

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

GUILHERME LIMA DE PAULA

**ANÁLISE ESTRUTURAL MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASSA DA
LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilariopsis sjoestedtii***

**FORTALEZA
2011**

GUILHERME LIMA DE PAULA

**ANÁLISE ESTRUTURAL MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASSA DA
LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilariopsis sjoestedtii***

Trabalho Supervisionado (Modalidade A)
Monografia submetida ao Departamento de
Engenharia de Pesca da Universidade Federal
do Ceará como parte da exigência para
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.
Na área de concentração: Biotecnologia
Marinha

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

**FORTALEZA
2011**

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

-
- P354a Paula, Guilherme Lima de.
Análise estrutural mediante espectrometria de massa da lectina da alga marinha vermelha
Gracilariopsis sjoestedtii / Guilherme Lima de Paula. – 2011.
50 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
1. Rodófitas. 2. Lectinas. 3. Espectrometria de massa. I. Título.
-

CDD 639.2

GUILHERME LIMA DE PAULA

**ANÁLISE ESTRUTURAL MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASSA DA
LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilariopsis sjoestedtii***

Trabalho Supervisionado (Modalidade A) Monografia submetida ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como parte da exigência para obtenção do título de Engenheiro de Pesca na área de Biotecnologia Marinha.

Aprovada em 23 / 11 / 2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará

Suzete Roberta da Silva
Engenheira de Pesca
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais por tudo que eles
fizeram por mim, e sempre
acreditaram e me encorajaram nesta
caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, perseverança, força e determinação para a realização deste trabalho e na conclusão do meu curso, não me deixando abater com as dificuldades encontradas ao longo do caminho. E por ter me dado o dom da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano pela oportunidade de trabalho ao seu lado, pela paciência e ensinamentos nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por permitir que eu trabalhasse e realizasse este trabalho em seu laboratório, Biomol-Lab.

À Prof. Dra. Kyria Santiago Nascimento e ao Prof. Dr. Bruno Anderson, pelos seus ensinamentos e ajuda nesses anos de Biomol-Lab.

Ao Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio por ter me dado a oportunidade de trabalhar no Biomol-Lab, pelos seus ensinamentos e pela participação na banca examinadora deste trabalho.

À minha co-orientadora Suzete Roberta da Silva, mestranda em Engenharia de Pesca pelos ensinamentos e por me ajudar na realização dos experimentos e na formulação deste trabalho.

A todos os professores do curso de Engenharia de Pesca pelos seus ensinamentos e empenham que tiveram para transmitir seu saber, não se importando muitas vezes com as adversidades encontradas.

Aos amigos que fiz no laboratório Rafael, Helton, Alysson, Júnior, Alfa, Ito, Sâmia. Agradeço pelos seus ensinamentos e compreensão, e pelas risadas que foram dadas nesses anos.

Sou grato também aos companheiros de laboratório, que sempre estiveram presentes de alguma forma na minha formação, me ajudando e dando conselhos.

Aos meus amigos que fiz durante o curso de Engenharia de Pesca, Arthur, Carol, Renata e Rômulo, agradeço a vocês pelos momentos tristes, felizes e alguns desesperadores, e pelos ensinamentos durante o nosso curso.

Ao meu amigo Fernando que me ajudou bastante, e que sempre esteve presente nos momentos de alegria e de tristeza, o qual sempre terá a minha sincera amizade e gratidão.

A todos os colegas que eu fiz durante o curso de Engenharia de Pesca, que de certa forma contribuíram para o enriquecimento do meu saber.

Aos meus amigos Antonio, Fellipe, Márcio, Jefferson e Renato (A6), sou extremamente grato a vocês, sempre presente comigo, me ensinando e compartilhando as alegrias e as dores que vivi ao longo desses anos, vocês são pessoas especiais para mim.

Às minhas amigas Iraídes Melo, Perpétua, Rachel e Sherly que sempre me apoiaram e me deram força, tiveram paciência comigo, e foram um ouvido amigo nas decepções que eu tive me dando conselhos e afeto, sou feliz por ter vocês como amiga.

Aos meus amigos Weber, David, Gleifferson, Uanderson, Roberto, Vanderson, que foram pessoas que sempre estiveram comigo.

Aos meus pais que sempre fizeram o possível e impossível para me dá o melhor, sempre estiveram do meu lado, parabenizando os meus acertos e criticando os meus erros e corrigindo-os, Job Vieira de Paula e Maria Valnice Lima de Paula, são tudo em minha vida.

À minha família pela força, compreensão e a ajuda ao longo de toda a minha caminhada, sempre me dando apoio e conselhos para que eu escolhesse os melhores caminhos.

Em especial dedico este trabalho a minha avó Emília (*in memoriam*), que sempre estará presente comigo, sei que no momento de escrever essas palavras ela está bastante orgulhosa e gostaria de tê-la aqui presente.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho e para o meu também.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), à financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Universidade Federal do Ceará pelo financiamento da bolsa de iniciação científica e pela infra-estrutura do Laboratório de Espectrometria de Massa e Análise de Proteínas (LEMAP).

RESUMO

Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos, sendo de origem não imune e não apresentam atividade enzimática contra seus ligantes. As lectinas são proteínas ubíquas, estando distribuídas amplamente na natureza, podendo ser encontradas em seres unicelulares, animais e vegetais. Embora exista um grande número de trabalhos de lectinas isoladas de animais e algas, os estudos ainda se concentram no isolamento de lectinas de planta, consequentemente havendo um maior número de trabalhos publicados. A lectina da *Gracilariopsis sjoestedtii* (Sjoestedina) foi purificada através de uma combinação de precipitação de sulfato de amônio seguido por cromatografia de troca iônica. Os processos de purificação e a massa molecular aparente foram analisados por SDS-PAGE, a massa molecular aparente determinada foi de 29 kDa e a massa molecular mono isotópica média foi determinada por espectrometria de massa mostrou duas séries de íons majoritários de massa isotópica média de 27.547 Da e de 27.959 Da. A partir de peptídeos resultantes da digestões proteolíticas com tripsina, foram obtidas sequências parciais mediante espectrometria de massa. A Sjoestedina apresentou alta homologia de sequência com outras proteínas, como a lectina da bactéria do solo *Myxococcus xanthus*, a lectina da cianobactéria *Oscillatoria aghardii* e a isolectina ESA-2 da macroalga marinha *Eucheuma serra*. Sabendo da elevada semelhança bioquímica entre essas lectinas e a Sjoestedina e do grande potencial biotecnológico da ESA-2 para farmacologia como atividade mitogênica para linfócitos de ratos e efeito citotóxico para células cancerígenas, é interessante se investigar também essa potencialidade biotecnológica para a Sjoestedina.

Palavras-chaves: Lectinas; Caracterização por espectrometria de massa; *Gracilariopsis sjoestedtii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Lectinas de algas purificadas no mundo ao longo de décadas até a atualidade.....	20
Figura 2	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração obtida por precipitação com sulfato de amônio (F0/70). A fração foi dialisada em tampão fosfato 20 mM, pH 7.0 e em seguida aplicada na coluna (1,0 x 10 cm). A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio com um fluxo constante de 30 mL.h ⁻¹ e eluída com NaCl 1M no mesmo tampão. Foram coletadas frações de três ml e submetidas a atividade hemaglutinante. Foram coletadas frações de 1,5 mL e submetidas a atividade hemaglutinante, utilizando eritrócitos de coelho tripsinizados. U.H.=Unidades de Hemaglutinação. (■-■) Absorbância a 280 nm, (□-□) atividade hemaglutinante.....	31
Figura 3	Eletofórese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Foram aplicados 30 µg de amostra em cada poço. 1- Sjoestedina não reduzida; 2- Sjoestedina reduzida; 3- Marcadores moleculares (fosforilase B 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, α-lactoalbumina 14,4 kDa); 4- Lectina de <i>Amansia multifida</i>	32
Figura 4	Percentual da atividade hemaglutinante da Sjoestedina após incubação em diferentes temperaturas durante uma hora	34
Figura 5	Análise por espectrometria de massas com ionização por Eletrospray. espectro de massa deconvoluido da Sjoestedina.....	36
Figura 6	Cromatografia de fase reversa em nanocoluna nanoACQUITY UPLC BEH130. Perfil cromatográfico da separação dos peptídeos da Sjoestedina gerados pela digestão com tripsina.....	37
Figura 7	Espectro de fragmentação (MS/MS) do peptídeo de massa molecular de 1.171,55 Da. A fragmentação foi realizada com íon precursor duplamente protonado 585,67 2H ⁺ . Em vermelho: sequência de aminoácidos determinada pelas séries de íons y (C-terminal). A sequência resultante da interpretação do espectro de fragmentação é TLTGTTYER.....	37

