



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

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL NAS ALGAS
MARINHAS VERMELHAS *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX E
Hypnea cervicornis J. AGARDH.

JONATAS BEZERRA DE SOUZA

TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA)
APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
ENGENHEIRO DE PESCA.

FORTALEZA - CEARÁ – BRASIL
JULHO/2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Orientador

Kyria Santiago do Nascimento, M.Sc.
Membro

Celso Shiniti Nagano, D.Sc.
Membro

VISTO

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc.
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

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

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

S238a Souza, Jonatas Bezerra de.

Avaliação dos métodos de extração de RNA total nas algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) lamouroux e *Hypnea cervicornis* j. agardh / Jonatas Bezerra de Souza. – 2017.

37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Alga marinha - Brasil, Nordeste. 2. Alga vermelha - Extração de RNA. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

Aos meus pais Gilvan
e Inêz, os quais tornaram
possível que eu chegasse
até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais pelo incentivo e dedicação constantes.

Ao professor Alexandre Holanda Sampaio pela orientação, apoio e, sobretudo, entusiasmo durante os experimentos, que foram essenciais para realização deste trabalho.

À professora Silvana Saker Sampaio por ser um exemplo de professora sempre dedicada e atenciosa às necessidades dos alunos.

À minha amiga e companheira de laboratório, Kyria Santiago do Nascimento, por acreditar sempre que o trabalho daria certo.

A todo o pessoal de BIOMOL-Lab, em especial a Eudismar Vale Nunes, por ter me ajudado tanto quando cheguei a este laboratório.

À minha turma no curso de Eng. de Pesca, pela alegria e descontração durante todo o curso.

Aos meus amigos, presença constante na minha vida e responsáveis por muito dos bons momentos que eu tive até hoje.

À Amanda, minha namorada, por todo o amor que tem me dado e pelo incentivo constante durante todo o curso.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Algas Marinhas	9
2.2 Extração de RNA total	9
2.2.1 Água Livre de RNases (água DEPC)	10
2.2.2 Método I: Concert Plant RNA Reagent	10
2.2.3 Método II: RNAspin Mini Kit	12
2.2.4 Método III: TRIzol Reagent	14
2.3 Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v)	16
2.4 Espectrofotometria	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v)	18
3.2 Espectrofotometria	20
4. DISCUSSÃO	21
4.1 Escolha dos métodos de extração de RNA total	21
4.2 A eletroforese como método de análise qualitativa	22
4.3 A espectrofotometria como método de análise quali-quantitativo	22
4.4 Combinação dos dados de eletroforese e espectrofotometria	23
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o melhor método, em termos de pureza e rendimento, de extração de RNA total das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Hypnea cervicornis*. Três métodos foram testados: Concert Plant RNA Reagent, RNAspin Mini Kit e RNAspin Mini Kit. As algas foram coletadas durante as baixa-mares de marés de sizígia na região do meso-litoral da praia do Pacheco, Município de Caucaia, Estado do Ceará e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório. Para analisar os resultados obtidos, ao final de cada método foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e amostras foram submetidas à espectrofotometria. Os resultados obtidos pela eletroforese e pela espectrofotometria mostraram que apenas o Concert Plant RNA Reagent foi eficaz para ambas as algas testadas, havendo qualidade no RNA total obtido e concentração de 1.078 ng/ μ L para *H. cervicornis* e 1.142 ng/ μ L para *H. musciformis*, valores adequados para usos subseqüentes do RNA total.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método Concert Plant RNA Reagent.	11
Figura 2. Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método RNAspin Mini Kit.	13
Figura 3. Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método TRIzol Reagent.	15
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método Concert Plant RNA Reagent. A banda 1 representa <i>H. cervicornis</i> , enquanto a 2 representa <i>H. musciformis</i> .	18
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método RNAspin Mini Kit. A banda 1 representa <i>H. cervicornis</i> , enquanto a 2 representa <i>H. musciformis</i> .	19
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método TRIzol Reagent. A banda 1 representa <i>H. cervicornis</i> , enquanto a 2 representa <i>H. musciformis</i> .	19

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação A_{260}/A_{280} e concentração, em $\text{ng}/\mu\text{L}$, do RNA total obtido de cada método de extração testado.	20

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL NAS ALGAS MARINHAS VERMELHAS *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX E *Hypnea cervicornis* J. AGARDH.

JONATAS BEZERRA DE SOUZA

1 – INTRODUÇÃO

Inúmeras evidências com suporte científico sugerem que a vida no Planeta Terra teve sua origem nos oceanos, muito embora o ambiente marinho seja caracterizado ainda por ser uma fonte de vida ainda pouco explorada cientificamente. Dentre os diversos seres vivos que ali habitam, as algas marinhas têm grande importância para o surgimento e manutenção da vida na Terra (GRAHAM; WILCOX, 2000). Elas possuem clorofila e realizam fotossíntese sendo, portanto, seres autotróficos. A fotossíntese realizada pelas algas é a mais importante dentre todos os vegetais, pois é responsável pela renovação da maior parte de oxigênio para o ar atmosférico, já que elas habitam uma área alagada referente a 70% da superfície do planeta Terra. As macroalgas estão agrupadas em três filos: Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae, apresentando uma enorme biodiversidade (LEE, 1999). As algas bentônicas são organismos sésseis, ou seja, necessitam de um suporte para se fixarem e se desenvolverem. Devido a esse fato, elas constituem uma rica reserva de substâncias naturais, provavelmente devido à necessidade de desenvolver estratégias de auto defesa contra os predadores existentes no ambiente natural e contra situações de estresse causadas pelas variações ecológicas dos ambientes de recifes de marés, área habitada pelas macroalgas marinhas (CARDOZO et al., 2007).

As algas marinhas representam mais de 90% das espécies de vegetais marinhos, sendo a maioria das espécies macroscópicas pertencentes às divisões Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta, (DRING, 1991). Esse grupo de organismos tem acentuada importância ecológica e econômica (ROUSSEAU et al., 2001), habitando uma grande variedade de ambientes e exibindo uma desconcertante disposição de morfologias celulares e ciclos de vida, (BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998) tendo, ainda, uma grande diferenciação quanto às características bioquímicas e morfológicas.

A extensa área costeira do litoral cearense e a diversidade de espécies encontradas nesta região (principalmente de algas multicelulares) constituem fontes de grande potencialidade para a descoberta de novos fármacos, com potencial aplicação em diversos tipos de patologia. Do total de 32.000 espécies bentônicas conhecidas de Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta, cerca de 250 táxons infragenéricos são conhecidos na costa do Estado do Ceará, a maioria ainda pouco exploradas.

O Estado do Ceará desponta como um dos estados brasileiros que mais tem apresentado desenvolvimento de tecnologias para o cultivo de recursos pesqueiros no Brasil, dentre eles o de algas marinhas. Os compostos extraídos de algas marinhas possuem uma aplicabilidade enorme e vários produtos comerciais envolvendo algas já estão presentes no mercado. Alguns desses compostos serão descritos a seguir.

