

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

ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NA ALGA MARINHA  
VERMELHA *Gracilaria cornea* Maze et Schram

CLÁUDIA CINTHIA SANTOS DE OLIVEIRA

---

Dissertação apresentada 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

1997.1

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)

---

O46a Oliveira, Claudia Cinthia Santos de.  
Atividade hemaglutinante na Alga marinha vermelha Gracilaria cornea Maze et Schram /  
Claudia Cinthia Santos de Oliveira. – 1997.  
63 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro  
de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1997.  
Orientação: Prof. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

1. Algas marinhas - Cultivo. I. Título.

CDD 639.2

---

---

Prof.<sup>a</sup> Norma Maria Barros Benevides. Dr.

ORIENTADORA

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Francisco Hiran Farias Costa. M. Sc.

---

Prof. Dárlío Inácio Alves Teixeira

VISTO:

---

Prof. Pedro de Alcântara Filho. Ph. D.

Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

---

Prof. Luis Pessoa Aragão. M. Sc.

Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

---

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Norma Maria Barros Benevides, orientadora e amiga, por seu apreço e dedicação demonstrados durante minha formação profissional e na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de lectinas de algas marinhas 2042, Stélio Ricardo, Fábio Rabelo, Luiziete, Márjory, Dárlio, Auricélia, Márcia Rúbia, Maria, Sâmya, Lídia, Elisabeth e Alexandre, pelo companheirismo e incentivo constantes.

A todos os bolsistas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca pela amizade demonstrada durante todos esses anos de convivência.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e com muito amor e carinho me apoiaram e estimularam em todos os momentos de minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS -----	ix
LISTA DE FIGURAS -----	x
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES -----	xi
1 - INTRODUÇÃO -----	1
1.1 - Lectinas -----	1
1.1.1 - Considerações Gerais -----	1
1.1.2 - Ocorrência e Localização -----	2
1.1.3 - Características Químicas e Físico-Químicas -----	4
1.1.4 - Papel Fisiológico das Lectinas Vegetais -----	6
1.2 - Lectinas de Algas Marinhas -----	7
1.2.1 - Isolamento e Purificação -----	7
1.2.2 - Propriedades Físico-Químicas -----	8
1.2.3 - Propriedades Biológicas -----	11
2 - OBJETIVOS -----	13
3 - DESCRIÇÃO DO GÊNERO -----	14
4 - MATERIAIS -----	16
4.1 - Algas -----	16
4.2 - Eritrócitos -----	16
4.3 - Reagentes -----	17
5 - MÉTODOS -----	18
5.1 - Preparo da Farinha -----	18
5.2 - Análise Elementar da Alga <i>Gracilaria cornea</i> -----	18
5.2.1 - Determinação de Umidade -----	18
5.2.2 - Determinação de Cinzas -----	18
5.2.3 - Determinação de Nitrogênio Total -----	19
5.2.4 - Determinação de Lipídios Totais -----	20
5.3 - Extração de Proteínas da Alga <i>Gracilaria cornea</i> -----	20

5.3.1 - Extração de Proteínas a Diferentes Valores de pH -----	20
5.3.2 - Preparação do Extrato Total -----	21
5.4 - Determinação de Proteínas -----	21
5.5 - Determinação de Carboidratos -----	23
5.6 - Determinação da Especificidade Sanguínea -----	23
5.7 - Determinação da Atividade Hemaglutinante -----	24
5.8 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante -----	24
5.9 - Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante -----	25
5.10 - Termoestabilidade -----	26
5.11 - Cromatografias -----	26
5.11.1 - Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE- Celulose -----	26
5.11.2 - Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Coluna de Phenyl- Sephrose CL-4B -----	27
5.11.3 - Filtração em Gel em Coluna de Bio Gel P-100 -----	28
5.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ - Mercaptoetanol -----	28
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	30
6.1 - Análise Elementar -----	30
6.2 - Efeito do pH na Extração de Proteínas e na Atividade Hemaglutinante -----	30
6.3 - Determinação da Especificidade Sanguínea -----	33
6.4 - Inibição da Atividade Hemaglutinante -----	33
6.5 - Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante -----	36
6.6 - Termoestabilidade -----	36
6.7 - Cromatografias -----	39
6.7.1 - Cromatografia em Coluna de DEAE-Celulose -----	39
6.7.2 - Cromatografia em Coluna de Phenyl-Sephrose CL-4B -----	39
6.7.3 - Cromatografia em Coluna de Bio Gel P-100 -----	42

## LISTA DE TABELAS

- 01 - Características Gerais das Lectinas de Algas Marinhas ----- 10
- 02 - Composição Mínima da Alga Marinha Vermelha *Gracilaria cornea* com Base no Peso Seco ----- 31
- 03 - Efeito do pH e Diferentes Forças Iônicas na Extração de Proteínas e na Atividade Hemaglutinante da Alga Marinha *G. cornea* ---- 32
- 04 - Atividade Hemaglutinante (UH/ml) do extrato total de *G. cornea* frente a diferentes eritrócitos não tratados e tratados enzimaticamente ----- 34
- 05 - Inibição da Atividade Hemaglutinante Presente no PI-DEAE de *G. cornea* por açúcares simples e glicoproteínas ----- 35
- 06 - Efeito de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM) na atividade hemaglutinante presente no extrato total de *G. cornea* ----- 37

## LISTA DE FIGURAS

- 01 - Exemplar da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* ----- 15
- 02 - Esquema de purificação da lectina presente na alga marinha vermelha *G. cornea* ----- 22
- 03 - Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante presente no extrato total de *G. cornea* ----- --38
- 04 - Cromatografia de troca iônica do extrato total de *G. cornea* em coluna de DEAE-Celulose equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O primeiro pico (PI-DEAE) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII-DEAE) eluído com NaCl 1,0 M 40 -----40
- 05 - Cromatografia de interação hidrofóbica do PI-DEAE de *G. cornea* em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, com sulfato de amônio 1,0 M. O primeiro pico (PI-HIC) foi eluído com o tampão de equilíbrio, o segundo (PII-HIC) foi eluído com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 e o terceiro pico (PIII-HIC) foi eluído com água deionizada ----- 41
- 06 - Cromatografia de filtração em gel do PII-HIC de *G. cornea* em coluna de Bio Gel P-100 equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,02 M, pH 7,5 contendo  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM ----- 43
- 07 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol do PII-HIC de *G. cornea*. 1: marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; lactoalbumina, 14,2 kDa); 2: PII-HIC ----- 44

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BSA: Albumina Sérica Bovina

Con A: Concanavalina A (Lectina de *Canavalia ensiformis*)

Cys: Aminoácido Cisteína

DEAE: Dietil-aminoetil

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

HIC: Cromatografia de Interação Hidrofóbica

kDa: Quilodalton

Met: Aminoácido Metionina

PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

TRIS: Tris (hidroxy methyl) amino ethano

UH: Unidade de Hemaglutinação (inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%)

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Lectinas

### 1.1.1 - Considerações Gerais

Em 1888, HERMANN STILLMARK fez a primeira referência à presença de proteínas em extratos de plantas que eram capazes de aglutinar eritrócitos. Inicialmente, tais proteínas foram denominadas de hemaglutininas vegetais (KOBERT, 1900) e posteriormente, pela sua ocorrência quase que exclusiva em plantas, foram chamadas de fitoaglutininas (LANDSTEINER e RAUBITSCHER, 1910).