LISTA DE TABELAS

1	Tabela de Purificação da lectina isolada da <i>Gracilariopsis sjoeteditii</i>	31
2	Atividade hemaglutinante da Sjoestedina contra diferentes tipos de eritrócitos com e sem tratamento enzimático.....	33
3	Ensaio de inibição por carboidratos da Sjoestidina.....	35
4	Massas moleculares e sequência de aminoácidos dos peptídeos oriundos da digestão com tripsina identificada através da comparação com bancos de dados.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML	Lectina da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CID	Dissociação induzida por colisão
DDA	Análise direta de dados
EDTA	Ácido etilenoamino tetra-acético
ESA-2	Lectina da alga marinha vermelha <i>Eucheuma serra</i>
ESI	Ionização por Eletrospray
HCA	Lectina da alga marinha vermelha <i>Hypnea cervicornis</i>
HJA-1	Isolectina da alga marinha vermelha <i>Hypnea japonica</i>
HJA-2	Isolectina da alga marinha vermelha <i>Hypnea japonica</i>
HML	Lectina da laga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MS	Espectrometria de Massa
MS/MS	Espectrometria de Massa Sequencial
PBS	Tampão Fosfato de Sódio com Cloreto de Sódio
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
P/V	Relação peso-volume
Q-IMS-o-TOF	Quadrupolo Mobilidade Iônica Tempo de Vôo com aceleração ortogonal
RIPs Tipo II	Proteínas inibidoras de ribossomos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
SJOSTEDINA	Lectina da alga marinha vermelha <i>Gracilariopsis sjoestedtii</i>
U.H.	Unidade hemaglutinante
V/V	Relação volume-volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Lectinas.....	13
1.1.1	Histórico.....	13
1.1.2	Definições.....	15
1.1.3	Ocorrência.....	16
1.2	Algas.....	17
1.2.1	Algas marinhas vermelhas.....	18
1.2.2	<i>Gracilariopsis</i>	19
1.3	Lectinas de macroalgas marinhas.....	20
1.4	Aplicações na Biotecnologia.....	21
1.5	Caracterização estrutural de lectinas de macroalgas marinhas por espectrometria de massa.....	22
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1	Algas marinhas.....	24
2.2	Purificação da lectina da <i>Gracilariopsis sjoestedtii</i>.....	24
2.2.1	Extração de proteínas.....	24
2.2.2	Fracionamento protéico do extrato total.....	24
2.2.3	Quantificação das proteínas.....	25
2.2.4	Atividade hemaglutinante.....	25
2.2.5	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.....	26
2.3	Caracterização da lectina de <i>Gracilariopsis sjoestedtii</i>.....	26
2.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mecarptoetanol.....	26
2.3.2	Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	27
2.3.3	Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante.....	27
2.3.4	Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante.....	27
2.3.5	Inibição por carboidratos.....	28
2.3.6	Dosagem de carboidratos totais.....	28
2.4	Caracterização através da espectrometria de massa.....	28
2.4.1	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa.....	28

2.4.2	Sequenciamento por espectrometria de massa.....	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1	Purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>Gracilariopsis</i>	30
	<i>sjoestedtii</i>.....	30
3.1.1	Cromatografia de troca iônica.....	30
3.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2- mercaptoetanol.....	31
3.1.3	Atividade hemaglutinante.....	32
3.1.4	Estabilidade de pH.....	33
3.1.5	Estabilidade térmica e Dependência por cátions divalentes.....	33
3.1.6	Inibição por carboidratos.....	34
3.1.7	Determinação dos carboidratos totais.....	35
3.1.8	Caracterização por espectrometria de massa.....	35
3.1.8.1	Determinação da massa molecular.....	35
3.1.8.2	Sequenciamento por espectrometria de massa.....	36
4	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Histórico

A primeira lectina de vegetal foi descrita por Stillmark no ano de 1888 em sua tese de doutorado na Universidade de Tartu, Estônia, quando ele estudou e isolou uma lectina tóxica obtida da semente de mamona (*Ricinus communis*) a qual foi denominada de ricina, cujos extratos eram capazes de aglutinar células do sangue humano e de animal (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Logo depois, H. Hellin isolou uma lectina tóxica da semente de jeriquití (*Abrus precatorius*). As duas hemaglutininas isoladas, ricina e abrina, serviram de modelos para estudos imunológicos, instituindo vários princípios fundamentais da imunologia, como por exemplo, a memória imunológica, a especificidade de resposta de anticorpos (SHARON; LIS, 2004).

Ladsteiner e Raubitscheck em 1907 descreveram pela primeira vez uma lectina não tóxica na leguminosa, presente no extrato de *Phaseolus vulgaris* (feijão). A partir deste relato surgiram vários trabalhos de hemaglutininas sem efeito tóxico, e a idéia de que a toxicidade era uma propriedade intrínseca das lectinas foi derrubada.

No ano de 1919, James B. Summer purificou a primeira lectina da semente de feijão (*Canavalia ensiformes*), denominada de Conavalina A (ConA). Porém, somente no ano de 1936 foi que Summer e Howell demonstraram a especificidade dessa lectina por açúcares, quando observaram que a atividade da ConA foi inibida na presença de sacarose. Essa lectina também foi capaz de aglutinar células como eritrócitos e fungos (SHARON; LIS, 2004).

Nos anos de 1940, Renkonen e Boyd mostraram que certas hemaglutininas aglutinavam eritrócitos específicos dentro do sistema ABO. Passou-se a observar que algumas proteínas vegetais eram capaz de identificar grupos específicos, em que as células sanguíneas do sistema ABO comportavam-se de maneira diferente frente às hemaglutininas, sendo que algumas aglutinavam e outras não (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; SHARON; LIS, 2004).

No ano de 1960, Petter C. Nowell mostrou que a lectina do feijão (*Phaseolus vulgaris*) possuía atividade mitogênica sobre os linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário nos estudos de imunologia, pois se acreditava que os linfócitos eram células incapazes de se dividir ou se diferenciar. Na sequência, os estudos mostraram a atividade mitogênica de algumas lectinas, e comprovou-se que a atividade mitogênica era resultante da ligação da lectina com os açúcares presentes na superfície dos linfócitos (SHARON; LIS, 2004).

Na década de 1960, aconteceu o primeiro relato sobre a ocorrência de lectinas em algas, (BOYD *et al.*, 1966), em que eles testaram a atividade hemaglutinante de extratos de 21 espécies de algas marinhas e que essa atividade não foi específica para os grupos sanguíneos testados.

Blunden, Rogers e Farnham (1975), fizeram um trabalho de detecção de hemaglutininas em 102 espécies de algas e viram que apenas 19 espécies apresentavam atividade hemaglutinante contra suspensão de eritrócitos humanos do sistema ABO, apoiando a idéia de Boyd *et al.* (1966). No mesmo ano, Blunden e colaboradores mostraram que não havia diferença na atividade hemaglutinante quando se extraíam lectinas de partes morfológicamente diferentes de algumas espécies e nem quando os extratos eram preparados a partir de algas secas naturalmente ou em estufas.

Rogers *et al.* (1980) trabalharam com 49 espécies de algas e encontraram 14 espécies com atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos do sistema ABO. A novidade foi que os eritrócitos foram tratados com papaína para melhorar a detecção das hemaglutininas através da exposição dos carboidratos e glicoconjugados presente na superfície das hemácias.

No ano seguinte, Hori e colaboradores (1981) testaram 53 espécies das quais 14 apresentaram atividade hemaglutinante, utilizando além do sistema ABO, eritrócitos de coelho, cavalo, ovelha, pato e galinha. Os eritrócitos de coelho se mostraram mais eficientes na detecção das hemaglutininas de algas, propondo ser o mais adequado o seu uso em vez do sistema ABO para estudos seguintes. (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1981).

Fábregas *et al.* (1984), Fábregas, Llovo e Muñoz (1985) e Muñoz, Llovo e Fábregas (1985) estudando algas verdes e vermelhas, viram que todas as algas testadas foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelhos, mas quando ela foram testadas com o sistema ABO a aglutinação se mostrou fraca.

Inúmeros trabalhos de levantamento de hemaglutininas de algas marinhas foram feitos pelo mundo, e no Brasil o primeiro trabalho de levantamento de hemaglutininas

só ocorreu no ano de 1991, quando Ainouz e Sampaio (1991) testaram extratos de 20 espécies de algas, coletadas no litoral brasileiro, contra eritrócitos de coelho, cabra, galinha, carneiro e boi, além do sistema ABO.

Até o presente, a presença de foi detectada em aproximadamente 800 espécies de algas marinhas. Entretanto, este número é ainda pequeno, tendo em vista que existem milhares de espécies. Em conjunto, as pesquisas mostram que aproximadamente 60% das espécies analisadas apresentam atividade hemaglutinante. Este número de espécies positivas poderia ser maior, dado que nos primeiros trabalhos de detecção os autores utilizaram um número limitado de eritrócitos sem tratamento com enzimas proteolíticas. O aprimoramento das metodologias de extração e dos ensaios da atividade de hemaglutinação poderia resultar no aumento do número de espécie com atividade hemaglutinante.

1.1.2 Definições

Primeiramente as lectinas foram chamadas de fitohemaglutininas, pois foram encontradas em extratos vegetais e aglutinarem hemácias. No ano de 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina, que vem do latim *Legere*, escolher. Eles observaram que essas proteínas eram capazes de aglutinar eritrócitos humanos e precipitar polissacarídeos e glicoproteínas.

Goldstein *et al.* (1980) conceituaram lectina como sendo proteínas ou glico proteínas de origem não imune, que são capazes de ligar-se a carboidratos, aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.

Barondes (1988) definiu lectina como sendo proteínas ligantes a carboidratos, não possuindo natureza enzimática e antigênica, mas esta definição excluiria as proteína inibidoras de ribossomos (RIPs Tipo II), que possuem domínios ligantes a carboidratos.

Depois de muitos estudos de análise estrutural e funcional de lectinas, foi possível obter novas definições para esta classe de proteínas. Atualmente a definição sobre lectina mais usada é a de Peumans e Van Damme (1995), os quais as definiram como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos, sendo de origem não imune e não apresentam atividade enzimática contra seus ligantes. Ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune. A origem não imunológica das lectinas serve para

diferenciá-las de anticorpos que aglutinam células. Os anticorpos são estruturalmente idênticos, enquanto as lectinas são diferentes entre si devido a composição de aminoácidos, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Peumans e Van Damme (1998) ainda dividiram as lectinas, quanto à estrutura, em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas são lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos, portanto não são capazes de aglutinar células e precipitar glicocojugados. Um exemplo de merolectina é a lectina de *Hevea brasiliensis*, conhecida como heveína. Hololectinas possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidratos idênticos, a maioria das lectinas pertencem a esse grupo. As quimerolectinas possuem um domínio ligante a carboidratos e outro com atividade distinta da ligação a carboidratos. Um exemplo clássico desse tipo de lectina seria, RIPv Tipo II. As superlectinas apresentam dois ou mais domínios a carboidratos, em que esses domínios reconhecem açúcares diferentes e são estruturalmente distintos.