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de algas marinhas são essenciais no funcionamento normal das próprias células, regulando a fluidez da membrana celular e adaptando as algas a diversas variações térmicas ambientais (GILL; VALIVETY, 1997). As algas são grandes produtoras de PUFAs precursores para a síntese de outros compostos como o linoleato e linolenato (ácidos graxos essenciais para os mamíferos). Quando ingeridos, esses PUFAs podem ser convertidos particularmente em γ -linolenato, eicosatrienoato e aracdonato. Esse último é um precursor essencial dos eicosanóides, que são lipídios reguladores envolvidos na inflamação, na febre, na sensação de dor, na coagulação sanguínea, na regulação da pressão sanguínea, na secreção ácida gástrica e em uma variedade de outros processos importantes na saúde e na doença dos seres humanos (FUNK, 2001). Tal fato torna as algas marinhas uma fonte rica em ácidos graxos

poliinsaturados de interesse farmacológico. A produção em larga escala de ácidos graxos ainda é ineficiente. Algas transgênicas projetadas para produção de tais ácidos poderiam fornecer uma fonte alternativa sustentável para o consumo humano. Entretanto, devido ao fato de organismos transgênicos serem ainda pouco aceitos no mercado, uma alternativa seria utilizar ácidos graxos poliinsaturados de algas transgênicas como fonte de alimento na aqüicultura. Desta maneira, os benefícios dos ácidos graxos poderiam ser transferidos à dieta humana, sem a necessidade de ingestão direta de alimentos modificados geneticamente (HOEK et al., 1998).

Os carotenóides representam uma classe de pigmentos acessórios importante na captação da luz nas algas marinhas, além de terem ação foto-oxidante, como, por exemplo, proteger a molécula de clorofila da oxidação. Essas moléculas de pigmentos apresentam um grande benefício na saúde humana pelo fato de serem uma fonte natural de provitamina A. A deficiência de vitamina A em seres humanos pode levar à morte. Muitos estudos têm associado consumo de carotenóides com diminuição de riscos de certas patologias (STANLEY et al., 2005). Muitas das experimentações médicas e nutritivas especulam que a atividade antioxidante dos carotenóides poderia ser o fator chave em reduzir a incidência de muitas doenças, especialmente aquelas mediadas pela luz (ANDREAS et al., 2004). Além disso, existe uma evidência considerável que demonstra que uma dieta elevada de carotenóides pode ocasionar uma diminuição de riscos de certos cânceres como o de próstata, como no caso do uso de licopeno (um precursor do γ -caroteno e δ -caroteno), encontrado em diversos vegetais como o tomate e, também, em algas marinhas (CANTRELL et al., 2003; TAPIERO et al., 2004).

Os ficocolóides são os principais polissacarídeos presentes na parede celular das algas e estão envolvidos em mecanismos de reconhecimento entre as algas e patógenos (POTIN et al., 1999). Os principais ficocolóides extraídos de algas são ágar, carragenana e alginato que apresentam propriedades espessante, geleificante, estabilizante ou emulsificante, sendo importante matéria-prima em indústrias, inclusive a alimentícia (BRAVIN; VALENTIN, 2002; REIS et al., 2003; REIS et al., 2007).

Ágar e carragenana são polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas vermelhas, enquanto o alginato é encontrado em algas marinhas

pardas. Estes compostos apresentam propriedades emulsificantes e alta viscosidade, que despertam permanente interesse industrial e científico.

Ágar é o nome dado para as galactanas sulfatadas de algas marinhas que contêm resíduos de α (1-4)-3,6-anidro-L-galactose e β (1-3)-D-galactose. Ele é usado em produtos alimentícios e também em meios de cultura biológicos. São importantes na área farmacêutica sendo usados em cápsulas como agentes laxantes e anticoagulantes. Na biologia molecular é utilizado em processos de separação de moléculas nas técnicas de eletroforese, imunodifusão, cromatografias, etc.

Carragenana é o nome genérico para a família de galactanas sulfatadas solúveis em água e consiste de um esqueleto alternado de α (1-4)-3,6-anidro-D-galactose e β (1-3)-D-galactose. As carragenanas são mais freqüentemente utilizadas que o ágar, como agentes emulsificantes em diferentes alimentos. As propriedades farmacêuticas das carragenanas, incluindo atividade antitumoral, antiviral e anticoagulante, vêm sendo recentemente descritas.

Alginato é o nome comum dado também à família de polissacarídeos sulfatados lineares compostos de resíduos de ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico unidos por ligações β -1,4. É utilizado na indústria têxtil como cola em fios de algodão e sua principal utilidade na indústria alimentícia é como geleificante em função da sua alta viscosidade. Seu potencial uso farmacêutico tem contribuído para o desenvolvimento de novas drogas com função antitumoral, anticoagulante (HALLEGRAEFF et al., 2003), antiviral (BUCK et al., 2006), anti-HIV (WALSH, 2003), dentre outras.

Registros mostram que inúmeras espécies de algas marinhas e dulcícolas são produtoras de toxinas (LANDSBERG, 2002). Essas toxinas podem ser acumuladas na cadeia alimentar em concentrações muito elevadas, tanto em peixes, como moluscos e crustáceos (CARMICHAEL, 2001). Quando ingeridas por humanos e animais domésticos podem ocasionar efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, citotóxicos e dermatotóxicos (CODD et al., 2005). Microcistinas, cilindrospermopsina, homo- e saxitoxinas são exemplos de toxinas de algas dulcícolas mais comuns, e são associados a espécies de *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (TÖRÖKNÉ et al., 2004).

Além destes compostos, as algas marinhas apresentam uma gama de outras moléculas que, embora em menor quantidade, apresentam propriedades biológicas de extrema importância, principalmente do ponto de vista biotecnológico. Entre estas moléculas podemos destacar as lectinas, que são (glico) proteínas de origem não imune com pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essas proteínas estão vastamente distribuídas nos seres vivos, tendo sido primeiramente descobertas em cobras por MITCHEL (1860), em plantas por STILLMARK (1888) e só em 1966 foram encontradas em algas por BOYD (1966) e colaboradores. Essas moléculas foram detectadas e estudadas em espécies nativas do litoral brasileiro pioneiramente por AINOUZ; SAMPAIO (1991). Todavia, ainda são poucos os trabalhos de detecção e isolamento de aglutininas em algas marinhas quando comparados aos estudos realizados em plantas superiores (KAWAKUBO et al., 1999).

As lectinas têm ocupado papel de destaque na aplicação biológica, exibindo atividades em processos celulares chave, como a comunicação célula-célula, fertilização e infecções por parasitas (GABIUS; GABIUS, 1997). Um exemplo marcante das possíveis aplicações dessas biomoléculas é o potencial inseticida mostrada por uma lectina purificada da macroalga marinha vermelha, *Gracilaria ornata* Aresch, contra o desenvolvimento larval do gorgulho *Callosobruchus maculatus* Fabr (LEITE et al., 2005), inseto que causa grandes perdas econômicas no armazenamento dos grãos produzidos no Brasil, destruindo entre 30% e 40% do milho, trigo, soja e arroz colhidos e até 50% da safra de feijão de corda (BRITO et al., 2006). Outra possível aplicação é o uso de uma lectina presente na macroalga marinha vermelha *Griffithsia* sp. contra o vírus HIV, podendo, inclusive, ser usada como agente microbicida para prevenir a transmissão da AIDS (MORI et al., 2005).

As lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas coletadas no litoral do Ceará *Hypnea musciformis* (NAGANO et al., 2002), *H. cervicornis* (NASCIMENTO et al., 2006), *Bryothamnion seaforthii* (AINOUZ et al., 1995) e *B. triquetrum* (AINOUZ et al., 1995; CALVETE et al., 2000), dentre outras, apresentam propriedades biológicas importantes e bastante diversificadas como: atividade mitogênica (HORI et al., 1987), indução e inibição linfocitária

(LIMA et al., 1998), atividade antifúngica (MELO et al., 1997), indução da migração de neutrófilo (NEVES et al. 2001), relaxação do músculo de aorta (LIMA et al., 2004), inibição da cárie dentária (TEIXEIRA et al., 2007), reconhecimento de células cancerosas em diferentes estágios de desenvolvimento (PINTO, 2001), etc.