O termo lectina (do latim “legere”, escolher) foi proposto por BOYD & SHAPLEIGH (1954) após a descoberta da especificidade destas proteínas vegetais em somente aglutinar células sanguíneas de alguns grupos de indivíduos do sistema ABO, sem afetar células de outros grupos (RENKONNEN, 1948; BOYD & REGUERA, 1949).

Lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos (ou compostos contendo carboidratos) e de aglutinar células e glicoconjugados sem induzir qualquer modificação química nos mesmos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK & HOREJSI, 1983; LIENER *et al.*, 1986).

Esta definição implica que tais proteínas possuem mais de um sítio de ligação para açúcares por molécula e, desta forma, exclui várias classes de proteínas que também interagem com carboidratos, porém através de um único sítio de ligação.

Segundo BARONDES (1988), algumas lectinas possuem outro tipo de sítio, o hidrofóbico, que não é específico para carboidratos. Este e outros fatos colocaram fora de uso o pensamento de que lectinas seriam estritamente proteínas bivalentes que ligavam carboidratos. O autor sugere uma redefinição para o termo lectina, com a finalidade de incluir proteínas com afinidade para carboidratos, porém excluindo-se o grupo das enzimas e dos anti-corpos. O termo hemilectina foi posteriormente proposto para as lectinas monovalentes por CARLINI & GUIMARÃES (1991).

As lectinas de vegetais são definidas como todas as proteínas que possuem ao menos um sítio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

### 1.1.2 - Ocorrência e Localização

As lectinas ocorrem em todas as classes e famílias de organismos, porém não necessariamente em todos os gêneros e espécies. Assim, encontramos lectinas em vegetais, vertebrados, invertebrados, microorganismos e até mesmo em vírus (LIS & SHARON, 1981).

A maior parte das lectinas já estudadas encontra-se nos vegetais, onde foram detectadas em mais de 1000 espécies.

Com relação às plantas superiores, a classe das dicotiledôneas apresenta o maior número de lectinas isoladas e purificadas (SHARON

& LIS, 1990).

São as sementes maduras de leguminosas as maiores fontes de lectinas vegetais, onde estas proteínas se encontram nos cotilédones, principalmente dentro de organelas especiais denominadas de corpos protéicos. Nestas sementes, as lectinas chegam a totalizar até 10% do conteúdo total de proteína (PUSZTAI *et al.*, 1978).

Além de sua localização nas sementes, as lectinas também são detectadas em tubérculos (*Solanum tuberosus*, ALLEN & NEUBERGER, 1973), em caules (*Dolichos biflorus*, TALBOT & ETZLER, 1978), em cascas (*Sambucus nigra*, BROEKAERT *et al.*, 1984), em rizomas (*Aegopodium podagraria*, PEUMANS *et al.*, 1985), em folhas (*Agropyrum repens*, CAMMUE *et al.*, 1985), em bulbos (*Galanthus rivalis*, VAN DAMME *et al.*, 1987) e em frutos (*Musa paradisiaca*, KOSHTE *et al.*, 1990).

A ocorrência de lectinas em extratos de algas marinhas foi, pela primeira vez, relatada por BOYD *et al.* (1966). Neste relato, das 24 espécies de algas marinhas tropicais testadas contra eritrócitos humanos, seis algas pardas e uma alga verde-azul aglutinaram eritrócitos dos grupos A e O, uma alga verde e duas algas pardas aglutinaram inespecificamente eritrócitos de todos os grupos sanguíneos testados, uma única alga vermelha aglutinou eritrócitos humanos do grupo A e as demais espécies não apresentaram atividade hemaglutinante.

Nas algas marinhas, as lectinas vêm sendo encontradas nas classes *Rhodophyceae*, *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae* e

*Cyanophyceae*. Entretanto, é entre as algas marinhas vermelhas que se tem o maior número de trabalhos publicados e lectinas purificadas.

Em vertebrados, distinguem-se duas categorias de lectinas, que são as lectinas solúveis e as lectinas de membrana (LIENER *et al.*, 1986). As primeiras lectinas de vertebrados isoladas foram do órgão elétrico da enguia *Electrophorus electricus* (TEICHBERG *et al.*, 1975) e do coração e pulmão de bezerro (De WAARD *et al.*, 1976).

Em invertebrados, lectinas têm sido encontradas praticamente em todas as classes e subclasses estudadas, tais como: moluscos (HAMMARSTROM, 1972), tunicados e ciclóstomos (VASTA & MARCHALONIS, 1983), caranguejos (RAVINDRANATH & COOPER, 1984) e esponjas (BRETTING *et al.*, 1990). Sendo estas localizadas na hemolinfa e órgãos sexuais desses animais.

Lectinas ocorrem também em bactérias, protozoários e vírus, estando envolvidas nos processos de adesão celular (SHARON & LIS, 1989).

### 1.1.3 - Características Químicas e Físico-Químicas

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas que apresentam propriedades moleculares diversas.

São, em geral, glicoproteínas, podendo conterem em sua constituição até 50% de carboidratos, como é o caso da lectina da batata *Solanum tuberosum* (ALLEN *et al.*, 1978).

O peso molecular das lectinas pode variar de 4,2 kDa (isolectina

da alga marinha vermelha *Hypnea japonica*) até 400 kDa (lectina do caranguejo *Limulus polyphemus*).

Geralmente possuem de duas a quatro subunidades, mas este número pode chegar a valores muito maiores, como no caso da lectina de *Limulus polyphemus* que possui vinte subunidades (SHARON & LIS, 1989<sup>b</sup>).

A maioria das lectinas exige a presença de íons metálicos divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ ) para desenvolver suas atividades. De acordo com DOYLE (1976), estes íons são responsáveis pela manutenção da estabilidade estrutural das moléculas, protegendo-as contra a inativação pelo calor. BLUMBERG & TAL (1976) citam estes íons como os responsáveis pela maior resistência à hidrólise enzimática.