1.1.3 Ocorrência

As lectinas são proteínas ubíquas, estando distribuídas amplamente na natureza, podendo ser encontradas em seres unicelulares (IMBERT *et al.*, 2004), animais (MOURA *et al.*, 2006) e vegetais (LEITE *et al.*, 2005). Os animais produzem uma grande variedade de lectinas que são classificadas em famílias, de acordo com a sua similaridade de sequência e a sua especificidade por açúcar (SHARON; LIS, 1989).

Lectinas foram isoladas de diversos tipos de animais, dentre eles, da holotúria *Cucumaria echinata* (HATAKEYAMA *et al.*, 1994), da hemolinfa do caranguejo *Limulus polyphemus* (TSUBOI *et al.*, 1996), da esponja *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), dos ovos do teleósteo *Tribolodon brandti* (JIMBO *et al.*, 2007), da hemolinfa do camarão *Fenneropenaeus chinensis* (SUN *et al.*, 2008), da mosca doméstica *Musca domestica* (CAO *et al.*, 2010), do veneno de cobra *Bothrops leucurus* (NUNES *et al.*, 2011), da ostra *Crassostrea virginica* (JING *et al.*, 2011), do peixe venenoso *Thalassophryne nattereri* (FERREIRA *et al.*, 2011).

Embora exista um grande número de trabalhos de lectinas isoladas de animais, os estudos ainda se concentram no isolamento de lectinas de plantas, conseqüentemente

reserva, a parede celular é composta de celulose e ágar ou carragenana, a grande maioria é bentônica marinha crescendo fixas ao substrato e ocorrem em águas quentes das regiões tropicais.

Na natureza, as algas estão amplamente distribuídas em ambientes aquáticos dulcícolas ou marinhos e em ambientes terrestres (LEE, 1999; RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2006). Abundantemente distribuídas em regiões quentes, próximo ao Equador, onde apresentam tamanho reduzido e maior variabilidade de espécies, mas são encontradas também em águas frias atingindo maiores tamanhos, porém com uma menor variabilidade de espécies (LEE, 1999; VAN DEN HOE, MANN, JAHNS, 1995). Elas também são capazes de habitar ambientes providos de pouca luz e úmidos o suficiente que possibilitem a extração de nutrientes essenciais para a sua sobrevivência (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Ocupam também zonas extremas, regiões de alta e baixa temperatura e regiões de elevado e baixo pH (LEE, 1999).

As algas são a base da cadeia alimentar nos oceanos sustentam dois terços da biomassa mundial, são responsáveis também por aproximadamente metade da atividade fotossintética (DAY, BENSON, FLECK, 1999), sendo responsáveis pela renovação do oxigênio presente no ar atmosférico (LEE, 1999). Além de sua importância ecológica, as algas são fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídios (MABEAU *et al.*, 1992).

1.2.1 Algas marinhas vermelhas

O pigmento predominante nas algas vermelhas é a ficoeritrina, que absorve comprimentos de onda de luz na região do verde (495-570 nm), refletindo onda de luz na região do vermelho (LOBBAN; HARRISON, 1997) o que lhes confere a cor avermelhada, característica do grupo. A presença desse pigmento vermelho permite a sobrevivência de algas que habitam regiões bastante profundas, até cerca de 200 metros. Estes pigmentos são capazes de absorver o comprimento de onda da luz solar que atinge em relação à 5% da profundidade média de 4000 m do oceano (LEE, 1999; REVIERS, 2006).

A divisão Rhodophyceae apresenta ainda carboidratos de reserva. O amido das florídeas ou também chamado de rodamilo e se formam próximo a membrana plasmática (LEE, 1999; REVIERS, 2006).

Das algas marinhas vermelhas, são extraídos ágar e carragenana. O ágar é composto de agarose e agarpectina que na indústria alimentícia são utilizados no processamento de queijos, maionese, cremes, geleias e outros produtos. Já na indústria farmacêutica, esses compostos são usados como laxantes leves, agentes de dispersão em drogas, emulsificadores, cosméticos e etc. Em laboratórios, estes carboidratos são utilizados como fonte de alimento para o crescimento de culturas bacteriológicas. A carragenana industrialmente é usada como agente geleificante, estabilizante, espessante ou emulsificante (LEE, 1999; REVIERS, 2006).

Dentro da divisão Rhodophyceae acredita-se que haja cerca de 700 gêneros com 4000 a 6000 espécies, dentre as quais, a maior parte é marinha, com apenas 20 gêneros dulcícolas (LEE, 1999).

1.2.2 *Gracilariopsis*

A alga marinha vermelha do gênero *Gracilariopsis* pertence ao filo Rhodophyta, à ordem Gracilariales, família Gracilariaceae (ALGAEBASE, 2011).

Atualmente doze espécies deste gênero foram reconhecidas, sendo que quase todas possuem talo cilíndrico, com ramificações esparsas ou profusas, podem atingir 100 cm de comprimento e têm diâmetro variando entre 0,5 a 3,0 cm. A única exceção é a *Gracilariopsis silvana*, encontrada no leste do Caribe, que possui talo achatado (BELLORIN *et al.*, 2008; GURGEL *et al.*, 2003)

As algas do gênero *Gracilariopsis* possuem um ciclo de vida trifásico, sendo que o gametófito e o tetrasporófito são isomórficos e independentes, enquanto que o carposporófito é dependente do gametófito feminino (CRITCHLEY, 1993).

Ocorrem na região costeira marinha, em ambientes estuarinos e em lagoas salinas, indicando grande tolerância a variações de salinidade (PLASTINO, URSI, HEIMBECKER, 1998)

1.3 Lectinas de macroalgas marinhas

O número de lectinas isoladas de algas marinhas ainda é pequeno, quando comparado com o número de lectinas purificadas e caracterizadas de vegetais terrestres ou presente em outros organismos (SAMPAIO *et al.*, 1993). Dentre os trabalhos realizados com hemaglutininas de algas marinhas, a grande maioria pertence a duas classes: Chlorophyceae e Rhodophyceae (Figura 1), verificando-se um número maior de hemaglutininas nas espécies de algas vermelhas.

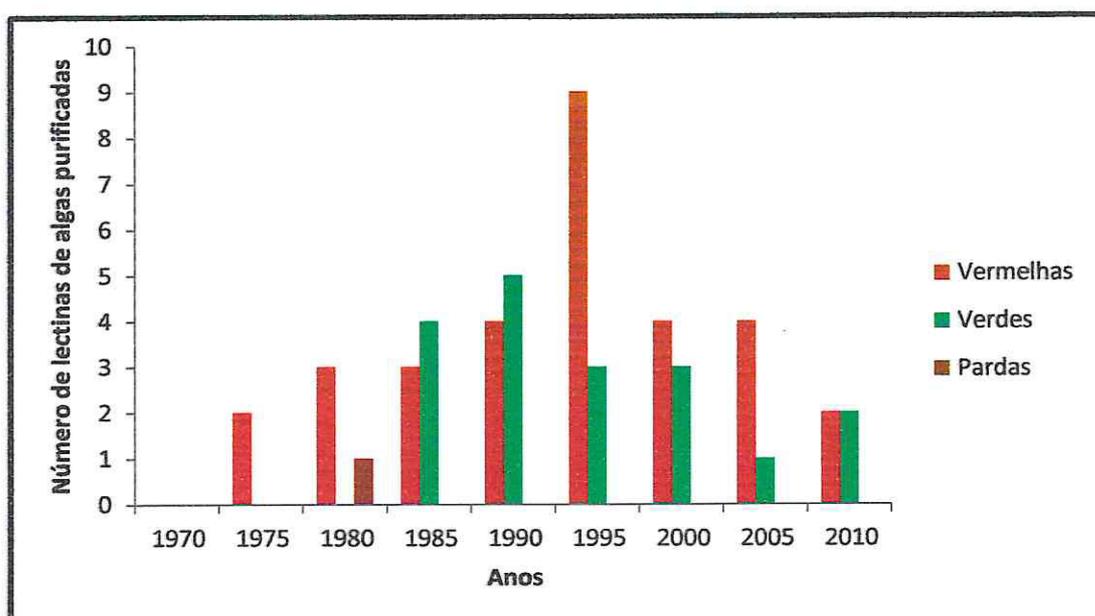


Figura 1- Lectinas de algas purificadas no mundo ao longo das décadas até a atualidade.

Muitas lectinas de algas marinhas diferem quanto às propriedades bioquímicas de outras lectinas (ROGERS; FISH, BARWELL, 1991). As lectinas de algas, em geral, possuem baixo peso molecular, apresentam maior afinidade por açúcares complexos, porém há lectinas de algas que se ligam a açúcares simples, principalmente a galactosídeos (SAMPAIO, ROGERS, BARWELL 1998b; NAGANO *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2006), possuem geralmente estrutura molecular monomérica e a grande maioria não requer cátions divalentes para a sua atividade biológica (ROGERS, HORI, 1993). Entretanto, trabalhos mostram que algumas lectinas de algas, como as isoladas da *Ptilota filicina*

(SAMPAIO *et al.*, 1998b) e da *Ulva lactuca* (SAMPAIO *et al.*, 1998a) dependem de cátions divalentes para exibir sua atividade hemaglutinante.

Atualmente, as informações estruturais existentes apontam o surgimento de famílias de lectinas nas diferentes espécies de macroalgas marinhas (SILVA, 2010).

No ano de 2000, Calvete e colaboradores, e Hori e colaboradores, obtiveram paralelamente as sequências das lectinas isoladas das algas *Bryothamnion triquetrum* e *Hypnea japonica*, respectivamente. Observando esses resultados, evidenciaram que as sequências dessas lectinas tem alta similaridade entre elas, mas não mostraram qualquer similaridade com outras lectinas de outras algas ou de qualquer outro organismo. Já, as lectinas das algas marinhas vermelhas *H. cervicornis* e *H. musciformis* apresentam diferenças estruturais com relação à lectina da alga *H. japonica*, mostrando a existência de uma variedade de lectinas entre as espécies do mesmo gênero que habitam ecossistemas distantes (NAGANO *et al.*, 2005b).

