro de massas híbrido da Waters.

O espectrômetro de massas SYNAPT HDMS – Waters Corp foi operado com voltagem de 20 kV, analisador refletor ajustado em modo V com resolução de 10.000 e precisão de 3 ppm. A varredura de massa dos peptídeos foi na faixa m/z de 300 a 3.000. Para os experimentos de MS/MS a faixa de m/z utilizada foi de 50 a 3000. Os dados coletados foram processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp.) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os peptídeos de m/z comuns a outras proteínas foram identificados por busca em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos nos programas ProteinLynx 2.4 (Waters Corp.) e MASCOT (Matrix Science).

4.12 – Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) - ESI

Os peptídeos obtidos das digestões proteolíticas que ionizaram melhor por MALDI foram novamente injetados em um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra-performance (nanoAcquity, Waters Corp. Milford, USA) acoplado a uma fonte de nano electrospray de um espectrômetro de massa (Synapt HDMS, Waters Corp., Milford, USA). Os peptídeos foram previamente separados por cromatografia fase reversa em coluna C18 (75 μm x 100 mm), eluída com um gradiente partindo de 10% a 85% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, antes da análise por MS/MS.

O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 °C e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos foram realizados utilizando a função DDA (*Data Dependent Acquisition* – Aquisição Dependente de Dados) onde os íons

precursores com carga entre +2 e +4 foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (*Collision Induced Dissociation* – Dissociação induzida por colisão), utilizando argônio como gás de fragmentação. O instrumento foi previamente calibrado com fragmentos do íon duplamente carregado do [glu1]-fibrinopeptideo B (m/z 785.84) gerados por CID enquanto que a correção de massas realizadas durante os experimentos foi realizada com este íon intacto. Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v 4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v 2.4 (Waters Corp).

4.13 – Identificação de proteínas

Os peptídeos com sequência de aminoácidos comuns a outras proteínas foram identificados por buscas em banco de dados utilizando as ferramentas de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos ProteinLynx 2.4 (Waters Corp) e MASCOT (Matrix Science). Os peptídeos que não foram identificados por estes meios terão suas sequências determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *de novo*).

5.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o preparo do extrato total, vários protocolos da literatura foram testados. No entanto, muitos resultados foram insatisfatórios, no que diz respeito ao baixo rendimento de proteínas totais e alto rendimento de pigmentos. Wong e colaboradores (2006) testaram quatro diferentes metodologias de extração de proteínas totais para análise proteômica: 1: tampão Tris-HCl pH 8,8; 2: TCA/acetona/SDS; 3: tampão de lise e 4: TRI reagente. Uma adaptação da metodologia 1 de extração com tampão Tris-HCl foi realizada adicionando-se fracionamento das proteínas totais com sulfato de amônio como etapa posterior à extração proteica. Esta metodologia foi útil para concentrar as proteínas presentes no extrato proteico e fracionar os contaminantes da amostra, como pigmentos por exemplo. A tabela 2 mostra a quantidade de proteínas obtidas no extrato proteico e nas frações proteicas.

Tabela 2 – Quantificação de proteínas presentes no extrato proteico e frações (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100).

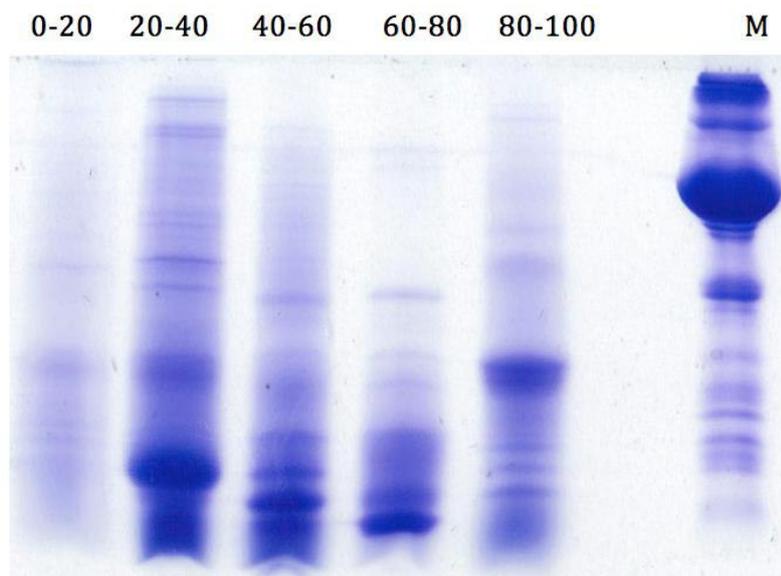
Amostra	Concentração de proteína (mg)	
Extrato proteico	-	276
Fração	0-20	15,6
	20-40	153
	40-60	82
	60-80	14
	80-100	183