Para se detectar a presença de lectinas, utiliza-se geralmente o teste de aglutinação (habilidade destas proteínas para aglutinar eritrócitos e outras células ou precipitar glicoconjugados). A atividade hemaglutinante é facilitada quando os eritrócitos são tratados com enzimas proteolíticas. O objetivo destas enzimas é expor os receptores glicídicos presentes nas membranas dos eritrócitos, facilitando a hemaglutinação por parte da lectina.

A especificidade por carboidratos é uma das características essenciais para que uma proteína possa ser chamada de lectina. Sua especificidade é determinada através de ensaios de inibição por haptenos, onde diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos são avaliados com relação à capacidade de inibir a atividade hemaglutinante.

MAKELA (1957) dividiu os monossacarídeos inibidores de lectinas em quatro grupos, baseando-se na configuração relativa dos átomos de carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> constituintes do anel piranosídico. Assim, ao grupo I pertencem as lectinas específicas por L - fucose; ao grupo II lectinas que se ligam especificamente à D - galactose e N - acetil - galactosamina; ao grupo III aquelas que são específicas por D - glicose e D-manose; e ao grupo IV lectinas capazes de se ligar à D-idose, D-gulose, L-glicose e L-xilose. Porém, até o presente momento, nenhuma lectina já isolada foi inibida por açúcares pertencentes ao grupo IV.

#### 1.1.4 - Papel Fisiológico das Lectinas Vegetais

As lectinas apresentam atividades biológicas bastante peculiares, tais como aglutinação de células, mitogenicidade, imunossupressão, efeito insulinomimético, toxicidade e defesa contra microorganismos e predadores (PUSZTAI, 1991).

A capacidade das lectinas de interagir especificamente com células, justifica o emprego destas para determinação dos grupos sanguíneos humanos (ABO) e no estudo de receptores químicos estruturais presentes nas hemácias destes grupos.

Lectinas mitogênicas podem ser utilizadas em diagnósticos de imunodeficiências congênitas ou adquiridas e para monitorar o efeito de drogas imunossupressivas e imunoterapêuticas (LIS & SHARON,

1981). Além destas aplicações, também podem ser usadas para cariotipagem, determinação de sexo e detecção de cromossomos defeituosos devido à fácil visualização destes nas células estimuladas (SHARON & LIS, 1989).

A ação insulinomimética tem sido demonstrada em algumas lectinas, tais como concanavalina A (Con A), a aglutinina de germe de trigo (WGA) e a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Nos estudos realizados, estas lectinas foram capazes de ativar o transporte e a oxidação da glicose (PUSZTAI, 1991).

O papel fisiológico das lectinas vegetais ainda não está totalmente esclarecido, o que gera controvérsias entre os pesquisadores. Atualmente, os dois principais papéis fisiológicos atribuídos às lectinas de vegetais superiores são: 1 - mediação da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas; e 2 - proteção de plantas contra patógenos (SHARON & LIS, 1989; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

## 1.2 - Lectinas de Algas Marinhas

### 1.2.1 - Isolamento e Purificação

A primeira lectina de alga marinha isolada foi a da alga marinha vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977), sendo que até o presente foram isoladas cerca de 30 lectinas (incluindo isolectinas) desses vegetais (SAMPAIO *et al.*, 1993).

A maioria das lectinas de algas marinhas tem sido isolada através da utilização de métodos convencionais de purificação de proteínas, como é o caso das lectinas das algas vermelhas *Palmarias palmata* (ROGERS & FISH, 1991), *Ptilota serrata* (ROGERS *et al.*, 1990) e *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977).

Entretanto, há uma crescente tendência no uso das cromatografias de afinidade para a purificação de lectinas, haja visto a maior praticidade por estas dispensada e ao fato destas apresentarem uma maior segurança na pureza do material.

MORIET *et al.* (1987), OKAMOTO *et al.* (1990), FARIAS (1995) e BENEVIDES *et al.* (1996) utilizaram uma coluna contendo manana de levedura em um procedimento cromatográfico de afinidade para o isolamento de lectinas presentes nas algas vermelhas *Carpopeltis flabelata*, *Gracilaria bursa-pastoris*, *Meristiela echinocarpa* e *Solieria filiformis*, respectivamente.

De maneira semelhante, foram utilizadas técnicas de afinidade no isolamento das lectinas das algas verdes *Codium adherens*, *C. effusum*, *C. plarylobium* e *C. capitatum* (ROGERS *et al.*, 1994), contudo o suporte utilizado continha N-acetil-galactosamina como ligante.

### 1.2.2 - Propriedades Físico-Químicas

As lectinas de algas marinhas geralmente apresentam baixo peso molecular, variando de 4,2 kDa (HORI *et al.*, 1986<sup>b</sup>) a 43 kDa

(KAMIYA *et al.*, 1982). São de natureza glicoprotéica; constituem-se de apenas uma subunidade; possuem estrutura molecular geralmente monomérica; apresentam especificidade por glicoproteínas; não mostram dependência por cátions divalentes; possuem ponto isoelétrico (pI) em faixa ácida variando entre 3,8 a 6,9; e apresentam, em sua composição, aminoácidos sulfurados (Cys e/ou Met).

FARIAS (1995), trabalhando com a alga marinha vermelha *Meristiela echinocarpa*, detectou a presença de 5 isolectinas com pontos isoelétricos variando na faixa ácida de 4,75 a 6,25.

COSTA (1995) obteve resultados semelhantes com a alga vermelha *Amansia multifida*, que também apresentou 5 isolectinas de pI ácido variando de 5,25 a 6,25.

De acordo com ROGERS & HORI (1993), as lectinas de algas marinhas vermelhas podem ser distribuídas em três tipos: 1 - moléculas de baixo peso molecular que reconhecem glicoproteínas, mas não monossacarídeos e não requerem cátions divalentes; 2 - moléculas que se ligam a monossacarídeos e derivados e que também não possuem dependência por cátions divalentes; e 3 - grandes moléculas (PM > 64 kDa) que se ligam a monossacarídeos na presença de cátions divalentes. Segundo estes autores, somente as lectinas de algas verdes, capazes de formar oligômeros, têm a capacidade de interagir com monossacarídeos.

As características físico-químicas da maioria das lectinas de algas marinhas encontram-se resumidas na TABELA 01.