Dentre as espécies investigadas estão as algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000), *Hypnea japonica* (HORI, MATSUBARA, MIYAZAWA, 2000), *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis* (NAGANO *et al.*, 2005a; NASCIMENTO *et al.*, 2006), *Eucheuma serra* (KAWAKUBO *et al.*, 1999; HORI *et al.*, 2007), e as algas verdes *Bryopsis hypnoides* (NIU *et al.*, 2009), *Bryopsis plumosa* (HAN *et al.*, 2010a), *Ulva pertusa* (WANG *et al.*, 2004), *Ulva limnetica* (ISHIHARA; SHIMADA, 2009). Nenhuma dessas lectinas apresentou semelhança com as lectinas de plantas terrestres.

1.4 Aplicações na Biotecnologia

Vários trabalhos têm mostrado que as algas marinhas são organismos promissores como fontes de compostos bioativos. Dentre as diferentes classes de compostos com atividades biológicas, as lectinas de algas surgem como uma classe importante de produtos naturais (CARDOZO *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo lectinas de algas marinhas têm tido um grande progresso, e padrões e características começam a aparecer. Devido à característica da grande maioria das lectinas de algas marinhas de possuírem baixa massa molecular quando comparadas com as lectinas de plantas terrestres, elas pode ser mais apropriadas para o uso em ensaios biológicos (ROGERS; HORI, 1993).

No que se diz respeito à aplicação biológica de lectinas de algas marinhas, alguns estudos mostram que essas proteínas podem ser utilizadas no reconhecimento de células tumorais malignas, como agentes mitogênicos, como imunossupressor e na tipagem sanguínea (DALTON, LONGLEY, BIRD, 1995; ROGERS, LOVELESS, BALDING, 1986;).

A lectina isolada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* diminui a densidade de células de bactérias Gram-negativas. O crescimento da bactéria *Bacillus cereus* não foi observado quando a lectina foi previamente incubada com manana, o carboidrato pelo qual ela apresenta afinidade. Estes foram os primeiros resultados obtidos sobre a inibição e estimulação de células bacterianas patogênicas por lectinas de algas marinhas (HOLANDA *et al.*, 2005).

A atividade antiviral foi mostrada por Ziólkowska e Wlodawer (2006) com uma lectina oriunda da alga vermelha *Griffithsia* sp. que apresenta múltiplos açúcares conjugados em seus sítios de ligação. Esses sítios são os responsáveis pela ligação das moléculas de carboidratos complexos presentes nos envelopes virais.

A lectina de *Amansia multifida* foi avaliada quanto a sua atividade antinociceptiva. Os autores observaram que a lectina foi capaz de inibir o número de contorções abdominais, reduzir o tempo de lambadura da pata. Estes resultados fizeram com que os autores sugerissem que essa lectina possui o efeito antinociceptivo de ação central e periférica (NEVES *et al.*, 2007).

Assim, o papel biológico e farmacológico das lectinas de alga marinhas faz parte de uma área de estudos ainda pouco explorada, que ainda precisa de muito conhecimento para se compreender a verdadeira função dessas moléculas (SILVA, 2008).

1.5 Caracterização estrutural de lectinas de macroalgas marinhas por espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica que surgiu com a descoberta do átomo em 1901 por Thompson. O primeiro espectrômetro de massa foi construído por Thompson em 1912. Essa técnica consiste na análise da relação massa/carga (m/z) de um íon em fase gasosa. Um espectrômetro de massa é formado por três partes. Uma fonte de ionização, fundamental para gerar os íons das moléculas de interesse a serem analisadas, um

analisador, que separa as moléculas pela m/z e um detector que transforma os íons em sinais eletrônicos capazes de serem interpretados.

A existência de poucos trabalhos de caracterização estrutural de lectinas de algas se deve principalmente ao baixo rendimento das preparações e a dificuldade de se obter material com alto grau de pureza para estes estudos. Além disso, a caracterização estrutural de lectinas de algas requer técnicas analíticas de alta sensibilidade. Nesse sentido, com o advento da espectrometria de massa para a identificação de proteínas na era pós-genômica (KARSTEN, NAHNSSEN, MACEK, 2011), paralelamente surgiu um novo panorama para a análise estrutural de lectinas de macroalgas marinhas a partir de pequenas quantidades obtidas no processo de purificação. De fato, a utilização da técnica de espectrometria de massa na análise estrutural de lectinas de algas iniciou-se com determinação da estrutura primária da lectinas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000) e *Hypnea japonica* (HORI, MATSUBARA, MIYAZAWA, 2000) e desde então, outras lectinas foram caracterizadas por espectrometria de massa como as lectinas de *H. cervicornis* e *H. musciformis* (NAGANO *et al.*, 2005), *Griffithsia* sp. (MORI *et al.* 2005), *Bryopsis plumosa* (KIM; KLOCHKOVA, 2006; HAN *et al.*, 2010a; HAN *et al.*, 2010b; JUNG *et al.*, 2010) e *Amansia multifida* (SILVA, 2010). Portanto, os trabalhos recentes mostram que a espectrometria de massa é valiosa ferramenta na caracterização de lectinas de algas marinhas.

Este trabalho teve como objetivo isolar e purificar a lectina da alga marinha vermelha *Gracilariopsis sjoestedti*, bem como caracterizá-la bioquimicamente e por espectrometria de massa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Algas Marinhas

A alga marinha vermelha *Gracilariopsis sjoestedtii* foi coletada na praia do Pacheco, município de Caucaia, Fortaleza-CE no período de maré de sizígia, transportadas para o laboratório, limpa de epífita, lavada, congelada a -20°C e liofilizadas para posterior utilização.

2.2 Purificação da lectina da *Gracilariopsis sjoestedtii*

2.2.1 Extração das proteínas

As algas liofilizadas foram trituradas em moinho elétrico doméstico até obtenção de um fino pó. O material foi suspenso em uma solução tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M (PBS), na proporção de 1:20 (p/v) e submetido à agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada em tecido de nylon e o filtrado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada a 9.000 g por 20 min. a 4 °C. O precipitado foi então descartado e o sobrenadante foi denominado extrato total.

2.2.2 Fracionamento protéico do extrato total

O extrato total foi submetido à precipitação protéica com sulfato de amônio a 70% de saturação (Fração 0-70). O material ficou em repouso por 16 horas à temperatura ambiente, em seguida, foi submetido à centrifugação (9.000 g por 20 min. a 4°C). O precipitado foi ressuspenso com menor volume de PBS seguido de diálise exaustiva contra água destilada e

posteriormente contra tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 equilibrando a amostra para cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE Sephacel.

2.2.3 Quantificação das proteínas

As proteínas totais solúveis foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976). A cada 100 μ L de amostra, adicionou-se 2,5 mL de reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex e após 10 minutos de repouso foi feita a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível. A concentração das proteínas solúveis das amostras foi determinada utilizando a curva padrão feita com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

2.2.4 Atividade hemaglutinante

O ensaio de detecção de atividade hemaglutinante foi realizado com eritrócitos de coelho a 3%, sem e com tratamento enzimático, usando as enzimas papaína e tripsina. O sangue foi retirado de coelhos saudáveis mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

A atividade hemaglutinante foi realizada em tubos, as amostras, em duplicata, foram diluídas em cada tubo (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, em seguida adicionou-se 100 μ L da suspensão de hemácias de coelho a 3% em NaCl 0,15 M tratado com tripsina, papaína ou nativo (sem tratamento enzimático) a cada uma das diluições. O ensaio foi incubado a 37°C por 30 minutos, em seguida deixado em temperatura ambiente por mais 30 minutos e após esse período a aglutinação das hemácias foi detectada macroscopicamente. Os resultados foram expressos em Unidades de Hemaglutinação (U.H.) que é o inverso da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação visível.

2.2.5 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

A fração 0-70 foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (1,0 x 10,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. As frações não adsorvidas pela matriz cromatográfica foram removidas com o tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio adicionado de 1 M de NaCl. Frações de aproximadamente 1,5 mL foram coletadas manualmente e monitoradas a 280 nm.

A atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todas as frações cromatográficas foram determinadas. As frações ativas foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada, e, então, liofilizadas.

2.3 Caracterização da lectina de *Gracilariopsis sjoestedtii*

2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol.

O grau de pureza e a estimativa da massa molecular aparente da lectina de *Gracilariopsis sjoestedtii* foram avaliados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (SDS-PAGE) e 2-mercaptoetanol, adaptada da metodologia descrita por Laemmli (1970).

A amostra liofilizada foi solubilizada no tampão de amostra contendo Tris-HCl 80 mM, pH 6,8, glicerol 10%, 0,02% de azul de bromofenol e SDS 10%. Após a adição do tampão, as amostras foram agitadas em vórtex e aquecidas a 100°C por 5 min. Em seguida, foram aplicados 30 µg de amostra nos poços. Um marcador com proteínas de massa moleculares conhecidas (fosforilase B 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa e α -lactoalbumina 14,4 kDa) foi utilizado como padrão para referência.

A eletroforese foi realizada no sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad) com a voltagem constante de 150 V. O tampão usado para a corrida da eletroforese continha Tris 25 mM, pH 8,8, glicina 0,192 M e SDS 0,1%.

Após a corrida da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de Coomassie R-250 a 0,05%, solubilizado em metanol, ácido acético e água seguindo a proporção de 1:3, 5:8 (v/v), por pelo menos 2 horas. O gel foi descorado usando a uma solução descorante contendo todos os solventes contidos no corante na mesma proporção.