Antes de prosseguir com a separação de proteínas utilizando eletroforese bidimensional é importante analisar a qualidade da amostra preparada. Para isso, as amostras foram submetidas a eletroforese unidimensional e analisada quanto a presença de bandas proteicas bem definidas ou não. A análise da eletroforese unidimensional de extrato proteico mostrou a formação de uma mancha (*background*) e ausência de bandas proteicas, indicando a presença de contaminantes, muito provavelmente pigmentos presentes no extrato proteico da alga (dado não mostrado).

Já as frações proteicas apresentaram bandas de proteínas bem definidas, que foram

utilizadas na separação multidimensional em 2DE-PAGE.

Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% das frações protéicas.



Poço 1: Fração 0-20%, Poço 2: Fração 20-40% , Poço 3: Fração 40-60%, Poço 4: Fração 60-80%, Poço 5: Fração 80-100% e Poço 6: marcador de peso molecular, com os seguintes pesos 97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa, 21kDa e 14kDa.

A técnica de fracionamento de proteínas com sulfato de amônio é pouco utilizada para o fracionamento protéico com objetivo de análise proteômica. No entanto, tornou-se necessário o uso desta técnica para remoção de contaminantes que impedia uma boa resolução de separação das proteínas expressas em *Hypnea musciformis*. Em 2008, Rhee e colaboradores utilizaram a técnica de fracionamento de proteínas por sulfato de amônio como meio de enriquecimento de proteínas extraídas da bactéria *Helicobacteri pylori* para estudos proteômicos (PARK, et al., 2008).

A literatura mostra que não existe uma metodologia padrão para o preparo de amostras para análise proteômica, sendo necessário utilizar inúmeras ferramentas de forma que se tenha ao final um *pool* rico em proteínas e livre de contaminantes (material não proteico) (KULAKOWSKA, et al., 2007). Muitos trabalhos de proteômica de alga relataram estudos comparativos de preparo de amostra proteica utilizando métodos como método do

fenol (CONTRERA, et al .2010), Tampão Tris-HCl, TCA/acetona (WONG, et al., 2006); (WANG, et al., 2009) e outros.

O trabalho da análise proteômica da macroalga *Ecklonia kurome* relatou a dificuldade no preparo de uma boa amostra devido aos altos níveis de interferentes (compostos não protéicos) na amostra, principalmente carboidratos. Como estratégia de remoção destes interferentes, os autores utilizaram etanol e fenol e relataram a obtenção de um extrato protéico de alta qualidade (NAGAI, et al., 2008).

Quanto à separação de proteínas no gel de poliacrilamida, o resultado da eletroforese unidimensional se refletiu de forma razoável na eletroforese bidimensional. Todas as frações foram solubilizadas em agentes caotrópicos e detergente, sendo que essa combinação contribui fortemente para a solubilização das proteínas de quase todas as frações. Isso foi concluído com base na presença/ausência e maior/menor quantidade de *spots* no gel.

Foi observado uma variação no número de *spots* apresentados nos géis. As frações com maior rendimento protéico foram acompanhadas de uma maior quantidade de *spots*. Nas frações de menor rendimento protéico como a fração 0-20 e a fração 60-80 foram observados pouco e ausência de *spots*, respectivamente. A quantidade de *spots* obtidos em cada fração pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Representação no número de spot por fração protéica.

Gel da Fração	Número de spots
0-20	28
20-40	115
40-60	56
60-80	0
80-100	96

O gel 2DE da análise proteômica da macroalga *Ecklonia kurome* apresentou uma maior quantidade de proteínas neutras, muito provavelmente pela estratégia de extração protéica escolhida (etanol/fenol). Neste trabalho, os autores relataram a identificação de 27 proteínas por análise em MALDI-TOF/TOF (NAGAI, et al., 2008). No presente trabalho foram extraídas proteínas ácidas, neutras e básicas, o que, *per si* ressalta uma maior performance no método de extração.