A biologia molecular possui inúmeras ferramentas para identificar, extrair, amplificar e expressar um determinado gene de interesse, permitindo a produção em larga escala de proteínas recombinantes. Assim, podem-se evitar danos e modificações no meio ambiente onde se encontram as algas marinhas.

Com o descobrimento dos ácidos nucleicos, Ácido Desoxirribonucleico e Ácido Ribonucleico – respectivamente, DNA e RNA – ainda no século XIX (WATSON et al., 1992), os conhecimentos na área de biologia molecular têm se desenvolvido de uma maneira impensável há apenas algumas décadas. Acompanhado do surgimento de novas técnicas de investigação e análise, essa evolução tem permitido estudos dos mais variados tipos acerca dos mecanismos de armazenamento, transcrição e tradução da informação genética. Entretanto, a aplicação das técnicas de biologia molecular para o estudo de algas marinhas teve início apenas nos anos 90, tendo já se estabelecido como um meio confiável e sistemático para inferir sobre as relações evolucionárias entre as diferentes linhagens ou espécies (CHAN et al., 2006).

De um modo geral, estudos de investigação sobre a presença de substâncias naturais com potencial biológico em organismos marinhos apenas começaram, sendo já comprovadas ações antivirais, antitumorais, antibacterianas, dentre outras (SCHMIEGELOW, 2004). Nesse contexto, as algas marinhas têm se destacado como importante fonte dessas substâncias, tendo como exemplo o efeito antiviral contra a replicação do HIV-1 exibida por terpenos isolados da macroalga marinha parda *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörnig & Weber-Peukert (PEREIRA et al., 2004).

Como as proteínas são codificadas pelo DNA, que é transcrito em RNA, o qual é traduzido durante a síntese protéica, elas podem ser investigadas através de ferramentas de biologia molecular. Uma vantagem do uso de RNA, em vez de DNA, para o estudo de uma espécie em particular é sua

potencialidade para detectar estágios transitórios na vida de um organismo (ZHUANG, 2004). Entretanto, estudos de RNA têm, também, outras aplicações que não análises protéicas. Um exemplo é seu uso em estudos filogenéticos, um dos quais levanta a hipótese de as algas vermelhas e plantas terrestres serem grupos mais próximos do que se acredita (RAGAN; GUTELL, 1995). Indiretamente, com o uso de RNA pode-se, também, estudar o nível de expressão gênica, clonar e identificar genes, bem como expressar proteínas de interesse biotecnológico. Há de se ressaltar, aliás, que um tipo específico de RNA, o RNA ribossômico (rRNA), é a molécula mais amplamente utilizada para estudos filogenéticos (RIVAS et al., 2004).

Há três tipos de RNA em células vivas, cada um desempenhando um papel essencial na síntese protéica. CAMPBELL (2001) fala a respeito de cada um: o RNA transportador (tRNA) é o menor deles, havendo dúzias de diferentes espécies de tRNA, cada um se ligando especificamente a um dos aminoácidos que compõem as proteínas, podendo haver mais de um tRNA para um mesmo aminoácido; já o antes citado rRNA, bastante grande em relação aos tRNAs e com poucos tipos diferentes presente na célula, forma, juntamente com proteínas ribossomais os ribossomos, local onde ocorre a síntese protéica, aminoácido por aminoácido; e o RNA mensageiro (mRNA), molécula que reflete indiretamente a seqüência de DNA codificante para uma proteína específica e leva a mensagem do núcleo até o citoplasma, havendo um mRNA para cada proteína. Do RNA total presente em uma célula, 75% a 80% constitui-se de rRNA, ao passo que 10% a 15% são tRNA e não mais que 5% a 10% são representados pelo mRNA.

O isolamento de RNA total com alto grau de pureza é requisito inicial para o uso de várias técnicas de biologia molecular, como isolamento de genes através de RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction), análise do perfil de expressão gênica e construções de bibliotecas de cDNA, por exemplo (GEHRIG et al., 2000; PEARSON et al., 2006). Todavia, a extração de ácidos nucléicos de tecido vegetal geralmente é difícil devido à presença de polissacarídeos e polifenóis, fazendo-se necessário adequar os métodos existentes (CHAIRESZ et al., 2002). No tocante às macroalgas marinhas, CHAN et al. (2004) fala que os polissacarídeos agregam os metabólitos secundários que são liberados após o rompimento das membranas

celulares, dificultando o isolamento de RNA total. Há de se levar em conta, também, as diferenças de composição química das paredes celular entre algas de diferentes espécies, partes diferentes de um mesmo espécime e, ainda, entre algas da mesma espécie coletadas em épocas diferentes do ano, tornando o isolamento de RNA total desses organismos um procedimento com muitas dificuldades e muitas especificidades entre espécies diferentes.

Devido à impossibilidade de se extrair espécimes da população natural em níveis que supram a procura por biomoléculas de interesse sem oferecer riscos aos ambientes naturais, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de colocar as espécies alvo a salvo de uma exploração desenfreada e irresponsável e, ao mesmo tempo, de fornecer as quantidades requeridas das substâncias de interesse. Isso é particularmente verdade para as macroalgas marinhas, que apresentam rendimentos baixíssimos em estudos que envolvem suas proteínas. Assim, abordagens biomoleculares são um campo promissor como fonte desses produtos naturais, e essas técnicas freqüentemente requerem o isolamento de RNA total intacto e de boa qualidade (VÁZQUEZ et al., 2006).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo identificar o melhor método para isolar RNA total de duas algas marinhas vermelhas, *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux e *Hypnea cervicornis* J. Agardh.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Algas Marinhas

As algas marinhas vermelhas *Hypnea cervicornis* J. Agardh e *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, espécies pertencentes à família Hypneaceae, ordem Gigartinales, divisão Rhodophyta, foram coletadas durante as baixa-mares de marés de sizígia, quando uma maior zona do substrato estava exposta, na região do meso-litoral da praia do Pacheco, Município de Caucaia, Estado do Ceará.

Para evitar contaminação dos espécimes coletados com RNases presentes nas mãos, as coletas foram realizadas com o uso de luvas cirúrgicas. Após uma lavagem com água destilada e uma rápida limpeza de epífitas e fauna acompanhante foram escolhidas as regiões mais jovens dos talos devido ao fato de que, quanto mais jovem o tecido, maior a síntese protéica e, conseqüentemente, maior quantidade de RNA total. Depois desse procedimento, as amostras foram acondicionadas em um tanque contendo nitrogênio líquido (-196°C) para evitar a degradação do RNA. O material foi levado ao laboratório e, imediatamente foram realizados os experimentos. Foi realizada uma coleta para cada método testado.

2.2 – Extração de RNA total

Foram testados três métodos de extração de RNA total nas amostras coletadas: Concert Plant RNA Reagent, fabricado pela Invitrogen Corporation; RNAspin Mini Kit, fabricado pela GE Healthcare; e TRIzol Reagent, também fabricado pela Invitrogen Corporation. Luvas foram usadas durante todos os experimentos.

2.2.1 – Água livre de RNases (água DEPC)

Em algumas etapas durante os experimentos foi necessária a utilização de água livre de RNases para a realização de diluições e preparação de soluções. O procedimento para obtenção da água livre de RNases seguiu a metodologia indicada no protocolo TRIzol Reagent. Foram colocados 10mL de água deionizada em tubos de centrífuga de 15mL de volume, certificados como livre de RNA e RNases sendo, então, adicionado 0,1mL de dietil-piro-carbonato (DEPC), resultando em uma solução 1% (v/v) de DEPC e água, a qual foi deixada em repouso na bancada por 12 horas e finalmente autoclavada, estando pronta para sua utilização.