2.3.2 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

A lectina de *Gracilariopsis sjoestedtii* foi solubilizada em NaCl 0,15 M na concentração de 1 mg/mL. Aliquotas de 200 µl foram separadas em tubos de micro centrífuga de 1,5 mL e, em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 30°C a 100°C por 60 min. Após este período, a atividade hemaglutinante foi testada em todas as amostras sendo comparada com a atividade da lectina sem nenhum tratamento térmico.

2.3.3 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

A lectina (1 mg/mL em NaCl 0,15 M) foi diluída de forma seriada em diferentes tampões com pH variando de 4,0 a 10,0 contendo NaCl 0,15 M. Os tampões foram utilizados: acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e pH 5,0 citrato de sódio pH 6,0, acetato, fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0.

2.3.4 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante

Foi investigado o requerimento de cátions divalentes para a atividade da lectina de *Gracilariopsis sjoestedtii*. A lectina foi solubilizada em NaCl 0,15 M na concentração de 1 mg/mL. A solução foi inicialmente dialisada contra uma solução de EDTA 0,1 M contendo NaCl 0,15 M por 48 horas e, em seguida, dialisada exaustivamente contra NaCl 0,15 M para remoção do excesso de EDTA. Após isto, a atividade hemaglutinante foi testada adicionando-se soluções de NaCl 0,15 M contendo 10 mM de CaCl₂ e/ou MnCl₂ 10 mM.

2.3.5 Inibição por carboidratos

Esse ensaio foi realizado com a lectina pré-purificada. Após a verificação da atividade hemaglutinante, fez-se uma diluição da solução da proteína onde se teria 4 Unidades de Hemaglutinação (U.H.). Alguns açúcares simples e uma glicoproteína (Tabela 2) foram selecionados para serem utilizados neste ensaio. Logo, 50 μ L de cada açúcar foram adicionados serialmente em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M. Após diluição do açúcar ou da glicoproteína, 50 μ L da solução com 4 U.H. da lectina pré-purificada foram adicionados. O ensaio foi então incubado a 37°C por 30 min., e, após isso, mantido em repouso em temperatura ambiente por mais 30 minutos e então 100 μ L de sangue tripsinizado de coelho foram acrescentados a todas as diluições dos açúcares ou glicoproteínas contendo a fração diluída. A mistura foi novamente incubada a 37 °C, por 30 minutos, e depois, deixada em repouso em temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da atividade hemaglutinante pelos açúcares foi então determinada. Assim observou-se a menor concentração de tais açúcares capaz de inibir a atividade hemaglutinante (concentração mínima inibitória).

2.3.6 Dosagem de Carboidratos Totais

A lectina da alga marinha vermelha *Gracilariopsis sjoestedtii* foi solubilizada em NaCl 0,15 M, obtendo uma solução na concentração de 1 mg/mL e em seguida foi submetida ao método de Dubois *et al.* (1956) para a determinação do conteúdo de carboidratos, utilizando-se galactose como padrão.

2.4 Caracterização através de espectrometria de massa

2.4.1 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A massa isotópica média da proteína purificada foi determinada pela análise da massa intacta em um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (ESI/MALDI-IMS-o-ToF/MS, Waters) com uma resolução de 10.000 e uma precisão de 10 ppm.

A proteína foi solubilizada em uma solução de acetonitrila 50% contendo ácido fórmico a 0,2%, na concentração final de 10 pMol de proteína. A amostra foi aplicada em um fluxo de 1 μ L/min., e as voltagens do cone e capilar foram 3,0 kV e 40 V, respectivamente.

A coleta de dados foi realizada com o auxílio do software Mass Lynx 4.0 e os espectros multicarregados foram deconvoluídos usando técnicas de maximização da entropia (FERRIGE *et al.*, 1992).

2.4.2 Sequenciamento por espectrometria de massa

As bandas eletroforéticas foram excisadas, descoradas, desidratadas e submetidas à digestão com solução de tripsina na proporção 1: 50 (enzima: proteína) por 12 h a 37°C. Os peptídeos foram extraídos e injetados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (Waters nanoACQUITY UPLC BEH130 100 mm x 75 μ m, 1,7 μ m tamanho da partícula) equilibrada com ácido fórmico 0,1% acoplado a uma fonte nanospray de um espectrômetro de massa (Synapt HDMS system-Waters Corp., Milford, USA). Nos experimentos de LC-MS/MS foi utilizada a função DDA (análise direta dos dados) selecionando os íons precursores duplamente ou triplamente protonados, que foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), utilizando uma rampa de energia de colisão que variou de acordo com a carga e a relação m/z do íon precursor. A faixa m/z dos espectros de MS foi de 300 a 3000. Os espectros de MS obtidos durante a cromatografia de peptídeos e os espectros de MS/MS gerados a partir da fragmentação dos íons precursores selecionados foram processados e analisados utilizando o programa Proteinlynx® (Waters). Em seguida, os dados processados foram submetidos a uma busca em banco de dados utilizando a ferramenta *Mascot MS/MS ion search* a qual utiliza como parâmetros de massa dos íons precursores e o padrão de fragmentação dos mesmos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação da lectina da alga marinha vermelha *G. sjoestedtii*

3.1.1 Cromatografia de troca iônica

A fração com 70% de saturação com sulfato de amônio do extrato da *G. sjoestedtii* foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, frações de aproximadamente 1,5 mL foram coletadas manualmente e monitoradas as absorvâncias a 280 nm. A cromatografia apresentou duas frações distintas e ambas apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina (Figura 2), seguindo um perfil semelhante para a lectina de *Amansia multifida* (Costa *et al.*1999). Foram realizadas quantificação de proteínas solúveis totais e atividade hemaglutinante total de cada passo de purificação e os dados estão representados na Tabela 1. No processo de purificação a lectina obtida na cromatografia de troca iônica em gel DEAE-Sephacel apresentou um fator de purificação de 19,9 vezes. O PI estava livre de pigmentos e apresentou maior atividade específica e um grau de pureza maior que a fração que interagiu com a coluna, que era pigmentada.

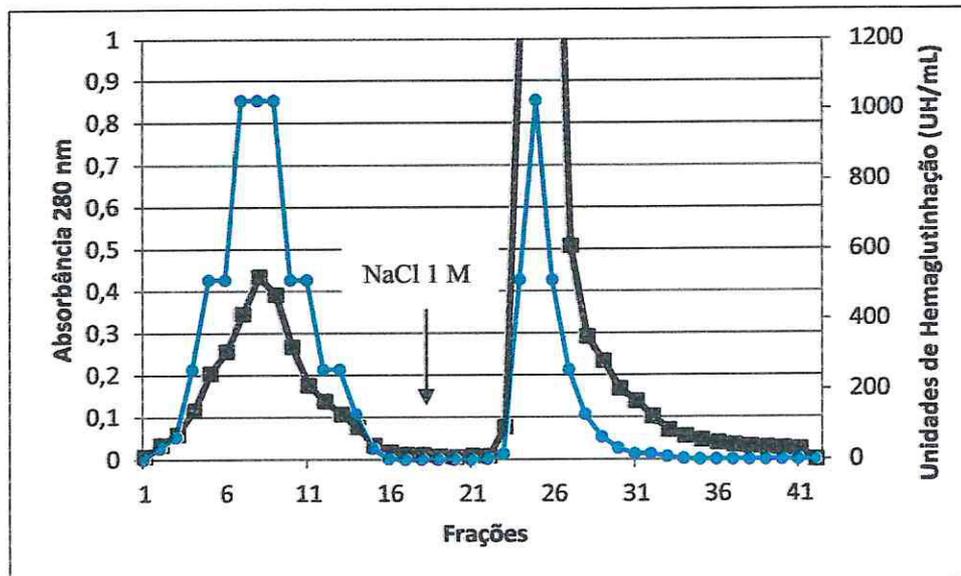


Figura 2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração obtida por precipitação com sulfato de amônio (F0/70). A fração foi dialisada em tampão fosfato 20 mM, pH 7.0 e em seguida aplicada na coluna (1,0 x 10 cm). A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio com um fluxo constante de 30 mL.h⁻¹ e eluída com NaCl 1M no mesmo tampão. Foram coletadas frações de três ml e submetidas a atividade hemaglutinante. Foram coletadas frações de 1,5 mL e submetidas a atividade hemaglutinante, utilizando eritrócitos de coelho tripsinizados. U.H.=Unidades de Hemaglutinação. (■—■) Absorbância a 280 nm, (●—●) atividade hemaglutinante.

Tabela 1. Tabela de Purificação da lectina isolada da *Gracilariopsis sjoestedtii*

Frações	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade total (UH)	Atividade específica (U.H./mgP)	Fator de Purificação
Extrato	58,0	15,39	55.296,0	5445,9	1,0
Fração 0-70	10,0	9,14	327.680,0	32711,5	6,0
PI DEAE	18,0	2,27	1.536,0	108497,6	19,9
PII DEAE	19,5	8,87	9.984,0	3115,9	0,6

3.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol.

A homogeneidade da lectina de *Gracilariopsis sjoestedtii* (denominada Sjoestedina) foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE). A lectina obtida através de cromatografia de troca iônica mostrou uma banda protéica mais intensa de aproximadamente 29 kDa e uma de menor intensidade de aproximadamente 60 kDa. Quando na ausência de β -mercaptoetanol e na presença do agente

reductor apresentou apenas uma única banda (Figura 3). A massa molecular aparente foi próxima a da lectina isolada da alga marinha vermelha *A. multifida* (Figura 3, poço 4). A presença da banda na altura de aproximadamente 60 kDa pode ser devido à presença de isoformas nessa lectina havendo variações nas posições de cisteínas na sequência e dependendo da localização das cisteínas na estrutura primária, elas podem formar pontes dissulfeto intra ou inter cadeias justificando a presença dessa segunda banda.