Os géis abaixo expressos na Figura 7, foram processados no programa ImageMaster e os *spots* enumerados com auxílio do *software*. Posteriormente, os spots foram excisados e submetidos à digestão proteolítica com tripsina (E.C. 3.4.21.4). Esta enzima é responsável pela catálise da ligação peptídica cujo aminoácido da cadeia lateral apresenta carga elétrica positiva (arginina e lisina). Dessa forma, os peptídeos resultantes da catálise adquirem carga positiva, o que contribui para a ionização dos peptídeos quando submetidos à análise pela técnica de espectrometria de massa.

Neste trabalho foi possível identificar algumas proteínas do proteoma da macroalga *H. musciformis*. Os resultados obtidos a partir da análise de peptídeos no espectrômetro de massas foram a identificação de proteínas com pI ácido, neutro e básico de baixo e alto peso molecular como a cadeia beta da R-ficoetrina, cadeia alfa de ficoetrina, laminina, cadeia beta de C-ficocianina (envolvidas na fotossíntese da alga), UDP glicosiltransferase (enzima envolvida na formação de glicolípios de membrana), 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (enzima envolvida na catálise da oxidação da 1-pirrolina-5-carboxilato em L-glutamato na presença de NAD), (Figura 8), 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfate sintase (enzima envolvida na catálise da reação de acilação e condensação entre carbono 2 e carbono 3 do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato para produzir 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato), chaperona, aspartato descarboxilase e fator de transcrição (Figura 7).

Os resultados referentes à identificação pelo ProteinLinx de 3 spots que foram separados por eletrospray da fração 20-40% da alga marinha *H. musciformis* estão elencados nas Tabelas 4, 5 e 6. Esses spots estão representados na Figura 8.

Tabela 4 – Identificação e característica do spot 25 da fração 20-40% da alga marinha *H. musciformis* mostrado na figura 8.

Proteína	Massa	Peptídeo	Seqüência
Nº do spot no gel	Molecular Observada	Identificado	
25	1589.7939	T1_795.90	TEYLALGVALVTGQR
	1465.6580	T2_734.85	CAVAFLNNTASER
	854.3578	T3_428.19	FLDAFSR
	1191.6423	T4_597.33	LLNYSLVTTGGR
	814.4318	T5_408.22	DGELLLR
	1762.8042	T6_882.42	FPSSSDLESVQLPSDR