TABELA 01 - Características Gerais das Lectinas de Algas Marinhas

Característica Físico-Química	Lectinas de Algas Marinhas
Natureza	Glicoprotéica
Peso Molecular	Baixo (4,2 - 43 kDa)
Número de Subunidades	01
Estrutura Molecular	Geralmente Monoméricas
Especificidade	Glicoproteínas
Cátions Divalentes	Não Dependem
Ponto Isoelétrico	Faixa Ácida (3,8 - 6,9)
Aminoácidos Sulfurados	Presença (Cys e/ou Met)

### 1.2.3 - Propriedades Biológicas

Os trabalhos de pesquisa, a nível mundial, utilizando lectinas purificadas de algas marinhas em aplicações biológicas ainda estão em fase inicial, e muitos dos resultados e efeitos obtidos até o presente foram observados empregando-se extratos brutos destes vegetais. Em geral, as lectinas de algas marinhas apresentam massas moleculares menores do que as de vegetais superiores. Esta característica as torna mais adequadas para serem usadas como mísseis biológicos, quando comparadas com as lectinas de vegetais superiores, devido ao fato dessas pequenas moléculas serem menos susceptíveis à detecção pelo sistema imunológico humano (ROGERS & HORI, 1993).

Portanto, após procedimentos de purificação, as lectinas de algas marinhas podem ser utilizadas com eficiência na identificação de grupos sanguíneos (tipagem sanguínea), no diagnóstico e identificação de microorganismos, na estimulação da mitogenicidade de linfócitos, na imunossupressão (ensaios não mitogênicos) e no combate a pragas (ação inseticida).

O emprego da lectina como reagente comercial na imunohematologia e clínica médica (tipagem sanguínea e bacteriana) é mais viável que o dos reagentes imunes usados rotineiramente. Isto se deve ao fato dos procedimentos práticos utilizados na obtenção do reagente imune serem de custos mais elevados. Além disso, a obtenção do reagente imune é mais demorada em consequência do tempo gasto com a imunização de animais.

A aglutinina de *Codium fragile* distingue eritrócitos humanos do tipo A e subgrupos tratados com papaína. A aglutinina de *Ptilota plumosa* aglutina especificamente eritrócitos do tipo B, não aglutinando eritrócitos dos tipos A e O. A aglutinina de *Ulva lactuca* aglutina preferencialmente eritrócitos do grupo O, distinguindo também os grupos A<sub>2</sub> e A<sub>2</sub>B dos grupos A<sub>1</sub> e A<sub>1</sub>B por intensidade de aglutinação (ROGERS *et al.*, 1977; ROGERS *et al.*, 1984; GILBOAGABER *et al.*, 1988).

Na estimulação linfocitária, a lectina tem uma larga aplicação, principalmente no acesso e monitoramento de defeitos imunológicos congênitos.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *Carpopeltis flabellata*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Solieria robusta* foram capazes de estimular a mitogenicidade em linfócitos de camundongos, em concentrações que variavam na faixa de 5 a 12 µgP/ml (HORI *et al.*, 1987; HORI *et al.*, 1988<sup>b</sup>; OKAMOTO *et al.*, 1990).

A característica imunossupressora pode ter aplicação em transplantes clínicos ou em tratamentos de pacientes com doenças autoimunes, o que possibilita uma área de pesquisa promissora (KILPATRICK *et al.*, 1985).

A utilização de algas marinhas como agrotóxicos naturais representa uma área de interesse e de grande potencial porque os pesticidas sintéticos, usados atualmente, são altamente tóxicos e persistentes no meio ambiente.

### 3 - DESCRIÇÃO DO GÊNERO

O gênero *Gracilaria* possui talo erecto crescendo em tufos ou isoladamente, fixo ao substrato por nítido apressório achatado ou cilíndrico ramificado, com margem dissecadas por numerosos ramos curtos ou não, com ramificações predominantemente em um só plano. Organização multiaxial. Carpósporos numerosos originados da maioria das células (FIGURA 01).

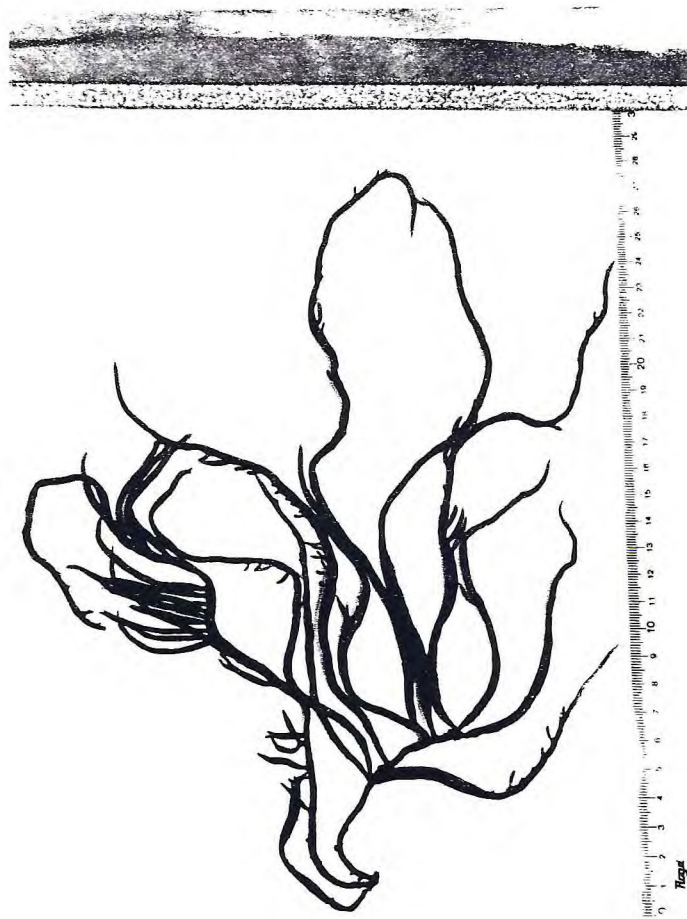


FIGURA 01 - Exemplar da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*.

## 4 - MATERIAIS

### 4.1 - Algas

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foi coletada em ocasião de maré de sizígia na praia do Farol, Fortaleza - Ce, onde são encontradas presas às rochas do meso-litoral inferior. Após a coleta, as algas foram transportadas para o laboratório, sendo então limpas, lavadas, armazenadas em sacos plásticos e estocadas a -20°C para posterior utilização.

### 4.2 - Eritrócitos

Eritrócitos de galinha e tejo foram obtidos de animais sadios, criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Eritrócitos de coelho foram obtidos de animais mantidos em cativeiro no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Eritrócitos humanos do sistema ABO foram obtidos de doadores sadios do Centro de Hemoterapia do Ceará da Universidade Federal do Ceará (HEMOCE).

### 4.3 - Reagentes

As enzimas proteolíticas foram obtidas de Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

DEAE-Celulose, Phenyl-Sepharose, Beta-Mercaptoetanol e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foram obtidos de Merck, Darmstadt, Alemanha.