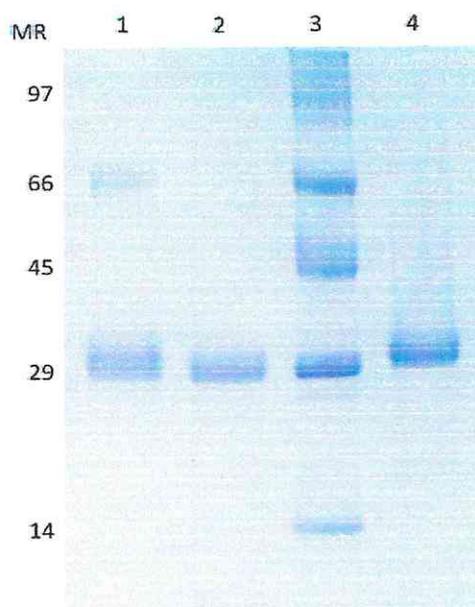


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Foram aplicados 30 µg de amostra em cada poço. 1- Sjoestedina não reduzida; 2- Sjoestedina reduzida; 3- Marcadores moleculares (fosforilase B 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbonica 29 kDa, α -lactoalbumina 14,4 kDa); 4- Lectina de *Amansia multifida*.

3.1.3 Atividade hemaglutinante

Na Tabela 2 são mostrados os resultados de atividade hemaglutinante Sjoestedina frente a diferentes tipos de eritrócitos com e sem tratamento enzimático. A Sjoestedina aglutinou preferencialmente eritrócitos de coelho tratados com tripsina, porém também mostrou atividade contra eritrócitos humanos dos tipos A e O, com ou sem tratamento com enzimas proteolíticas. A atividade hemaglutinante presente no extrato salino da alga marinha vermelha *Gracilariopsis sjoestedtii* foi inicialmente detectada por Ainouz e Sampaio (1991) durante o primeiro levantamento da presença de aglutininas em algas marinhas brasileiras.

Tendo sido observado que os extratos salinos aglutinavam preferencialmente eritrócitos de coelho.

Tabela 2. Atividade hemaglutinante da Sjoestedina contra diferentes tipos de eritrócitos com e sem tratamento enzimático

Eritrócitos	Normal	Tratamento enzimático	
		Papaína	Tripsina
Coelho	256	512	1024
Humano A	32	8	16
Humano B	ND	ND	ND
Humano O	8	16	32

ND – não visualizado atividade hemaglutinante macroscopicamente

3.1.4 Estabilidade de pH

Com relação à estabilidade de pH, a Sjoestedina mostrou-se bastante estável em uma ampla faixa de pH que variou de 5 a 10. Essa elevada estabilidade das lectinas em uma ampla faixa de pH já foi reportada em vários trabalhos, que atribuem essa alta estabilidade à presença de cisteínas nessas lectinas (NAGANO *et al.*, 2002).

3.1.5 Estabilidade térmica e dependência por cátions divalentes

A Sjoestedina independe de cátions divalentes mostrando atividade hemaglutinante semelhante quando foi desmetalizada e na presença dos íons Ca^{++} ou Mg^{++} ou ambos. Por outra parte, a capacidade hemaglutinante foi testada frente a uma ampla faixa de temperatura (30 a 100°C), tendo sua atividade reduzida significativamente apenas depois de 1 hora a 60°C (Figura 4).

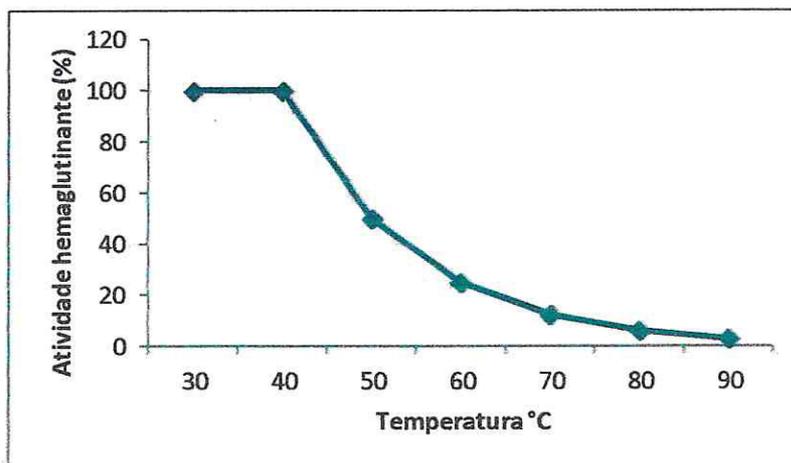


Figura 4. Percentual da atividade hemaglutinante da Sjoestedina após incubação em diferentes temperaturas durante uma hora.

3.1.6 Inibição por carboidratos

A Sjoestedina não foi inibida pelos açúcares simples testados, porém foi inibida pela única glicoproteína usada no ensaio (Tabela 2). Muitas lectinas de algas vermelhas também tem sua atividade inibida prioritariamente por glicoproteínas e/ou glicoconjugados como as lectinas das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (NAGANO *et al.*, 2002), *Eucheuma serra* (KAWAKUBO *et al.* 1997). Porém há outras lectinas que embora sejam inibidas por carboidratos complexos, também são inibidas por açúcares simples como a lectina da alga marinha vermelha *H. cervicornis* (NAGANO *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.* 2006), e as lectinas isoladas das algas do gênero *Ptilota* que foram preferencialmente inibidas por galactosídeos (SAMPAIO *et al.*, 1998b; 2002).

Tabela 3. Ensaio de inibição por carboidratos da Sjoestedina.

Carboidratos	Mínima concentração inibitória (MIC)
Mucina	2,5 mg/ml
Galactose	NI*
Glicose	NI*
Lactose	NI*
Fucose	NI*
GlcNac	NI*
Manose	NI*
Metil- α -D-Galacto piranosídeo	NI*

*Não houve inibição na concentração de 50 mM (NI), para açúcares simples

3.1.7 Determinação dos carboidratos totais

Determinação da quantidade de carboidratos totais na lectina pré-purificada foi feito pelo método de Dubois *et al.*, (1956) pelo qual determinou-se que a Sjoestedina tem 1,05% de carboidratos na sua composição, o que pode indicar que a Sjoestedina pode ser uma glicoproteína.

3.1.8 Caracterização por espectrometria de massa

3.1.8.1-Determinação da massa molecular

A análise por espectrometria de massa da Sjoestedina mostrou duas séries de íons majoritários de massa isotópica média de 27.547 Da e de 27.959 Da (Figura 5). O valor determinado é bastante próximo ao valor encontrado na determinação da massa molecular aparente por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 3). A informação obtida por espectrometria de massa é mais precisa devido ao possível erro esperado ser apenas 2 Daltons. Nas séries de 27.547 Da e de 27.959 Da podem ser observados outros íons com

diferença de 18 Daltons o que pode estar relacionado com a oxidação de resíduos de metionina. As massas moleculares são semelhantes à massa molecular medida por ESI-MS da isolectina ESA-2 (27.949 Da) isolada da alga marinha *Eucheuma serra* (HORI *et al.*, 2007) e da lectina de *Amansia multifida* (28.385 Da) (SILVA, 2010). A presença de duas séries de íons pode ser justificada pela existência de isoformas. Muitas lectinas de macroalgas têm a presença de isoformas como no caso das lectinas de *Eucheuma serra* (KAWAKUBO *ET al.*, 1999), *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000), *B. seaforthii* (RAMIREZ-MEDINA, 2007) e *Amansia multifida* (SILVA, 2010).

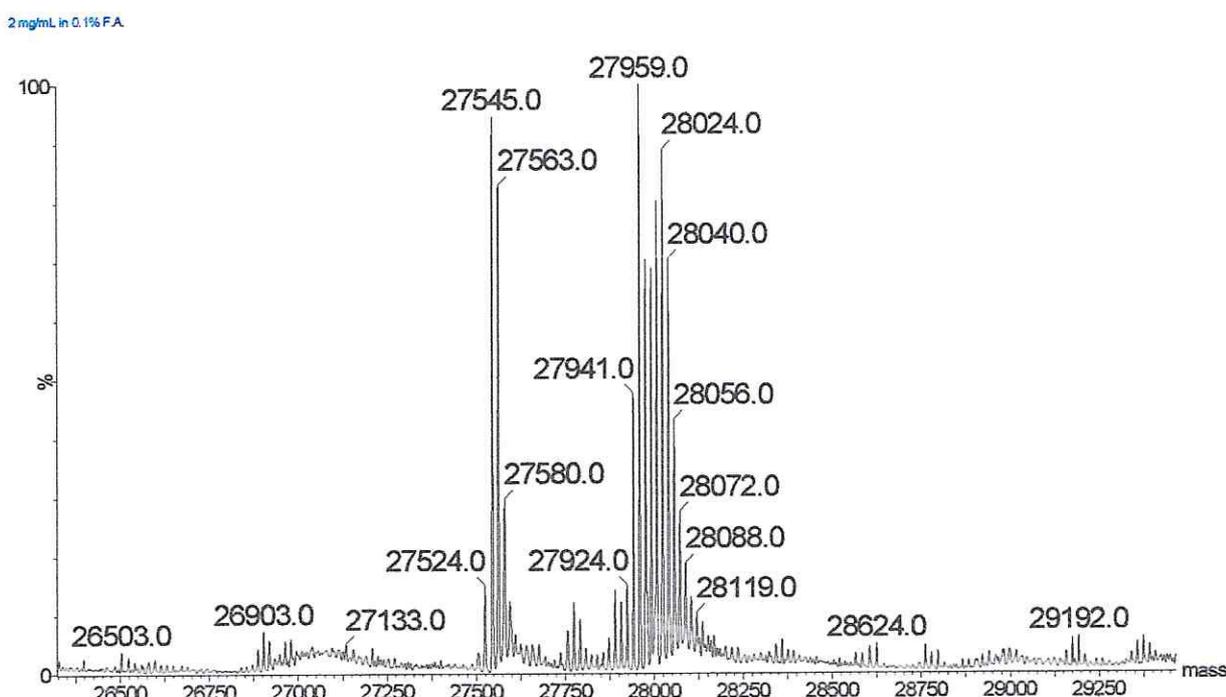


Figura 5. Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray. espectro de massa deconvolvido da Sjoestedina.