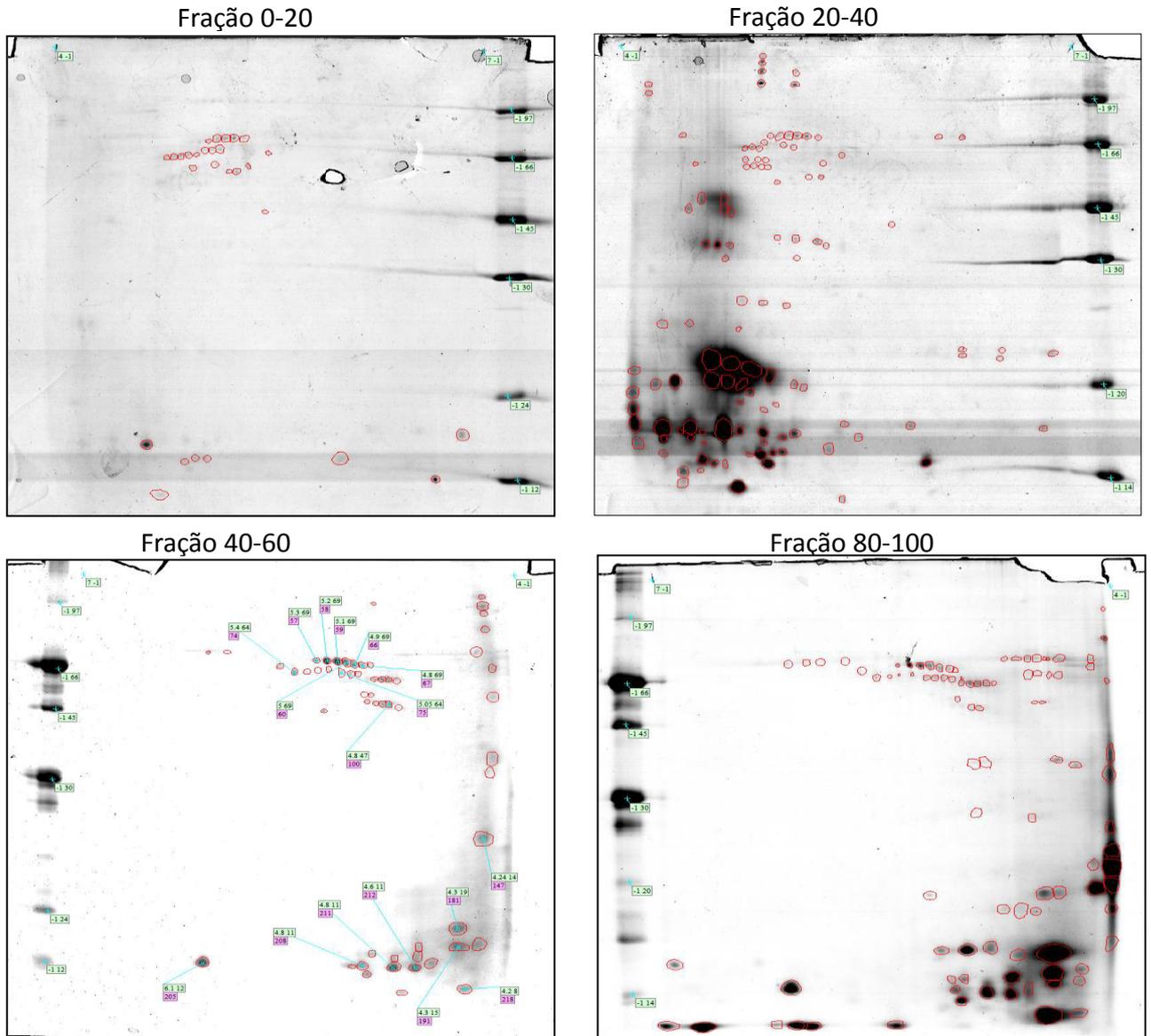
Tabela 5 – Identificação e característica do spot 15 da fração 20-40% da alga marinha *H. musciformis* mostrado na figura 8.

Proteína	Massa	Peptídeo	Seqüência
Nº do spot no gel	Molecular Observada	Identificado	
15	1286.6147	T1_644.32	LYGGSLVHQGEK
	1465.6978	T2_734.85	CAVAFLNNTASER

Tabela 6 – Identificação e característica do spot 13 da fração 20-40% da alga marinha *H. musciformis* mostrado na figura 8.

Proteína	Massa	Peptídeo	Seqüência
Nº do spot no gel	Molecular Observada	Identificado	
13	1286.5844	T1_429.87	LYGGSLVHQGEK
	1837.6987	T2_921.36	SCTAGDSCQCA YCGNK
	1464.7043	T3_489.24	AAYVGGSDLEDLKK
	1191.6423	T4_596.82	LLNYSLVTGGR
	1856.9233	T5_929.45	YVSYALLAGDSSVLEDR

Figura 7 – Eletroforese bidimensional de frações protéicas da alga marinha *Hypnea musciformis*.



A primeira dimensão foi realizada em fitas de pH de 4-7 de 11cm e seguindo os passos: Step – 200V; 1H; Step – 500V; 1H; Step – 1000V; 1H; Grad – 5000V; 1H; Step – 5000V; 1H; Grad – 8000V; 30 min; Step – 18000Vhr. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5 %. As amostras foram tratadas com o *Clean Up* kit (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado em cada gel foi constituído de proteínas com as seguintes massas: 97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa, 24kDa, 12kDa. Os géis foram corados com Comassie Colloidal G250.

Figura 8 – Foto do Gel (15%) de poliacrilamida da Fração 20-40% com fita de pH 3-10 de 11 centímetros da alga marinha *Hypnea musciformis* que foram submetidos a eletrospray (ESI);



Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 7 - Proteínas identificados pelo Mascot das frações protéicas da macroalga marinha *Hypnea musciformis*.