2.2.2 – Método I: Concert Plant RNA Reagent

O protocolo utilizado foi aquele indicado pelo fabricante e aplicado para cada uma das amostras de algas. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó do qual 0,1g foi posto em contato com 0,5mL de Plant RNA Reagent, em um tubo de micro-centrífuga de 1,5mL certificado como livre de RNA e RNases. A mistura foi homogeneizada e o tubo foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos.

Em seguida, foi centrifugado em temperatura ambiente por 2 minutos a 12.000 x g até a clarificação da solução. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de micro-centrífuga, onde foi adicionado 0,1mL de NaCl 5M, sendo novamente homogeneizado. Foi adicionado 0,3mL de clorofórmio e a solução foi homogeneizada através de inversão vigorosa dos tubos.

Foi realizada uma nova centrifugação, dessa vez a 4°C por 10 minutos, 12.000 x g, sendo a fase aquosa (superior) transferida para novos tubos, ao qual foi adicionado igual volume de álcool isopropílico seguido de nova incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. O material foi submetido a uma nova centrifugação seguindo os mesmos parâmetros da última realizada.

Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Ao precipitado obtido, foi adicionado 1mL de etanol 75%, ocorrendo uma nova centrifugação por 1 minuto a 12.000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado foi ressuspenso em

um volume de 0,01mL a 0,03mL água livre de RNases. A Figura 1 mostra todas as etapas do procedimento empregado.

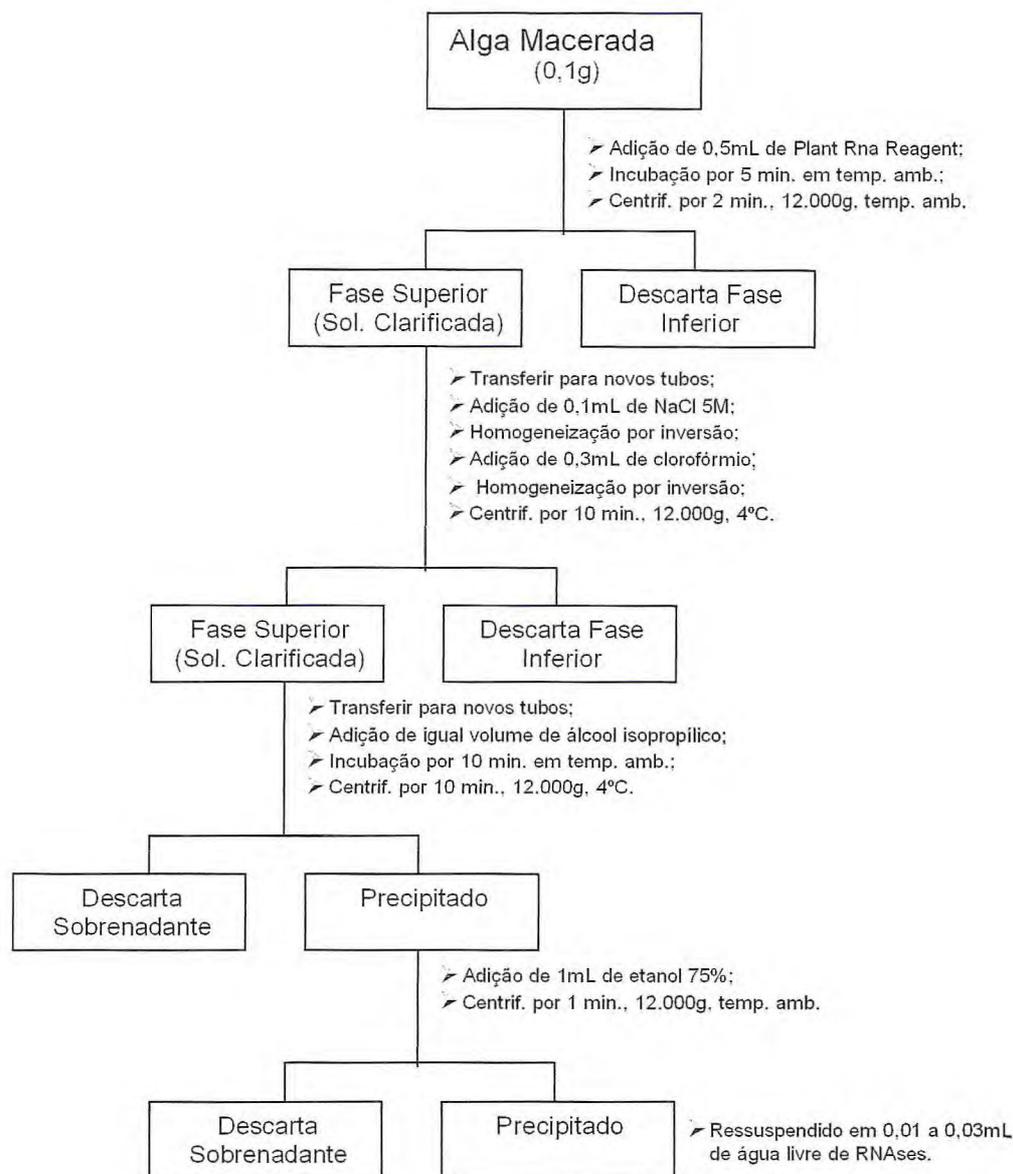


Figura 1 – Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método Concert Plant RNA Reagent.

2.2.3 – Método II: RNAspin Mini Kit

Novamente, o mesmo procedimento foi utilizado para cada espécie, conforme metodologia presente no manual do fabricante. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e 0,03g foi posto em contato, em um tubo de micro-centrifuga de 1,5mL certificado como livre de RNA e RNases, com 0,35mL de tampão RA1, fornecido pelo kit, mais 3,5 μ L de β -mercaptaetanol sendo, então, vigorosamente agitada com auxílio de um vortex. O homogeneizado foi colocado em unidades RNAspin Mini Filters, fornecidos com o kit, com seu respectivo tubo de coleta, sendo centrifugado por 1 minuto a 11.000 x g. O filtrado foi transferido para um novo tubo de micro-centrifuga.

Foi adicionado 0,35mL de etanol 70%, sendo a mistura agitada vigorosamente por 5 segundos. O homogeneizado foi colocado em uma coluna RNAspin Mini, acondicionada em um tubo de micro-centrifuga que serviu como tubo de coleta e então centrifugado a 8.000 x g por 30 segundos. A fração eluída foi descartada e a coluna foi colocada em um novo tubo.

Após a adição de 0,35mL de Membrane Desalting Buffer, foi realizada uma nova centrifugação a 11.000 x g, por 1 minuto, sendo, então, descartada a fração eluída e a coluna colocada em um novo tubo. Posteriormente foram adicionados 95 μ L de DNase Reaction Mixture, diretamente no centro da coluna, e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Foi adicionado à coluna 0,2mL de tampão RA2, a temperatura ambiente, centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto, sendo descartada a fração eluída e a coluna colocada em um novo tubo. Posteriormente, foi adicionado 0,6mL de tampão RA3, em temperatura ambiente, centrifugado nas mesmas condições, a fração eluída descartada e a coluna colocada em um novo tubo. Finalmente, foram adicionados 0,25mL de tampão RA3 à coluna seguido de uma nova centrifugação por 2 minutos.

A fração retida foi eluída através da adição de 0,1mL água livre de RNases fornecida pelo kit e centrifugação a 11.000 x g por 1 minuto. A Figura 2 mostra uma visão geral do processo descrito acima.