3.1.8.2 Sequenciamento por espectrometria de massa

Os peptídeos resultantes da digestão proteolítica provenientes das bandas eletroforéticas foram extraídos e injetados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (Waters nanoACQUITY UPLC BEH130 100 mm x 75 μ m, 1,7 μ m tamanho de partícula). A Figura 6 mostra o cromatograma da separação dos peptídeos da Sjoestedina.

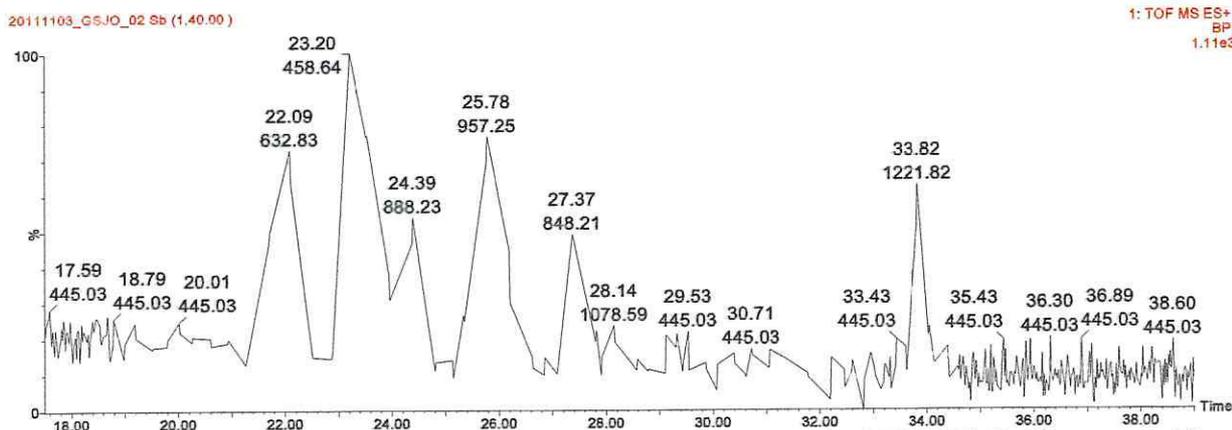


Figura 6. Cromatografia de fase reversa em nanocoluna nanoACQUITY UPLC BEH130. Perfil cromatográfico da separação dos peptídeos da Sjoestedina gerados pela digestão com tripsina.

A Figura 7 mostra um espectro de fragmentação MS/MS do peptídeo de massa molecular de 1.171,55 Da a partir do íon precursor duplamente protonado de $585,67\ 2H^+$. Os peptídeos da digestão enzimática com tripsina da Sjoestedina (Tabela 4) apresentaram identificação significativa com a lectina da ESA-2 e AML quando foram comparados com as informações dos bancos de dados. Os peptídeos apresentaram massas e sequências coincidentes com a isoforma 2 da lectina de *Eucheuma serra* (HORI *et al.*, 2007) e de *Amansia multifida* (SILVA, 2010).

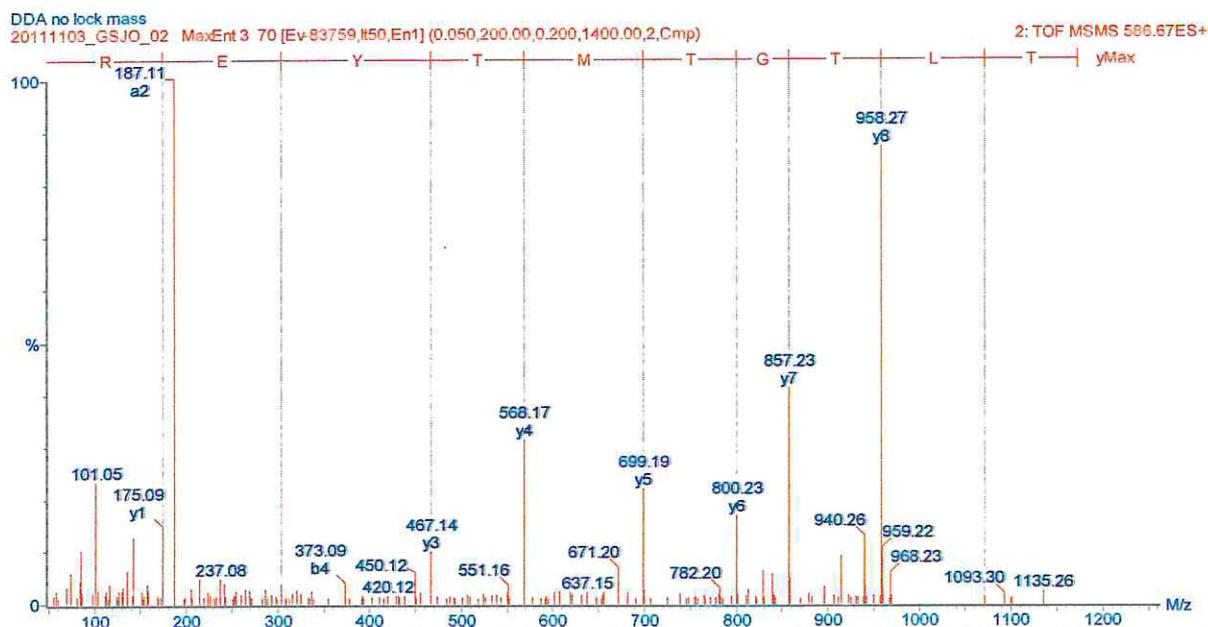


Figura 7. Espectro de fragmentação (MS/MS) do peptídeo de massa molecular de 1.171,55 Da. A fragmentação foi realizada com íon precursor duplamente protonado $585,67\ 2H^+$. Em vermelho: sequência de aminoácidos determinada pelas séries de íons y (C-terminal). A sequência resultante da interpretação do espectro de fragmentação é TLTGMTYER.

Tabela 4. Massas moleculares e sequência de aminoácidos dos peptídeos oriundos da digestão com tripsina identificada através da comparação com banco de dados.

Massa molecular (Daltons)*		Diferença de massa (Da)	Sequência de aminoácidos
Medida	Calculada		
2762.3570	2762.3198	0,03	YTVQNQWGGSSAPWNDAGLWILGSR
1171.5493	1171.5542	-0,004	TLTGTMTYER
1899.9060	1899.9400	0,034	TLTGTMTYEREGPIGFK
3476.6070	3476.6133	-0,006	GKLSGANNYSVENQWGGSSAPWNAAGDWLIGDR

*Valores determinados a partir das relações massa/carga (m/z) e valores calculados das sequências

Além disso, as sequências de aminoácidos dos peptídeos de Sjoestedina apresentaram alta homologia de sequência com outras proteínas, como a lectina da bactéria do solo *Myxococcus xanthus* (HORI *et al.*, 2007), a lectina da cianobactéria *Oscillatoria aghardii* (SATO *et al.*, 2000, SATO; HORI, 2009). Estes dados sugerem a existência de uma família de lectinas amplamente distribuídas entre os gêneros de algas vermelhas (*Euclima*, *Amansia*, *Gracilariopsis*) e cianobactérias.

Este elevado grau de identidade também pode justificar as semelhanças das características bioquímicas entre essas lectinas como estabilidade da proteína em uma ampla faixa de pH, por não dependerem de cátions divalentes para atividade hemaglutinante, sendo esse último bastante comum entre lectinas de algas marinhas.

Sabendo da elevada semelhança bioquímica entre a lectina de *A. multifida*, ESA-2 e a Sjoestedina e do grande potencial da ESA-2 para farmacologia como atividade mitogênica para linfócitos de ratos (KAWAKUBO *et al.*, 1999) e efeito citotóxico para células cancerígenas (SUGAHARA *et al.*, 2001), é interessante se investigar também essa potencialidade biotecnológica para a Sjoestedina.

O sequenciamento parcial da lectina permitirá que se possa desenhar oligonucleotídeos e estabelecer a sequência completa de aminoácidos através de técnicas de biologia molecular, e assim produzir a(s) lectina(s) recombinante(s), que é livre de isoformas podendo assim viabilizar os estudos cristalográficos e entender os mecanismos de ação biológica dessa lectina.

4 CONCLUSÃO

A obtenção da lectina *Gracilariopsis sjoestedti* por métodos cromatográficos de troca iônica mostrou-se eficiente.

Através da análise de espectrometria de massa obteve-se a massa molecular isotópica média da lectina e informações parciais da sua estrutura primária.

A Sjoestidina apresentou características bioquímicas semelhantes a outras lectinas, ESA-2 e lectina de *A. multifida*, isoladas de macroalgas marinhas vermelhas.

A sequência parcial da lectina Sjoestidina apresentou alta homologia com as lectinas das macroalgas marinhas vermelhas *A. multifida* e *Eucheuma serra*, e com lectinas da bactéria do solo *Myxococcus xanthus* e de uma cianobactéria *Oscillatoria aghardii*. A identidade das sequências sugere a existência de uma família de lectinas entre os gêneros de algas vermelhas e cianobactérias.

Sabendo da elevada semelhança bioquímica da lectina de *A. multifida*, ESA-2 e a Sjoestidina e do grande potencial dessas lectinas como ferramentas para farmacologia, é interessante investigar o potencial biotecnológico da lectina Sjoestidina.

REFERÊNCIAS

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. *Botanica Marina*, Berlin. v. 34, n. 3, p. 211-214, May 1991.

AINOUZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamion seaforthii* and *Bryothamion triquetrum*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 7, p. 15-19, 1995.

ALGAEBASE disponível em

<http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=15838&session=abv4:C813BE9D1d59327773kiW431A97C> Acesso em: 02 dez. 2011, 13:36.