Código – SwissProt	Score	% de cobertura	Função da proteína	MW/pI	Fração	Spot	Proteína	Organismo
UGTP_STAEQ	76	16	Glicosiltransferase e envolvida na formação e biosíntese da membrana	45023/8,67	20-40%	1996	Processive diacylglycerol beta-glucosyltransferase	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
P5CR_SCHPO	71	12	Atividade catalítica	30261/6,63	20-40%	93	Pyrroline-5-carboxylate reductase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
DXS_DECAR	69	8	Catalisa a reação de condensação entre os Carbonos 2 e 3 do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, para se obter 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP)	66489/6,14	20-40%	494	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	<i>Dechloromonas aromatica</i>
TAGH_LACLA	71	13	Parte do complexo transportador ABC TagGH envolvido na exportação de Ácidos Teicóicos exportação. Responsável pelo acoplamento de energia para o Sistema de transporte de CC.	52351/9,25	40-60%	50	Teichoic acids export ATP-binding protein TagH	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
PAND_LEGPH	71	22	Catalisa a descarboxilação dependente de piruvato de aspartato para produzir beta-alanina	14823/5,9	80-100	313	Aspartate 1-decarboxylase	<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i>

6- CONCLUSÃO

O presente trabalho contribui para um enriquecimento na literatura de proteômica de macroalgas marinhas, contudo, necessita ser complementado pelo a realização do sequenciamento de *novo* para os peptídeos que não foram identificados. Este tem como conclusão principal a identificação de proteínas com pI ácido, neutro e básico de baixo e alto peso molecular como a cadeia beta da R-ficoetrina, cadeia alfa de ficoetrina, laminina, cadeia beta de C-ficocianina (envolvidas na fotossíntese da alga), UDP glicosiltransferase (enzima envolvida na formação de glicolípios de membrana), 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (enzima envolvida na catálise da oxidação da 1-pirrolina-5-carboxilato em L-glutamato na presença de NAD), presentes na fração 20-40% da macroalga marinha identificadas por eletrospray e algumas proteínas identificados pelo Mascot das demais frações, na qual infere que a metodologia de extração de proteína seguida de um fracionamento por sulfato de amônio é eficaz para a separação e identificação de proteínas da *H. musciformis*.

Referências Bibliográficas

(<http://www.highbeam.com/doc/1G1-105517210.html>) Acessado em 21 02 2014.

(http://www.matrixscience.com/help/pmf_help.html. Acessado em 15/07/2014)

(<http://www.syngene.com/dimension/>. Acessado em 21 02 2014).

(www.uniprot.org) Acessado em 15/07/2014

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Eletroforesis*, 18: 533-537. 1997.

ANDERSON, R. A.. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Pages 29 64*.1996.

BALAMURUGAN M. *et al.* Biochemical Study and GC-MS Analysis of *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 8 (3), p.117-123, 2013.

BARBER M, BORDOLI RS, SEDGEWICK RD, et al. Fast Atom Bombardment of solids (FAB). A new ion source for mass spectrometry. **J Chemistry Soc - Chemical Comm**, v.11, v. 325–7, 1981.

BHATTACHARYA, D.; T. HELMCHEN,; C. BIBEAU,;M. MELKONIAN. Comparisons of nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNAs reveal the evolutionary position of the Glaucocystophyta. *Molecular Biology and Evolution* 12: 415–420. 1995.

BILLECI T. M, STULTS J. T. Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Anal Chem**;v. 65:p. 1709–1176. 1993.

BJÖRKGATAN, A. B. *et al.* **ImageMaster 2D Platinum 7.0** - User Manual. GE Healthcare Bio-Sciences 30751 84 Uppsala Sweden, 2008.

BLAKLEY CR, VESTAL ML. Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*; p.55:750. 1983.

BOLD, H.C., WYNNE, M.J., 1985. Introduction to the algae structure and reproduction, second ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, 07632, pp. 1–33.

BORMAN, S.; RUSSELL, H.; SIUZDAK, G. A Mass Spec Timeline. **Chemistry Chronicles. Today's chemist at work**. p. 47-49, 2003.

CAMPO V. L., *et al.* Review Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 77 167–180, 2009.

CÁÑAS B.; DANIEL LÓPEZ-FERRER D.; RAMOS-FERNÁNDEZ A.; EMILIO

CAMAFEITA E.; CALVO E. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Briefings in functional genomics and proteomics**. v. 4, n. 4. p. 295-320. 2006

CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECOBERT, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. 2004. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, 285-298

CANTU, M. D; CARRILHO, E.; WULFF, N. A; PALMA, M. S; Sequenciamento de peptídeos usando **espectrometria de massas**: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS K.; DECKERS, P; RONY SWENNEN R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497–2507, 2005.