Marcadores para eletroforese, kit de proteínas com peso molecular de 14 - 70 kDa, foram obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 5 - MÉTODOS

### 5.1 - Preparo da Farinha

Os exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, após descongelamento e secagem em papel de filtro, foram triturados em liquidificador na presença de nitrogênio líquido. A farinha obtida foi utilizada na preparação dos extratos.

### 5.2 - Análise Elementar da Alga *Gracilaria cornea*

#### 5.2.1 - Determinação de Umidade

Para determinação do teor de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo aproximadamente 2,0g de alga fresca, foram colocados em estufa a 100°C por um período de 24 horas. Em seguida, os pesa-filtros foram transferidos para um dessecador até o equilíbrio com a temperatura ambiente e pesados. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

#### 5.2.2 - Determinação de Cinzas

Para determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados contendo aproximadamente 2,0g de alga desidratada (obtida a partir do procedimento anterior) foram colocados em forno mufla a 600°C por um período de 4 horas e, em seguida,

mantidos em dessecador para que atingissem a temperatura ambiente, quando então foram pesados. O teor de cinzas foi determinado por diferença entre os pesos inicial e final das amostras e expresso em percentagem.

### 5.2.3 - Determinação de Nitrogênio Total

O teor de nitrogênio total presente na farinha seca de *Gracilaria cornea* foi obtido pelo método de BAETHGEN & ALLEN (1989).

A farinha de *Gracilaria cornea* (100 mg) foi mineralizada na presença de 1,1g de catalisador ( $\text{KH}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Se) na proporção de 100 : 10 : 1 (p/p/p) e 1,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Após o ponto de viragem (cor verde), o material permaneceu por mais 30 minutos no mineralizador, depois desse tempo foi acrescentada ao obtido água destilada até completar o volume de 50 ml. Para a segunda etapa do experimento, foi usada uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra, adicionada de 0,9 ml de diluente, 5,5 ml de tampão contendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, tartarato de sódio e potássio a 5% e NaOH a 5,4%, 4 ml de solução salicilato de sódio a 6%. Após a incubação por 15 horas em banho-maria a 37°C, as medidas de absorbância foram feitas com comprimento de onda de 650 nm, utilizando-se espectrofotômetro Micronal modelo B 343 II.

O nitrogênio total (NI) da amostra foi estimado com relação a uma curva padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta (Pb) foi calculado pela fórmula  $\text{Pb} = \text{Nt} \times 6,25$ .

#### 5.2.4 - Determinação de Lipídios Totais

O teor de lipídios totais foi determinado segundo a técnica descrita por TRIEBOLD (1946), utilizando-se n-hexana no lugar do éter.

A extração foi realizada em aparelho de Soxhlet, no qual foram colocados cartuchos de papel de filtro contendo 1,0g de alga desidratada, pelo período de 4 horas. Terminada a extração, o solvente foi evaporado em banho-maria a uma temperatura de 70°C, e em seguida submetido a pesagem do resíduo. O percentual de lipídios totais foi calculado através da relação entre o peso do lipídio extraído e o peso inicial da amostra.

#### 5.3 - Extração de Proteínas da Alga *Gracilaria cornea*

##### 5.3.1 - Extração de Proteínas a Diferentes Valores de pH

Com a finalidade de se determinar o melhor meio de extração das proteínas e se obter uma melhor concentração de carboidratos, as algas trituradas com nitrogênio líquido foram submetidas a extrações com soluções salinas nas concentrações de 0,15 M e 0,5 M e a extrações com soluções tampões em diferentes pHs (3 a 10) com e sem NaCl 0,15 M na proporção de 1:3 (p/v; alga:tampão). Os homogenatos foram filtrados de imediato em tecido de nylon e centrifugados a 9200 x g por 30 minutos a 4°C. Aliquotas dos sobrenadantes foram

utilizadas para a determinação da atividade hemaglutinante, dosagem de proteína e de carboidrato.

### 5.3.2 - Preparação do Extrato Total

De acordo com os resultados obtidos no item 5.3.1, a farinha da alga *Gracilaria cornea* foi submetida a extração com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 na proporção de 1:3 (p/v; alga:tampão). Após agitação constante por 4 horas, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon e em seguida centrifugado a 9200 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato total), dialisado contra água destilada e concentrado por liofilização parcial, foi utilizado nas etapas seguintes de purificação e caracterização parcial. O esquema de purificação da lectina presente na alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* está representado na FIGURA 02.

### 5.4 - Determinação de Proteínas

As dosagens de proteínas nas diversas etapas de purificação da lectina de *Gracilaria cornea* foram feitas segundo o método de FOLIN (LOWRY *et al.*, 1951). A 1 ml da amostra previamente diluída foram adicionados 5 ml do reagente FOLIN C e, após 10 minutos de repouso, adicionado 0,5 ml do reagente FOLIN D. Após repouso de 30 minutos, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva

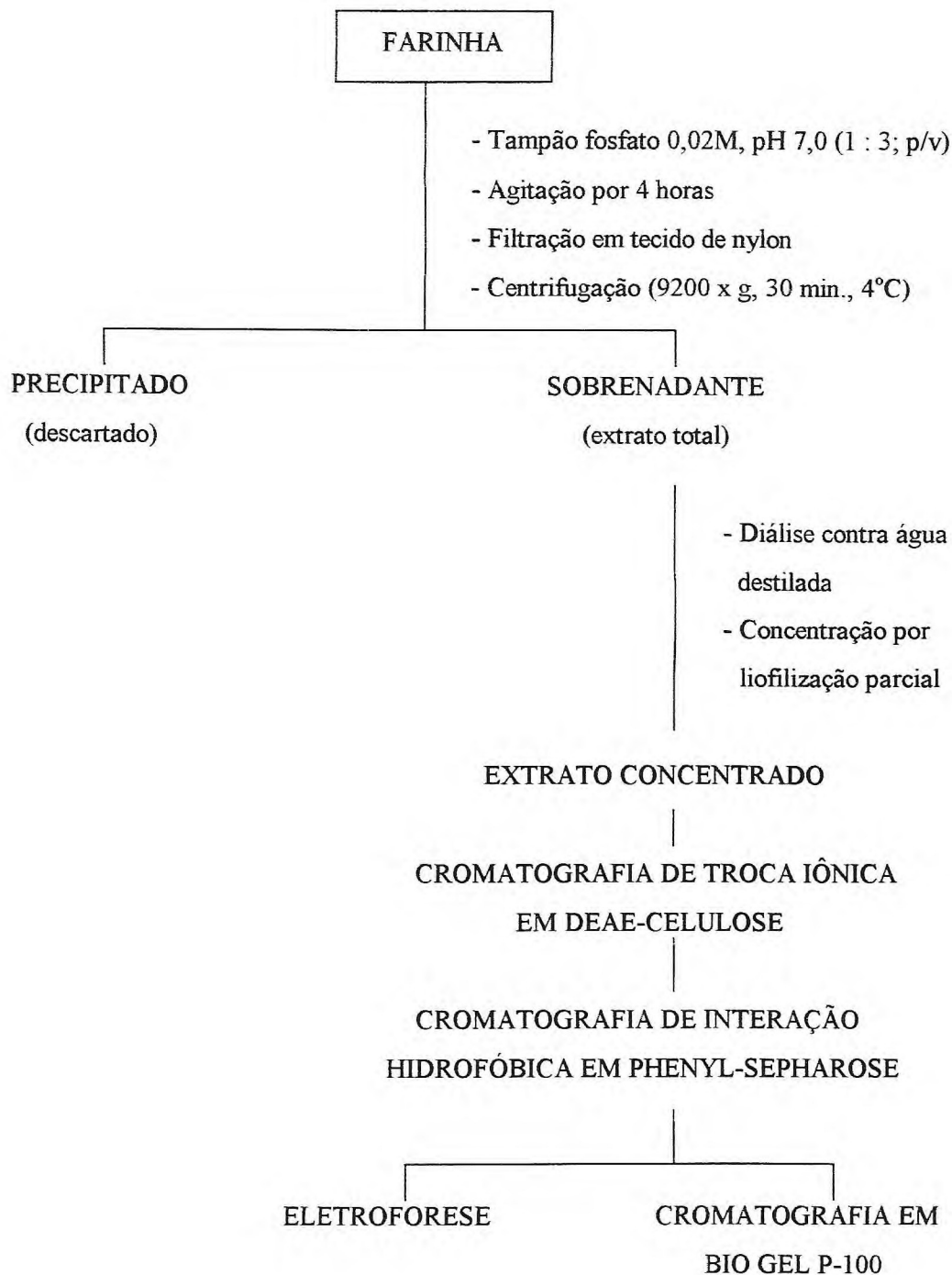


FIGURA 02 - Esquema de purificação da lectina presente na alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*.

padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA). O teor de proteína nos eluatos das cromatografias foi determinado pela medida de absorvância a 280 nm.

#### 5.5 - Determinação de Carboidratos

O teor de carboidratos nas diversas etapas de purificação da lectina de *Gracilaria cornea* foi determinado utilizando-se a técnica descrita por DUBOIS *et al.* (1956). A 1 ml da amostra previamente diluída foram adicionados 1 ml de fenol a 5% e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, e após agitação, a mistura permaneceu em repouso por 15 minutos para então ser feita a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 490 nm. A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com glicose.

#### 5.6 - Determinação da Especificidade Sanguínea

Com o objetivo de se determinar a especificidade sanguínea da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, foram feitos ensaios de hemaglutinação utilizando-se eritrócitos de diferentes animais (coelho, tejo e galinha) e humanos do sistema ABO, nativos e tratados com as enzimas tripsina e bromelaína de acordo com a metodologia descrita por AINOUZ *et al.* (1992).

### 5.7 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada através do método das diluições seriadas em tubos de ensaio. Inicialmente, em cada tubo foram adicionados 200  $\mu$ l de NaCl 0,15 M. Em seguida foram adicionados ao primeiro tubo 200  $\mu$ l da amostra, fazendo-se então uma série de diluições duplas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.). A cada diluição foram adicionados 200  $\mu$ l de uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de galinha a 2%. Os tubos, após leve agitação, foram incubados a 37°C por 30 minutos e em seguida deixados em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). O material foi então centrifugado a 2000 x g por 30 segundos e a hemaglutinação observada macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/ml).

### 5.8 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Em ensaios preliminares de inibição da atividade hemaglutinante, alíquotas de 200  $\mu$ l do PI obtido da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, encerrando 16 UH/ml, foram pipetadas em tubos de ensaio contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.) a partir de soluções estoques de 16 açúcares simples na concentração de 0,1 M. Os tubos permaneceram 60 minutos à temperatura ambiente e após este período foram adicionados 400  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos tripsinizados de galinha a 2%, deixados em

repouso por 60 minutos à temperatura ambiente, e finalmente centrifugados a 2000 x g por 30 minutos.

Para se determinar a inibição da atividade hemaglutinante por glicoproteínas, foi utilizada uma diluição do PI obtido da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose contendo 16 UH/ml. A concentração inicial das glicoproteínas foi de 5 mg/ml e o procedimento experimental foi exatamente idêntico ao descrito acima para os açúcares simples. A especificidade da lectina foi determinada observando-se os açúcares ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar inibição.

#### 5.9 - Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante

Amostra do extrato total de *Gracilaria cornea* foi submetida à desmetalização através de diálise contra solução de EDTA 5 mM por 18 horas e sob agitação a 4°C. Alíquotas do extrato dialisado foram utilizadas em ensaios de hemaglutinação, na ausência e presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM). Ensaio utilizando o extrato não dialisado contra EDTA e/ou soluções de NaCl 0,15 M com EDTA 5 mM e com  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  5 mM foram usados.

## 5.10 - Termoestabilidade

A estabilidade térmica da atividade hemaglutinante presente no extrato total de *Gracilaria cornea* foi determinada pela incubação em banho-maria de alíquotas do extrato nas temperaturas de 40, 50 e 60°C nos intervalos de 10, 20 e 30 minutos. Após cada período de incubação, as amostras foram imediatamente transferidas para um banho de gelo e centrifugadas, sendo então realizados os ensaios de atividade hemaglutinante.

## 5.11 - Cromatografias

### 5.11.1 - Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

O extrato concentrado, obtido por liofilização parcial, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose. A coluna medindo 25,0 x 1,1 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O extrato concentrado foi aplicado na coluna e a eluição foi feita com o tampão de equilíbrio. Após a completa eluição do pico não retido na coluna (PI), um segundo pico (PII) foi eluído com NaCl 1 M. Durante a cromatografia foi mantido um fluxo constante de 60 ml/hora; coletadas frações de 3 ml e as absorvâncias determinadas a 280 nm (espectrofotômetro Varian 634). Os picos foram dialisados contra água destilada, concentrados por liofilização parcial e estocados

para posterior utilização.

Dando prosseguimento ao estudo de purificação da hemaglutinina, a etapa de cromatografia de troca iônica em coluna foi substituída por um “batch,” em virtude da alta concentração de carboidratos presentes no extrato total de *G. cornea*, ocasionando o empacotamento da coluna. Neste caso, a amostra e a resina são misturadas (nas mesmas condições descritas acima) em um bequer e mantidas sob agitação por uma hora. Após filtração da mistura em um funil de placa porosa, a resina é lavada em tampão de equilíbrio e a seguir eluída, em etapa única, com tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 contendo 1,0 M de NaCl.