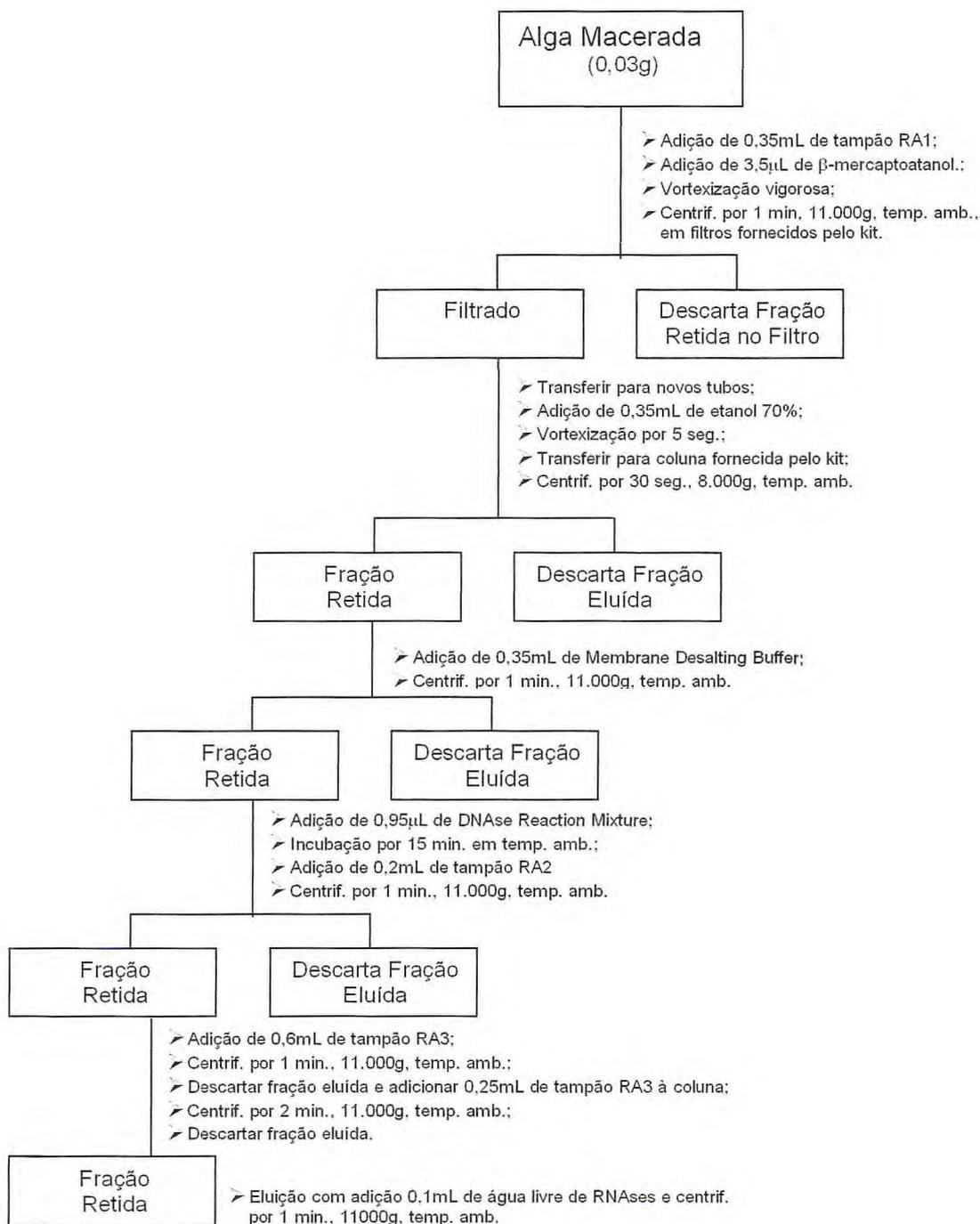


Figura 2 – Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método RNAspin Mini Kit.

2.2.4 – Método III: TRIzol Reagent

Este procedimento também foi realizado para cada espécie, sendo seguidas as instruções presentes no manual do fabricante. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e 0,1g do material foi posto em contato com 1mL de TRIzol Reagent em um tubo de micro-centrífuga de 1,5mL certificado como livre de RNA e RNases, sendo então invertida até que se obtivesse uma solução homogênea. Uma centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C foi realizada e o sobrenadante foi recuperado.

O sobrenadante foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Então, foi adicionado 0,2mL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e, após, incubados a temperatura ambiente por 3 minutos, sendo, então, centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi recuperada e colocada em novos tubos.

Adicionou-se 0,5mL de álcool isopropílico, ocorrendo outra incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, acontecendo nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi lavado através de adição de 1mL de etanol 75%. Após vortexização, o homogeneizado foi centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto para secar parcialmente o precipitado. Este foi ressuscitado através da adição do menor volume possível de água DEPC. Na Figura 3 há uma visão geral do processo.

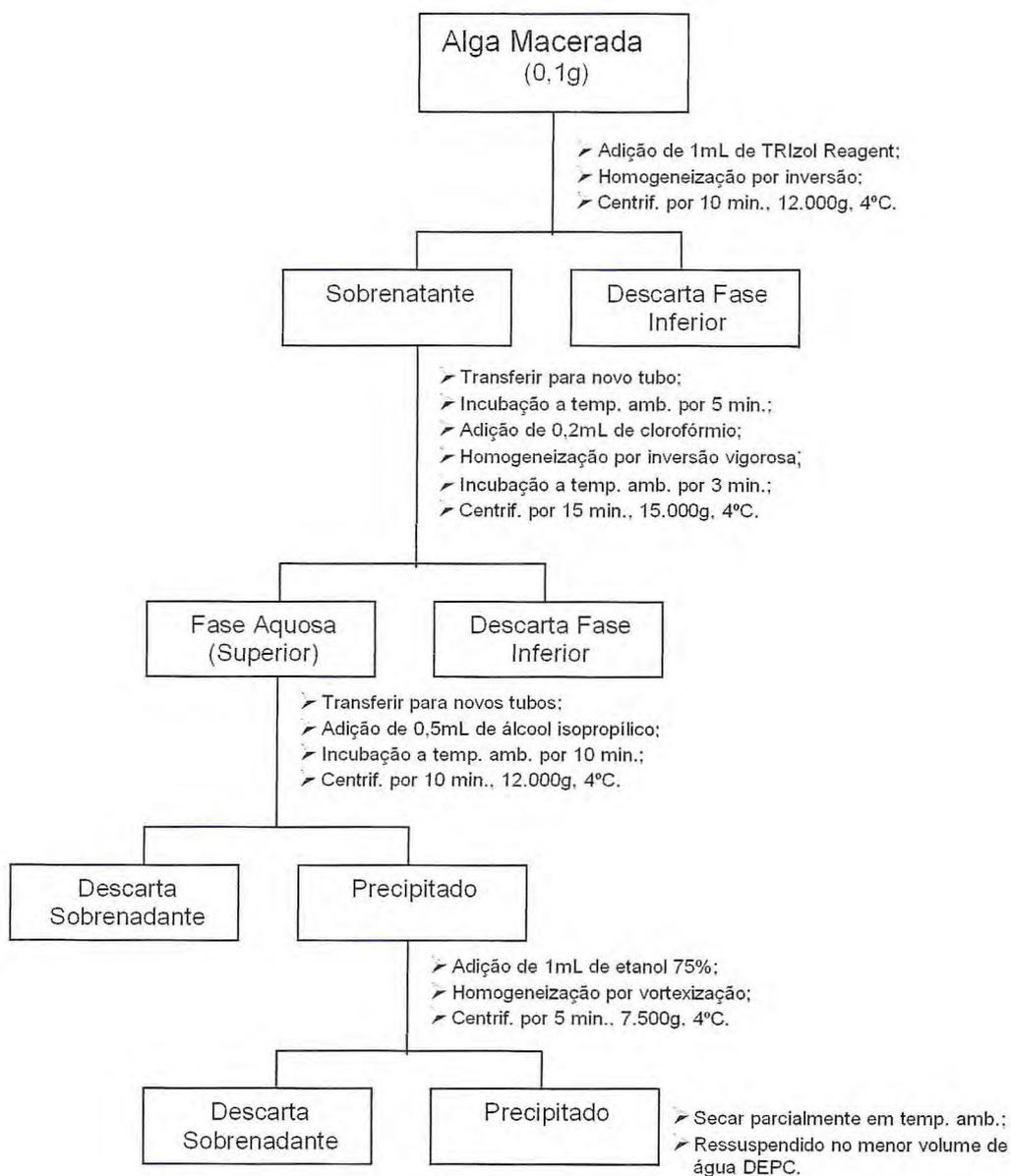


Figura 3 – Resumo dos procedimentos realizados durante a extração pelo método TRIZOL Reagent.