CHOI, Y. *et al.*, Comparative proteomics using lipid over-producing or less-producing mutants unravels lipid metabolisms in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioresource Technology**. 2013

CONTRERAS L, et al., Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). **Aquat Toxicol**; v. 96: p.85–89. 2010.

CORDEIRO, R. A., *et al.* Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n. 6 : p. 915-921, 2006.

CREMER, F, VANDEWALLE, C., *Anal. Biochem.*, v. 147, p. 22–26. 1985.

DASS, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. **Hoboken Wiley – interscience**. 2007

DECODON. Delta2D 4.4 Manual. www.decodon.com/files/doc/Delta2D_manual.pdf .2013

DUTT, M. J.; LEE, K. H. Proteomics analysis. *Current Opinion Biotechnology*, 11; 176-179. 2000.

FIGUEIREDO, J. G., et al., Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.96, p. 1-7, 2010.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. **Trends in Food Science and Technology**. 10, 25–28. 1999.

FONG P. Macroalgal-Dominated Ecosystems . **Nitrogen in the Marine Environment.**, cap 2. pág 218. 2008

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos.** [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GARBARY, D. J., AND P. W. GABRIELSON. Taxonomy and evolution. *In* K. M. Cole and R. G. Sheath [eds.], *Biology of the red algae*, 477–498. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1990.

GARRELS, J. I., SCHUBERT, D. Modulation of protein synthesis by nerve growth factor. **J. Biol. Chem.** v.254, p.7978–7985. 1979.

GE Healthcare Handbook, *Strategies for Protein Purification* 167 pp. 28-9833-31, 2004
GONZALEZ, F. R.; JORRIN-NOVO, J. V. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 1, p. 3-16, 2011

GÖRG, A. *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, Apr 2000.

GÖRG, A., WEISS, W., DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665–3685. 2004

GRAHAM, L. E., WILCOX, L. W. *Algae*. Prentice–Hall, Upper Saddle River, NJ, 640 pp., glossary, literature cited, and index. 2000

GROSS, J. H. *Mass spectrometry*. **Springer**, p. 518. 2004.

GUIST Jr. G. G., DAWES, C. J., CASTLE J. R. Mariculture of the red seaweed, *Hypnea musciformis*. **Aquaculture**, v. 28, p. 375-384. 1982.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **NATURE BIOTECHNOLOGY**, v. 17, p. 994 – 999, 1999.

HENZEL, W. J.; WATANABE, C.; STULTS, J. T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.14, p. 931-942, 2003.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 20, p. 660-663, 1999.

HILLENKAMP F, KARAS M, BEAVIS RC, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Anal Chem**; v. 63, p. 1193–1203, 1991.

HILLISON, C.I. *Seaweeds, a color-coded, illustrated guide to common marine* 1977. Plants of east coast of the United States, Keystone Books. The Pennsylvania State University Press, p. 1–5. 1977.

HOEK, V. C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to Phycology**. Cambridge: University Press, 623 p, 1995.

HOLDT, S. L., & KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied. Phycology*, 23, 543–597. 2011.

KARAS M, GLUCKMANN M, SCHAFER J. Ionization in matrix assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. **J Mass Spectrom**; v. 35, p.1–12. 2000

KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10 000 Daltons. **Anal Chem**, v.60, p. 2299–2301. 1988;

KIM G. H., SHIM J. B., KLOCHKOVA T. A. The utility of proteomics in algal taxonomy: *Bostrychia radicans*/*B. Moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) as a model study. *J. Phycol.* v. 44, p. 1519–1528. 2008.

KIM Y. K. *et al.*, Proteomic analysis of cadmium-induced protein profile alterations from marine alga *Nannochloropsis oculata*. **Ecotoxicology**;v.14, p. 589–96, 2005.

KIM, S. K.;WIJESSEKARA, I.. Development and biological activities of marinederived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2, 1–9. 2010.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*, 13. II, v. 26, Issue 3, p. 231-243, 1975

KUMAR, C. G. *et al.* Production of melanin pigment from *Pseudomonas stutzeri* isolated from red seaweed *Hypnea musciformis*.. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 295—302, 2013.
Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5. 1970.