BARONDES, S. H. Biofuncional properties of lectins redefined. *TIBS*. v. 13, p. 480-482, 1988

BELLORIN, A. M. *et al.*, *Gracilariopsis nclachlanii* sp. nov. and *Gracilariopsis persica* sp. nov. of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) from the Indian ocean. *Journal of Applied Phycology*, v. 44, p. 1022-1032, 2008.

BOYD, W.C.; ALMODÓVAR, L. R.; BOYD, L.G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *Transfusion*. v. 6, p. 82-83, jan/feb. 1966.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens suggested by test with lectins. In: *Plant Lectins. Molecular and Biological aspects. Ann. Ver. Plant Physiology*. v. 36, p. 209-234, 1954.

BLUNDEN, G.; ROGERS, D. J.; FARNHAM, W. F.; Survey of British seaweeds for hemagglutinins. *Lloydia*. v. 38, n. 2, p. 162-168, 1975.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAO, X. *et al.* Purification and characterization of a new D-galactose-specific lectin from the housefly, *Musca domestica*, and its antiproliferative effect on human K562 and MCF-7 tumor cells. *Journal of Insect Science*. v. 10, n. 79, p. 1-12, 2010.

CALVETE, J. J.; *et al.*, The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57, p. 343-350, 2000.

CARDOZO, K. H. M. *et al.*, Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

COSTA, F. H. F. *et al.* Purification and partial characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999.

CRITCHLEY, A. T. *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta): an economically important agarophyte. **Seaweed Cultivation and Marine Ranching**, p. 89-112, 1993.

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

DAY, J. G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.**, v. 35, p. 127-136, 1999.

DELATORRE, P. *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**. v.7, p. 52-61, 2007.

DUBOIS, M. *et al.*, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** v. 28, p. 350-356, 1956.

FABREGAS, J.; MUÑOZ, A.; LLOVO, J.; ABALDE, J. Agglutinins in marine red algae. **IRCS Medical Science**. v. 12, p.298-299, 1984.

FABREGAS, J.; LLOVO, J.; MUÑOZ, A. Hemagglutinins in red seaweeds. **Botanica Marina**. v.28, n. 12, p. 517-520, 1985.

FERREIRA, M. L. *et al.* Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**. v. 93, p. 971-980, 2011.

FERRIGE, A. G. *et al.* Dientangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Commun. Mass Spectrometry**, v. 6, p. 707-711, 1992.

- GABIUS, H. J.; GABIUS, S. **Glycoscience: Status and Perspectives**. Germany, 1997.
- GLODSTEIN, I. J. *et al.*, What should be called a lectin?. **Nature**, v.285, p. 60, 1980.
- GURGEL, A. F. D. *et al.*, Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence. **Journal Applied of Phycology**, v.39, p. 154-171, 2003.
- HAN, J. W.; *et al.*, Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, n. 2 p. 143-150, 2010a.
- HAN, J. W. *et al.*, Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. **Journal Applied of Phycology**, p. 1-9, August 2010b.
- HATAKEYAMA, T.; *et al.*, Purification and Characterization of Four Ca²⁺ Dependent Lectins from the Marine Invertebrate, *Cucumaria echinata*. **Jounal Biochemistry**. v. 116, p. 209-214, 1994.
- HOLANDA, M. L. *et al.*, Differential Activity of a Lectin From *Solieria filiformes* Against Human Pathogenic Bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1769- 1773, 2005.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**. v. 47, n. 6, p. 793-798, 1981.
- HORI, K. *et al.*, Strict specificity for high mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. **Glycobiology**, v. 17 n. 5, p. 479-491, 2007.
- HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYAZAWA, K. Primary stuctures of two hemagglutinins from the red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, n. 2, p. 226-236, Jan. 2000.
- IMBERT, A. *et al.* Structures of the Lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**. v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.
- ISHIRAHARA, K.; ARAI, S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from macroalga *Ulva limnetica* (Ulvales, Chlorophyta). **Phycological Research**, v. 57, p. 104-110, 2009.

JIMBO, M. *et al.* Purification, cloning and characterization of eggs lectins from the teleost *Tribolodon brnadi*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 147, p. 164-171, 2007.

JING, X. *et al.* Identification, molecular characterization and expression analysis of mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 851-858, 2001.

JUNG, M. G. *et al.*. Characterization of carbohydrate combining sites of bryohealin, an algal lectin from *Bryopsis plumose*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 6, p. 793-202, 2010.

KAMIYA, H.; OGATA, K.; HORI K. Isolation and characterization of a new lectin in the red alga *Palmaria palmata* (L) O. Kuntze. **Botanica Marina**, v. 15, p. 537-540, 1982.

KASTERN, K.; NAHNSEN, S.; MACEK, B. Mass spectrometry at the interface of proteomics and genomics. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 2, p. 284-291, 2011.

KAWAKUBO, A., *et al.* The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of the isolectins. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 331-338, 1997.

KAWAKUBO, A. *et al.*. Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 2, p. 149-156, Dec. 1999.

KIM, G. H. *et al.*, Purification and characterization of a lectin bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumose* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, p. 86-95, Feb, 2006.

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

LEE, R. E. **Phycology**. 3 ed. Cambridge University Press, United Kingdom, p. 614, 1999.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. **Seaweed Ecology and Physiology**. 1 edition. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

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

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

MABEAU, S. *et al.*, New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, p. 38-44, 1992.

MANN, M.; STEEN, H. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 699-711, 2004.

MORI, T. *et al.* Isolation and Characterization of Griffithsin, a Novel HIV-inactivating Protein, from the Red Alga *Griffithsia* sp. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9345-9353, 2005.

MOLCHANOVA, V. *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 53, p. 69-78, 2010.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a Lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

MUÑOZ, A.; LLOVO, J.; FABREGAS, J. Hemagglutininas de algas verdes. **Acta Científica Compostelana**, v. 22, p. 873-878, 1985.

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

NAGANO, C. S. *et al.* Crystallization and Preliminary X-ray diffraction analysis of HTML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformes*. **Acta Crystallographica section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, p. 997-999, Oct. 2005a.

NAGANO, C. S *et al.*, HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformes* define a novel lectin family. **Protein Science**, v. 14, n. 8, p. 2167-2176, 2005b.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. **Biochemistry Cellular Biology**, v. 84, n. 1, p. 49-54, 2006.

- NEVES, S. A. *et al.*, Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127-134, 2007.
- NIU, J. *et al.* Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 3, p. 502-512, 2009.
- NUNES, E. S. *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 5763, 2011.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, may 1995.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In **Biothecnology and Genetic Enginnering Reviews**, v. 15, n. 6, p. 199-228, 1998.
- PLASTINO, E. M.; URSI, S.; HEIMBECKER, A. M. C. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: **Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia**, v. 2, p. 359-369, 1998.
- RAMIREZ-M., G.; GIBBS, V. R.; CALVETE, J. J.; CARPENTER, G. B. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* from the Caribbean Sea. **European Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 105-112, 2007.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal** . 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 906, 2001.
- REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Editora Artmed, Porto Alegre, ISBN, 85-3630660-2, p. 280, 2006.
- ROGERS, D. J. *et al.*, A survey of some marine organisms for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 23, n.9, p. 569-577, 1980.
- ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W.; BALDING, P. Isolation and characterization of the lectins from Sub-species from *Codium fragile*. **Lectins**, v. 5, p. 155-160, 1986.

ROGERS, D. J.; FISH, B.; BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectin from two red marine algae; *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In J. Kocourek D. L. J. FREUD, (Eds). Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Proceedings of the 10th Lectin Meeting. Sigma Chemical Company, v. 7, p. 49-52, 1991.

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

ROLLEMBER, G. *et al.*, Isolation and characterization of the lectin from the Green marine alga *Ulva lactuca* L. *Botanica Marina*, v. 41, p. 427-433, 1998a.

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

SAMPAIO, A H. *et al.*, Hemaglutininas de Algas Marinhas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 5, n. 2, p. 171-177, 1993.

SAMPAIO, A. H. *et al.*, New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. *Journal Applied of Phycology*, v. 14, p. 489-496, 2002.

SILVA, L. M. C. M. *Atividades Antinociceptiva e Antiinflamatória da Lectina da Alga Marinha Vermelha Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Santelices & Hommersand. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SILVA, S. R. *Caracterização da lectina da alga marinha vermelha Amansia multifida* J. V. Lamouroux por espectrometria de massa. 2010. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SIMÕES, R. F. *Caracterização de Lectinas de Leguminosas por Espectrometria de Massa*. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SATO, T.; HORI, K. Cloning, expression and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardii*. *Fish Science*, v. 75, p. 743—753, 2009.

SATO, Y. *et al.*, Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 169-177, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n.11, p. 53R-62R, June. 2004.

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

SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bullettin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, n. 8, p. 1079- 1984, 1981.

STILLMARK, H. **Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L.** Und einigen anderen Euphorbiaceen, Tese de Doutorado. Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

SUGAHARA, T. *et al.*, The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, v. 36, p. 93-99, 2001.

SUN, J. *et al.*, Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 27, p. 290-297, 2008.

TSUBOI, I., *et al.*, T. Isolation of a Novel from the Hemolymph of Horseshoe Crabs *Limulus polyphemus* and its Hemagglutinating Properties. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 113, n. 1, p. 137-142, 1996.

VAN DAME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Isolectins in *Narcissus*: complexity, interand intraspecies differences and developmental control. **Physiology Plantarum**, v. 79, p. 1-6, 1990.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. *Algae: an introduction to Phycology*. 3 rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 627, 1995.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e a química analítica. *Química Nova*, v. 27, p. 139-145, 2004.

WANG, H *et al.*, Effects of lectins with different carbohydrate-binding especificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosacorma cell lines. *The International Journal of Biochemitry & Cell Biology*. v. 32, p. 365-372. 2000.

WANG, H. *et al.*, Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. *Acta Biochimistry and Biophysics Sinica*, v. 36, n.2, p. 111-117, 2004.

ZIÓLKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, p. 617-626, 2006.