2.3 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v)

Ao final de cada método, para analisar os resultados foi feita uma eletroforese de acordo com o protocolo descrito por BARTLETT; STIRLING (2003). Foi preparado 1L de uma solução estoque de TAE (Tris-Acetato-EDTA), cinquenta vezes concentrada, através da adição de 242g de Tris a 100mL de EDTA 0,5M e pH 8,0, dissolvidos em 800mL de água destilada e autoclavada ao qual foram adicionados 57,1mL de ácido acético glacial, completando, então, o volume da solução para 1L. A partir da solução estoque foram preparados 280mL de TAE 1x, retirando uma alíquota de 5,6mL da solução 50x e adicionando água destilada e autoclavada até o volume desejado. Foram então pesados 0,36g de agarose, que foi adicionado a 30mL de tampão TAE 1x. A mistura foi fundida até que a agarose foi totalmente dissolvida. Após resfriamento até 50°C, a mistura foi colocada na forma, e deixada em repouso até sua completa solidificação.

Uma amostra de cada um dos experimentos foi retirada, sendo adicionado igual volume de azul de bromofenol 0,25% (m/v) e glicerol 30% (v/v), preparados em água destilada e autoclavada. O gel solidificado foi submerso em 250mL de TAE 1x, o suficiente para cobri-lo com uma camada de 1mm de espessura, e carregado com as amostras. Após isso, foi aplicada uma voltagem de 100V. Quando a frente de corrida atingiu 2/3 do comprimento do gel, o que pôde ser visto devido ao azul de bromofenol, a corrida foi interrompida e desligada a fonte.

O gel foi mantido submerso em tampão TAE 1x, ao qual foi adicionado brometo de etídio a partir de uma solução estoque contendo 10mg/mL, em água, adição suficiente para atingir uma concentração de 0,25µg/mL. Após 10 minutos em temperatura ambiente, o gel foi visualizado em um transluminador de raios ultravioleta e, então, fotografado.

2.4 – Espectrofotometria

Ao final de cada método, a concentração e pureza do RNA total obtido foram examinados através de absorvância de raios ultravioleta usando-se o espectrofotômetro Gene Quant DNA/RNA Calculator (Pharmacia Biotech). O aparelho foi zerado com água DEPC. O fator de diluição aplicado foi de 50, retirando-se 0,002mL da amostra e diluindo-a em 0,098mL de água DEPC. A pureza foi dada em relação à contaminação por proteínas, medida pela relação entre os valores de absorvância da amostra a 260nm e a 280nm (A_{260}/A_{280}). Para RNA, uma unidade de absorvância a 260 nm representa 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SAMBROOK, RUSSEL, 2001). Entretanto, o aparelho aqui utilizado dava a concentração de maneira direta, em $\text{ng}/\mu\text{L}$, sendo necessário, apenas, informar o fator de diluição.

3 – RESULTADOS

3.1 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v)

A eletroforese serviu como indicador qualitativo de como ocorreu o processo de extração para cada um dos métodos utilizados, sendo determinado se o procedimento obteve um resultado positivo ou negativo. O resultado foi considerado positivo pela presença de duas bandas relativamente puras, as quais caracterizariam as subunidades 28S (superior) e 18S (inferior), enquanto o resultado negativo foi a ausência desses indicadores.

As Figuras 4, 5 e 6 mostram fotos dos géis obtidos pela eletroforese realizada para cada um dos métodos testados.



Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método Concert Plant RNA Reagent. A banda 1 representa *H. cervicornis*, enquanto a 2 representa *H. musciformis*.



Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método RNAspin Mini Kit. A banda 1 representa *H. cervicornis*, enquanto a 2 representa *H. musciformis*.



Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) para o método TRIzol Reagent. A banda 1 representa *H. cervicornis*, enquanto a 2 representa *H. musciformis*.

3.2 – Espectrofotometria

A espectrofotometria serviu para analisar os resultados tanto qualitativamente, pela indicação de contaminação por proteínas em cada uma das preparações testadas, medida pela relação A_{260}/A_{280} , sendo o valor inversamente proporcional à contaminação; como, também, quantitativamente, pelo conhecimento da concentração de RNA total de cada experimento, expresso em $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Os valores da relação A_{260}/A_{280} variaram de 0,66 até 1,82, enquanto que a concentração variou de 0,455 $\text{ng}/\mu\text{L}$ até 1.142 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Os dados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação A_{260}/A_{280} e concentração, em $\text{ng}/\mu\text{L}$, do RNA total obtido de cada método de extração testado.

Método	Relação A_{260}/A_{280}		Concentração ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	
	<i>H. cervicornis</i>	<i>H. musciformis</i>	<i>H. cervicornis</i>	<i>H. musciformis</i>
Concert Plant RNA Reagent	1,82	1,63	1.078	1.142
RNAspin Mini Kit	0,79	0,66	0,455	0,655
TRizol Reagent	1,33	1,41	0,674	0,766

4 – DISCUSSÃO

4.1 – Escolha dos métodos de extração de RNA total

Os tecidos algais, apesar de apresentarem semelhança com os tecidos de plantas superiores, possuem características que os tornam únicos dentre os seres vivos, aumentando as dificuldades de se achar um método adequado à extração de RNA desses organismos. Assim, os métodos foram escolhidos com base na sua aplicação, analisando-se a sua eficiência às algas testadas. Vale ressaltar a importância do congelamento rápido da amostra coletada, feita através de nitrogênio líquido, o que reduz a degradação do RNA (CHAN et al., 2004).

De acordo com o manual do Concert Plant RNA Reagent, o método permite a extração de RNA com qualidade de tecidos vegetais ricos em polifenóis e amido, sendo interessante testá-lo devido à semelhança entre macroalgas e plantas superiores bem como à presença dessas substâncias em macroalgas.

Por outro lado, o manual do RNAspin Mini Kit descreve que o método faz uso de reagentes os quais contêm tiocianato de guanidina, amplamente utilizado em isolamentos de RNA devido à sua capacidade de inibir a ação de RNases (CHAN et al., 2004), juntamente com a utilização de membranas contendo gel de sílica, o qual tem afinidade por RNA (DENG et al., 2005). Esse método está baseado na ação de um tampão o qual rompe as membranas celulares e inativa RNases ao mesmo tempo em que cria condições as quais favorecem a afinidade do gel pelo RNA. Há, ainda, o uso de DNases, que evita a contaminação por DNA, o qual também tem afinidade pelo gel. Foi escolhido por ser um método com ampla aplicação, podendo ser usado para as mais variadas extrações de RNA total, como culturas de células, leveduras, bactérias e tecidos em geral.