KULAKOWSKA. A. B. *et al.* .Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 1–31.2007

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

LAIKO VV, BALDWIN MA, BURLINGAME AL. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Anal Chem**; v.72, p. 652–657. 2000.

LARA-ISASSI G. *et al.* Screening for anticoagulant substances in some marine macroalgae. Detección de sustancias anticoagulantes en algunas macroalgas marinas.. **Hidrobiológica** v. 14 (1): p. 47-54. 2004.

LEARY JL, SCHMIDT RL. Quadrupole mass spectrometers: an intuitive look at the math. **Journal of Chemical Education**;v. 73, p. 1142–1144. 1996.

LEE R.E. **Phycology. Rhodophyta**. Cambridge University Press, 4 ed, cap 4, 547 pág. 2008.

LIMA, R. F. *et al.* Bryothamnion seaforthii Lectin Relaxes Vascular Smooth Muscle: Involvement of **Protein and Peptide Letters** Endothelium and NO Synthase., v. 17, p. 305-

310, 2010.

LOWE, R. L. AND GINA D. LA LIBERTE. **Benthic Stream Algae: Distribution and Structure.** *Methods in Stream Ecology.* Universidade Bowling Green State, cap. 16, p. 328. 2006.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.437-437, 2001.

BRADFORD. M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v **72**, p. 248-254 (1976)

MCFARLANE R. D. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1247 – 1264,1983.

MCLUCKEY SA, WELLS JM. Mass analysis at the advent of the 21st century. **Chem Rev**; v. 101:p. 571-606, 2001.

MEYER, Y., GROSSET, J., CHARTIER, Y., CLEYETMAREL, J. C., Electrophoresis,v. 9, p. 704–712. 1988

MILLER, I., CRAWFORD, J., GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why?. **Proteomics**, v. 6, p. 5385–5408, 2006.

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.

MUÑOZ, J. KUMAR V. FOTEDAR R. Seaweed Culture with Special Reference to Latin America. **Recent Advances and New Species in Aquaculture**, 2011.

NAGANO, C. S. *et al.* Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformes*. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 9, n. 2, p. 159-166, Apr 2002

NAGANO, C.S., et al. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Prot. Pept. Lett.** v.9, p.159–165, 2002.

NAGAI, K. *et al.* Protein extraction for 2-DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (laminariales): Recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. *Electrophoresis*, v. 29, p. 672–681, 2008.

NASCIMENTO-NETO, L.G. *et al.* Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Mar. Drugs** , v. 10(9), p. 1936-1954; 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Leninger princípios de bioquímica.* São Paulo, Sarvier. 2002.

NGUYEN H. M. *et al.* Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism. **Proteomics**, v.11, p.4266–4273. 2011.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. **J. Biol. Chem.**, 250, 4007–4021, 1975

ONG, S.-EN.;BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; KRISTENSEN, D. B.; STEEN, H.;PANDEY, A.;MANN, M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, 1.5, p. 376-386, 2002.

PARK, J. W. *et al.* Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* cellular proteins fractionated by ammonium sulfate precipitation. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2891–2903 2008

PATTON, W. F. Detection Technologies in proteome analysis. **Journal Chromatography B**, v. 771, p. 3-31, 2002.

PENQUE D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. **Proteomics Clin. Appl**, v. 3, p. 155–172. 2009

PENNINGTON, S.R.; DUNN. M.J. **Proteomics: from protein sequence to function**. New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers, v.1, 2001.

PINK, M.; VERMA, N.; RETTENMEIER, A. W.; SCHMITZ-SPANKE, S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. **Electrophoresis**, v.31, n.4, p. 593-598, 2010.

PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma Cells. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2009, p. 1-7, 2009.

POMPONI, S. A. The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, 70, 5–13. 1999

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analysis. **Electrophoresis**, v. 17, p. 813-829, 1996.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility the membrane proteins in Two-Dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758-760, 1998.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

RAGAN, M. A., BIRD, C. J., RICE, E. L., GUTELL, R. R., MURPHY, C. A. & SINGH, R. K. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7276–80. 1994.