#### 5.11.2 - Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B

A fração PI obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. A coluna medindo 11,0 x 1,1 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0 M. A amostra concentrada por liofilização parcial e previamente dialisada contra o tampão de equilíbrio da coluna, após sua aplicação, foi diluída em três picos. Após a completa eluição do pico não retido no gel (PI), foi aplicado à coluna tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 para a eluição de PII (primeiro pico retido) e a

eluição de PIII (segundo pico retido) foi obtida por lavagem da coluna com água deionizada. Durante a cromatografia foi mantido um fluxo constante de 30 ml/hora, coletadas frações de 3 ml e as absorbâncias determinadas a 280 nm (espectrofotômetro Varian 634). Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada, concentrados por liofilização parcial e estocados para posterior utilização.

### 5.11.3 - Filtração em Gel em Coluna de Bio Gel P-100

A fração PII, obtida da cromatografia de interação hidrofóbica, encerrando 11,2 mgP/ml da solução de equilíbrio, foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna de Bio Gel P-100. A coluna foi equilibrada com tampão TRIS-HCl 20mM, pH 7,5 contendo  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  5 mM e monitorada a 280 nm. A eluição foi feita a um fluxo de 11 ml/h e coletadas frações de 2,2 ml/tubo em um coletor de frações FRAC 100 (Pharmacia-LKB). Os picos obtidos nesta cromatografia foram submetidos à ensaios de atividade hemaglutinante.

### 5.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

Os experimentos de eletroforese foram feitos segundo o método descrito por LAEMMLI (1970) adaptado para o uso em placas de vidro medindo 17,5 x 16,5 cm. Para a montagem das placas, foi usado um gel de aplicação contendo 3,95% de poliacrilamida em tampão

TRIS-HCl 1,0 M, pH 8,8. A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão TRIS-HCl 1,0 M, pH 8,8 contendo glicerol, SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de bromofenol. Em seguida, a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos. Aliquotas de 30  $\mu$ l foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de aplicação. Após corrida, o coramento das proteínas foi feito utilizando-se solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,005% em metanol, ácido acético e água (4: 0,7: 5,3, v/v/v) por um período de 15 horas. O descoramento foi realizado em uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5 : 1 : 8,0; v/v/v). Proteínas de massas moleculares aparentes conhecidas (Lactoalbumina, 14,2 kDa; Inibidor de Tripsina, 20,1 kDa; Tripsinogênio, 24,0 kDa; Anidrase carbônica, 29,0 kDa; Glicose fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; Ovalbumina, 45,0 kDa e BSA, 66,0 kDa) foram usadas como marcadores de peso molecular.

## 6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 - Análise Elementar

A TABELA 02 mostra os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos totais da alga *G. cornea*. Através dos dados obtidos, verificam-se elevados teores de umidade (89,3%) e de carboidratos (88,33%) e baixos percentuais de proteínas (6,58%), lipídios (1,55%) e cinzas (3,54%). O alto teor obtido para umidade é uma característica comum de algas marinhas.

### 6.2 - Efeito do pH na Extração de Proteínas e na Atividade Hemaglutinante

A alga *G. cornea*, quando submetida a diferentes meios de extração, com pH e forças iônicas variáveis, apresentou os resultados mostrados na TABELA 03. De acordo com os dados obtidos, pode-se observar que as proteínas solúveis, assim como os carboidratos, foram melhor extraídos na faixa de pH alcalino. A atividade específica (90,3) foi máxima a pH 10,0 em presença de NaCl 0,15 M. No entanto, nesse valor de pH o teor de carboidratos solúveis foi ca. 2 vezes maior do que o obtido na extração com tampão fosfato a pH 7,0 na ausência de NaCl. Por esta razão, a extração a pH 7,0 sem NaCl foi escolhida para utilização nas etapas seguintes de purificação da lectina.

TABELA 02 - Composição Mínima da Alga Marinha Vermelha  
*Gracilaria cornea* com Base no Peso Seco.

Constituinte	Teor da Amostra (%)
Umidade	89,13
Proteína bruta*	6,58
Cinzas	3,54
Lipídios	1,55
Carboidratos**	88,33

\* Nitrogênio total x 6,25

\*\* Obtido por diferença

TABELA 03 - Efeito do pH e Diferentes Forças Iônicas na Extração de Proteínas e na Atividade Hemaglutinante da Alga Marinha *Gracilaria cornea*.

Extrato (pH)	Proteína (mg)	Atividade Hemaglutinante		Carboidrato (mg)
		(UH*)	(UH/mgP)	
3,0	4,0	-	-	11,2
5,0	4,4	81,6	18,5	43,9
7,0	4,5	228,0	50,7	22,8
8,0	4,2	265,6	63,2	30,1
10,0	5,8	368,0	63,4	36,2
7,0 + NaCl 0,15 M	7,5	368,0	49,0	56,4
8,0 + NaCl 0,15 M	5,0	361,6	72,3	60,8
10,0 + NaCl 0,15 M	7,3	659,2	90,3	48,6
NaCl 0,15 M	5,4	97,6	18,0	22,2
NaCl 0,15 M	6,8	174,4	25,6	42,5

\* UH - Unidade de Hemaglutinação

(-) Não detectado

### 6.3 - Determinação da Especificidade Sanguínea

A atividade hemaglutinante do extrato total de *G. cornea* contra diferentes eritrócitos de animais e humanos do sistema ABO, não tratados e tratados enzimaticamente, é mostrada na TABELA 04. O extrato não aglutinou os eritrócitos de tejo, coelho e humanos do sistema ABO. Entretanto, apresentou especificidade por eritrócitos de galinha tratados enzimaticamente com tripsina e bromelaína. Sendo, portanto, os eritrócitos de galinha, tratados enzimaticamente com tripsina, utilizados para os procedimentos posteriores.

### 6.4 - Inibição da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante presente na fração PI da DEAE do extrato total concentrado por liofilização (16 UH/ml) não foi inibida por nenhum dos açúcares simples testados na concentração inicial de 25 mM, fato comum entre muitas lectinas isoladas de algas marinhas (SHIOMI *et al.*, 1979; SHIOMI *et al.*, 1981; KAMIYA *et al.*, 1980; ROGERS & TOPLISS, 1983). No entanto, com as glicoproteínas testadas, sofreu inibição somente para mucina na concentração de 625 µg/ml (TABELA 05).

TABELA 04 - Atividade Hemaglutinante (UH/ml) do extrato total de *Gracilaria cornea* frente a diferentes eritrócitos não tratados e tratados enzimaticamente.