O terceiro método utilizado, o TRIzol Reagent, faz o uso de isotiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio. É bastante utilizado por ser rápido e manter a qualidade do produto final. É uma técnica que pode ser utilizada com pequenas (50 a 100mg) ou grandes quantidades (mais que 1g) de material inicial, seja ele

de origem humana, vegetal ou bacteriana (SIMMS et al., 1993), sendo escolhido, também, devido à sua vasta aplicação.

4.2 – A eletroforese como método de análise qualitativa

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica bastante utilizada para analisar a qualidade dos ácidos nucleicos com os quais se está trabalhando, podendo ser utilizada para análise de fragmentos tanto de DNA quanto de RNA, dos mais variados tamanhos, dispostos em fita simples ou dupla. De acordo com a concentração de agarose, é possível controlar a porosidade do gel, sendo que a concentração de 1,2% de agarose é indicada para análise de fragmentos de 400 a 6000 pares de bases, faixas em que se encontram os ácidos nucleicos presentes no RNA total isolado e não degradado (BARTLETT; STIRLING, 2003).

Um isolamento de RNA total feito de forma satisfatória acarreta em um gel no qual é possível a visualização de duas bandas bem definidas, uma representando a parte 28S do rRNA (a banda superior) e a outra mostrando a subunidade 18S do rRNA. A boa definição dessas bandas se dá pelo fato de que entre 75% e 80% do RNA total é formado por rRNA. Assim, como pode ser observado na Figura 4, o Concert Plant RNA Reagent gerou um RNA total de qualidade, com as bandas 28S e 18S bem visíveis e livres de contaminação e degradação. Por outro lado o RNAspin Mini gerou um RNA bastante degradado, o que pode ser evidenciado pelo arraste presente na Figura 5, resultado semelhante ao obtido pelo TRIzol Reagent, porém com menor grau de degradação (Figura 6).

4.3 – A espectrofotometria como método de análise quali-quantitativo

SAMBROOK; RUSSEL (2001) descrevem a espectrofotometria como um método rápido não destrutivo capaz de calcular a concentração de ácidos nucleicos presentes numa amostra, bem como seu grau de contaminação por proteínas. Como a absorbância medida a 260nm indica a concentração de

ácidos nucleicos e a absorvância a 280nm indica a presença de proteínas, a relação A_{260}/A_{280} tem sido bastante utilizada para medir a pureza do RNA em relação às proteínas. Uma preparação com RNA relativamente puro deveria ter relação A_{260}/A_{280} com valor em torno de 2.

Entretanto, WILFINGER et al. (1997) mostram que o pH da solução na qual se encontra o RNA total afeta a leitura de absorvância sendo que, quanto mais ácida a solução, menor a relação A_{260}/A_{280} . Soma-se a isso o fato de que a simples mudança na fonte da água usada para o experimento influencia a leitura e que mesmo água proveniente de sistemas comerciais HPLC fornecem água em pH ácido. Para que a relação tenha valor em torno de 2 é necessário que o RNA esteja diluído em uma solução tamponada ligeiramente básica, com pH entre 8,0 e 8,5. Como no presente trabalho todas as amostras foram diluídas em água DEPC obtida através de água deionizada, os valores da relação A_{260}/A_{280} foram menores do que o indicado em literatura para preparações de RNA total relativamente puro.

4.4 – Combinação de dados de eletroforese e espectrofotometria

Quando os dados obtidos pela eletroforese e pela espectrofotometria são vistos em conjunto, pode se observar claramente que o Concert Plant RNA Reagent foi um método bastante eficaz para a extração de RNA total das macroalgas marinhas estudadas, *H. cervicornis* e *H. musciformis*. O gel (Figura 1) apresenta bandas bem definidas, livre de contaminação e com o padrão esperado de bandas, a despeito do valor abaixo de 2 obtido para a relação A_{260}/A_{280} . Vale ressaltar, ainda, que a concentração obtida tem um valor mais que suficiente para que, dando prosseguimento às etapas de purificação, o mRNA seja purificado.

Já o RNAspin Mini Kit apresentou, além de uma degradação evidente, grande contaminação por proteínas e baixas concentrações de RNA total, sendo o pior método dos três que foram testados, enquanto o TRIzol Reagent obteve posição intermediária, fornecendo um RNA total com algum grau de degradação e relativa baixa contaminação por proteínas, quando comparado

ao método anterior. Porém, à semelhança daquele, também apresentou baixas concentrações de RNA total, impedindo a subsequente purificação de mRNA.

É importante destacar um acontecimento interessante: quando se realiza um isolamento de RNA total, espera-se que o precipitado final seja uma mancha transparente no tubo, quase invisível. Para as algas testadas, com o método que se mostrou efetivo, o Concert Plant RNA Reagent, o precipitado final apresentou uma tonalidade rosa, provavelmente devido à incapacidade do procedimento em remover alguns pigmentos. Entretanto, em vez de problemático, esse fato tornou-se benéfico, pois facilitou a visualização do RNA total e não contaminou a amostra a ponto de inviabilizar seu uso em atividades posteriores.

5 – CONCLUSÕES

1. O Concert Plant RNA Reagent foi o método mais eficaz para a extração de RNA total das macroalgas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Hypnea cervicornis*, fornecendo RNA com qualidade e em concentração suficiente para a purificação de mRNA.
2. O RNAspin Mini Kit não foi eficiente para a extração de RNA total de *H. musciformis* e *H. cervicornis*, apresentando um RNA muito degradado, bastante contaminado por proteínas e em baixa concentração.
3. O TRIzol Reagent não foi eficiente para a extração de RNA total de *H. musciformis* e *H. cervicornis*, apresentando um RNA que, apesar de mostrar contaminação por proteínas mais baixa que o método anterior, esta já se mostrou elevada havendo, ainda, uma concentração muito baixa para posterior purificação de mRNA.

6 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Bot. Mar.** v.34, p. 211–214, 1991.

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

ANDREAS, W. P.M.; OESTERHELT, C.; GROSS, W.; BRAUTIGAM A.; IMBODEN, L. A.; KRASSOVSKAYA I.; LINKA, N.; TRUCHINA, J.; SCHNEIDERREIT, J.; VOLL, H.; VOLL, M.; ZIMMERMANN, N.; JAMAI, A.; RIEKHOF, W. R.; YU, B.; GARAVITO, R. M.; BENNING, C. EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. **Plant Molecular Biology.**, v. 55, p. 17–32, 2004.

BARLETT, J. M. S.; STIRLING, D. PCR Protocols. Second Edition. Humana Press. Totowa. 2003.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. **Plant Physiol.** v.116, p. 9–15, 1998.

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

BRAVIN, I. C.; VALENTIN, Y. Y. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). **Revista Brasil. Bot.** v.25, n.4, p. 469-474, 2002.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; DE BORTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; ROBERTS, J. N.; MULLER, M.; LOWY, D. R.; SCHILEER, J. T. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **Plos Pathogens.**, v. 2, n. 7, p. 671-680, 2006.

CALVETE, J. J.; COSTA, F. H. F.; SAKER, S. S.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; BLOCK JR. C.; SILVEIRA, S. B.; FREITAS, B. T.; SAMPAIO, A. H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences.**, v. 57, n. 2, p. 343-350, 2000.

CAMPBELL, M. K. Bioquímica. Terceira Edição. Artmed. Porto Alegre. 2000.

CANTRELL, A.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G.; RANCAN, F.; BÖHM, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v. 412, p. 47–54, 2003.

CARDOZO, K. H.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology.**, 2007 (in press).

CARMICHAEL, W. W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: The CyanoHABs. **Human and Ecological Risk Assessment.**, v. 7, n. 5, p. 1393–1407, 2001.