RAVI, S. B. Characterization of agarophytic seaweeds from the biorefinery contexto, *Bioresource Technology*. C.R.K. Reddy Bhavanath Jha, v. 159, p. 280–285, 2014.

RAYLEIGH L. On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses charged with Electricity. **Philosophical Magazine**. v. 14, p. 184. 1882.

RAYMOND, S.; WEINTRAUB, L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, v. 130, p. 711. 1959.

REIS R. P. et al. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *hypnea musciformis* (rhodophyta - gigartinales). **Acta bot. bras.** 17(2): 279-286. 2003

RIGHETTI, P. G.; TUDOR G.; GIANAZZA E. Efeito de β -mercaptoetanol em gradientes de pH em focagem isoelétrica. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 6, p.219-227. 1982.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHAES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1- 12, 2005.

ROLLAND, N. *et al.*, Chlamydomonas proteomics. **Current Opinion in Microbiology** ,v.12, p. 285–291. 2009.

STEEL C, HENCHMAN M. Understanding the quadrupole mass filter through computer stimulation. **J Chemical Edu**; v.75, p.1049–1054. 1998.

SHAW M. M.; RIEDERER M. B. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, v. 3, p.1408–1417, 2003.

THIEDE, B.; WOLFGANG, H.; KRAHA, A.; MATTOWC, J.; SCHMID, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass Fingerprinting. **Methods**, v. 35, p. 237-247, 2005.

TISELIUS, A. Electrophoresis of serum globulin. I. *Biochem. J.*, v. 31, p. 313–317. 1937.

Trends in Food Science and Technology. 10, 25–28. 1999.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basis: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental desing and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, v.74, n.1, p.1-18, 2011.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. *BioMed Research International*,v. 2014, p. 1-9, 2014.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da Economia nos Ambientes Aquáticos à Bioremediação e à Química Analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.1, p.139-145, jan-fev 2004.

VON B. M., *et al.*, Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. **Proteom Clin Appl**, v. 3, p. 774–784. 2009

WANG D. Z. *et al.*, Comparative studies on morphology, ITS sequence and protein profile of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* isolated from the China Sea. **Harmful Algae**, v. 7, p.106–113. 2008.

WANG, D.-Z. *et al.* Comparative studies of four protein preparation methods for proteomic study of the dinoflagellate *Alexandrium* sp. Using two-dimensional electrophoresis. **Harmful Algae**. v.8, p. 685–691, 2009.

WHITEHOUSE CM, DREYER RN, YAMASHITA M, *et al.* Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Anal Chem**;v. 57, p. 675–679. 1985.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. K.. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. **Marine Drugs**, 8, 1080–1093. 2010.

WILKINS , M. R.; GASTEIGER, E.; GOOLEY, A. A.; HERBERT, B. R.; MOLLOY, M. P.; BINZ, P.A.; OU, K. SANCHEZ, J.C; BAIROCH, A.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. **Journal of Molecular Biology**, v.289. p. 645-647, 1999.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J.C; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and now to do it. **Biotechnology e Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1995.

WINCK, F. V., *et al.*, The nuclear proteome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proteomics**, v. 12, p. 95–100. 2012.

WONG P. F. *et al.* Proteomics of the red alga, *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). **J. Phycol.** v.42, p. 113–120. 2006.

WONG, K. H., & CHEUNG, P. C. K. Effect of fiber-rich brown seaweeds on protein bioavailability of casein in growing rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 54, 269–279. 2003.

WYSOCKI, V. H.; RESINGB, K. A.; ZHANGA, Q.; CHENGA, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 211-222, 2005.

YATES, J. R. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 1-19; 1998.

YATES, J. R., III, SPEICHER, S., GRIFFIN, P. R., HUNKAPILLER, T. Peptide mass maps:

- A highly informative approach to protein identification. **Anal. Biochem.**, v. 214, p. 397–408. 1993.
- YOON, H. S., HACKETT, J. D., CINIGLIA, C., PINTO, G. & BHATTACHARYA, D. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, p. 809–818. 2004.
- YOTSUKURA N. *et al.*, Seasonal changes in proteomic profiles of Japanese kelp: *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). **J Appl Phycol** v.22, p.443–451. 2010.
- YOTSUKURA N. *et al.* Temperature stress-induced changes in the proteomic profiles of *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyceae). **J Appl Phycol**, v. 24, p.163–171. 2012.