CHÁIREZ, M. L. V.; HERNÁNDEZ, A. C.; LÓPEZ, O. P. Isolation of Functional RNA From Cactus Fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 279–286, 2002.

CHAN, C. X.; TEO, S. S.; HO, C. L.; OTHMAN, R. Y.; PHANG, S. M. Optimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v.16, p. 297–301, 2004.

CHAN, C. X.; HO, C. L.; PHANG, S. M. Trends in seaweed research. **TRENDS in Plant Science**, v.11, p. 165-166, 2006.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology.**, v. 203, n. 3, p. 264–272, 2005.

DENG, M. Y.; WANG, H.; WARD, G. B.; BECKHAM, T. R.; MCKENNA, T. S. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription–PCR. **J Vet Diagn Invest**, v. 17, p. 574–578, 2005.

DRING, M. J. The Biology of Marine Plants. Cambridge University Press. United Kingdom. p. 1, 1991.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoids biology. **Science.**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S. Glycosciences: Status and Perspectives. Chapman and Hall. Germany. 1997.

GEHRIG, H. H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.; BORLAND, A.; TAYBI, T. An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 369–376, 2000.

- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and application. **Trends in Biotechnology.**, v. 15, p. 401–409, 1997.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Wilcox. ALGAE. Prentice Hall, New York, 736pp. 2000.
- HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. Harmful algal blooms. A global review. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC manuals and Guides, v. 22. UNESCO, Paris, 2003.
- HOEK, C; VAN DEN; MANN, D. G; JAHNS, H. M. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press. United Kingdom. 627 pp. 1998.
- HORI, K.; MATSUDA, H.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Mitogenic agglutinin from red alga *Carpopeltis flabellate*. **Phytochemistry.**, v.26, n. 5, p. 1335-1338, 1987.
- KAWAKUBO, A.; MAKINO, H.; OHNISHI J. I.; HIROHARA, H.; HORI, K. Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus Eucheuma. **Journal of Applied Phycology.**, v.11, n. 2, p. 149–156, 1999.
- LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science.**, v. 10, n. 2, p. 113–390, 2002.
- LEE, R. E. PHYCOLOGY. Third edition. Cambridge University Press. United Kingdom. 645 pp. 1999.
- LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1724, p. 13 –145, 2005.
- LIMA, H. C.; COSTA, F. H. F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S. A.; BENEVIDES, N. M. B.; TEIXEIRA, D. I. A.; ROGERS, D. J.; FREITAS, A. L. P. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology.**, v. 10, p. 153-162, 1998.
- LIMA, R. F.; CREDDLE, D. N.; SOUZA, E. P.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.**, v. 56, n. 11, p. 1415-1421, 2004.
- MELO, V. M. M.; MEDEIROS, D. A.; RIOS, F. J. B.; CASTELAR, L. I. M.; CARVALHO, A. F. F. U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, v. 40, n. 4, p. 281-284, 1997.

MITCHELL, S. W. Researchs upon the venom of the Rattlesnake. Smithsonian Institute. Philadelphia, USA. **Monography**. 145pp. 1860.

MORI, T.; O'KEEFE, B. R.; SOWDER II, R. C.; BRINGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; BUCKHEIT Jr., R. W.; McMAHON, J. B.; BOYD, M. R. 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.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH, J. R. C.; PRATES, M. V.; C ALVETE, J. J.; SAMPAIO, S. S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, v.9, n.2, p. 159-165, 2002.

NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; NUNES, E. V.; RODRIGUES, R. F.; GOERSCH, G. V.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J.; SAMPAIO, S. S.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H. Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis*, J. Agardh. **Biochemistry and Cell Biology**, v.84, n.1, p. 49-54, 2006.

NEVES, S. A; DIAS, B. M.; FREITAS, A. L. P.; ROQUE, B. M. C. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**., v. 50, n. 10, p. 486-490, 2001.

PEARSON, G.; LESTON, A. L.; VALENTE, M.; SERRÃO, E. An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Eur. J. Phycol**, v. 41, p. 97–104, 2006.

PEREIRA, H. S.; FERREIRA, L. R. L.; MOUSSATCHÉ, N.; TEIXEIRA, V. L.; CAVALCANTI, D. N.; COSTA, L. J.; DIAZ, R.; FRUGULHETTI, I. C. P. P. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, v.64, p. 69–76, 2004.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**., v. 109, p. 347–352, 1995.

PINTO, V. P. T. Utilização de lectinas na caracterização bioquímica de antígenos de natureza glicídica presentes na membrana de cinco variantes de células de câncer de cólon humano. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE. 107 pp. 2001.

POTIN, P.; BOUARAB, K.; KUPPER, F.; KLOAREG, B. Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant–microbe interactions. **Current Opinion in Microbiology**., v. 2, p. 276–283, 1999.

RAGAN, M. A.; GUTELL, R. R. Are red algae plants? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 81-105, 1995.

REIS, R. P.; LEAL, M. C. R.; VALENTIN, Y. Y.; BELLUCO, F. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). **Acta bot. bras.**, v.17, n.2, p. 279-286, 2003.

REIS, R. P.; VALENTIN, Y. Y.; SANTOS, C. P. Spatial and temporal variation of *Hypnea musciformis* carrageenan (Rhodophyta - Gigartinales) from natural beds in Rio de Janeiro State, Brazil. **J Appl Phycol**, 2007.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; PIÑEIRO, J. L. Z.; MATEOS, P. F.; MOLINA, E. M. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p. 413– 426, 2004.

ROUSSEAU, F.; BURROWES, R.; PETERS, A.F.; KUHLENKAMP, R.; REVIERS, B.A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences. **Life Sciences**, v.324, p. 305–319, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular Cloning: A laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1989.

SCHMIEGELOW, J.M.M. O Planeta Azul: Uma Introdução às Ciências Marinhas. Interciência. Rio de Janeiro. p. 2, 2004.

SIMMS, D.; CIZDZIEL, P. E.; CHOMCZYNSKI, P. TRIzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus (Gaithersburg)**, v. 15, p. 99–102, 1993.

STANLEY, M. S.; RUTH, M; PERRY, R. M.; JAMES A. C. J. A. **Analysis of expressed sequence tags from the green alga *Ulva linza* (Chlorophyta)**. *Journal of Phycology*, v. 41, p. 1219–1226, 2005.

STILLMARK, H. Über ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und einigen anderen euphobiaceen. **PhD Thesis**, University of Dorpat, Dorpat (Tartu). 1888.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v. 58, p. 100–110, 2004.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; SOUZA, J. B.; HAVT, A.; PINTO, V. P. T.; GONÇALVES, R. B.; FARIAS, W. R. L.; SAKER, S. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to enamel acquired pellicle by algae Lectins. **Journal of Applied Microbiology**, 2007 (in press).

TÖRÖKNÉ, A.; ASZTALOS, M.; BANKINE, M.; BICKEL, H.; BORBELY, G.; CARMELI, S.; CODD, G. A.; FASTNER, J.; HUANG, Q.; HUMPAGE, A.; METCALF, J. S.; RABAI, E.; SUKENIK, A.; SURANYI, G.; VASAS, G.

WEISZFEILER, V. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 280–284, 2004.

VÁZQUEZ, L. Z. S.; RANZER, L. K.; KERR, R. G. Comparison of two total RNA extraction protocols using the marine gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* and its symbiont *Symbiodinium* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.5, p. 598-603, 2006.

WALSH, G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 3–10, 2003.

WATSON J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKY, J.; ZOLLER, M. Recombinant DNA. Second Edition. Scientific American Books. New York. p. 14, 1992.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. **BioTechniques**, v. 22, p. 474-481, 1997.

ZHUANG, X. Single-Molecule RNA Science. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v.34, p. 399–414, 2005.