	Galinha	Coelho	Tejo	A	B	O	AB
Não tratado	-	-	-	-	-	-	-
Tripsina	32	-	-	-	-	-	-
Bromelaína	32	-	-	-	-	-	-

(-) Atividade não detectada

TABELA 05 - Inibição da Atividade Hemaglutinante Presente no PI-DEAE de *Gracilaria cornea* por açúcares simples e glicoproteínas.

Açúcar/Glicoproteína	Concentração
<b>Açúcares simples</b>	<b>C.M.A.(mM)</b>
D(+) Galactose	-
D(-) Arabinose	-
L(+) Arabinose	-
D(+) Rafinose	-
D(-) Frutose	-
D(+) Xilose	-
L(+) Ramnose	-
D(+) Manose	-
D(+) Glucosamina	-
D(+) Celobiose	-
D(+) Melibiose	-
D(+) Lactose	-
N-Acetil-D-Galactosamina	-
N-Acetil-D-Glucosamina	-
Fucose	-
Salicina	-
<b>Glicoproteínas</b>	<b>C.M.G.(µg/ml)</b>
Mucina	625,0
Avidina	-
Fetúina	-
Egg white	-

C.M.A. - Concentração mínima do açúcar capaz de inibir a atividade hemaglutinante

C.M.G. - Concentração mínima da glicoproteína capaz de inibir a atividade hemaglutinante

(-) Ausência de inibição em todas as concentrações testadas

### 6.5 - Efeito de Cátions Divalentes na Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante presente no extrato total da alga marinha *G. cornea* não se mostrou dependente de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  5 mM), mantendo-se inalterada quando o extrato foi dialisado contra EDTA 5 mM (TABELA 06).

De conformidade com dados existentes na literatura, a atividade hemaglutinante presente em algas vermelhas não requer cátions divalentes para exercer a aglutinação de células. Como observado por ROGERS & BLUNDEN (1980), dentre as algas vermelhas analisadas, somente as lectinas do gênero *Ptilota* apresentaram dependência. Segundo ROGERS & HORI (1993), lectinas de algas marinhas, que interagem com glicoproteínas sem reconhecerem monossacarídeos, não dependem de cátions divalentes.

### 6.6 - Termoestabilidade

A atividade hemaglutinante presente no extrato total de *G. cornea* apresentou-se estável ao aquecimento por 30 minutos às temperaturas de 40 e 50°C, tornando-se inativa a 60°C em 10 minutos (FIGURA 03).

Algumas lectinas de algas marinhas podem ser consideradas termolábeis, como as de *Agardhiella tenera* (SHIOMI *et al.*, 1979), *Cystoclonium purpureum* (KAMIYA *et al.*, 1980) e *Carpopeltis flabellata* (HORI *et al.*, 1987), com perda total ou quase total de

TABELA 06 - Efeito de cátions divalente ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM) na atividade hemaglutinante presente no extrato total de *Gracilaria cornea*.

FRAÇÃO	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE*
Extrato Total	100
Extrato Total com $\text{Ca}^{++}$ e $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM	100
Controle, EDTA	-
Controle, cátions divalentes	-

\* A atividade hemaglutinante presente no extrato total foi considerada 100%

(-) Ausência de atividade hemaglutinante

atividade quando aquecidas a temperaturas inferiores ou iguais a 60°C.

## 6.7 - Cromatografias

### 6.7.1 - Cromatografia em Coluna de DEAE-Celulose

Quando o extrato pigmentado e concentrado por liofilização, de *G. cornea* foi submetido à cromatografia em coluna de DEAE-Celulose apresentou dois picos (FIGURA 04). O primeiro (PI-DEAE), não retido e livre de pigmento, encerrou toda a atividade hemaglutinante. O segundo (PII-DEAE), retido e eluído com NaCl 1,0 M, apresentou-se bastante pigmentado e livre de atividade hemaglutinante.

### 6.7.2 - Cromatografia em Coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B

O primeiro pico (PI-DEAE), obtido da cromatografia em coluna de DEAE-Celulose, quando submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B, resultou na eluição de três picos (FIGURA 05). O primeiro pico eluído não interagiu com a coluna e mostrou-se ausente de atividade hemaglutinante. O segundo pico interagiu com a coluna, sendo diluído com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 (PII-HIC), e encerrou toda a atividade hemaglutinante. O terceiro pico, livre de atividade hemaglutinante, foi obtido pela eluição com água deionizada (PIII-HIC).

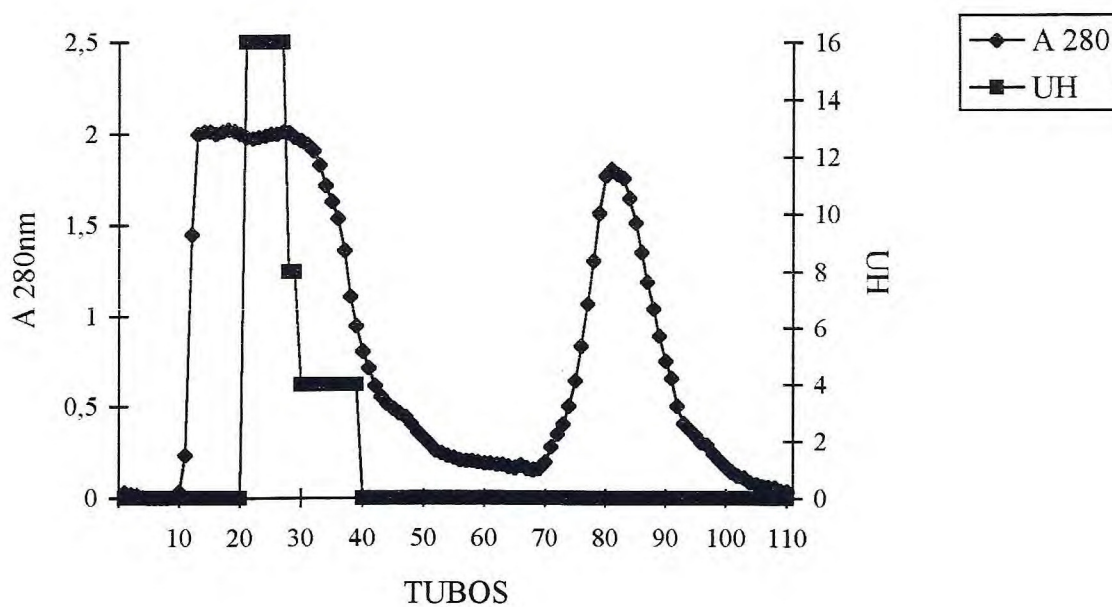


FIGURA 04 - Cromatografia de troca iônica do extrato total de *Gracilaria cornea* em coluna de DEAE-Celulose equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O primeiro pico (PI-DEAE) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII-DEAE) eluído com NaCl 1,0 M.

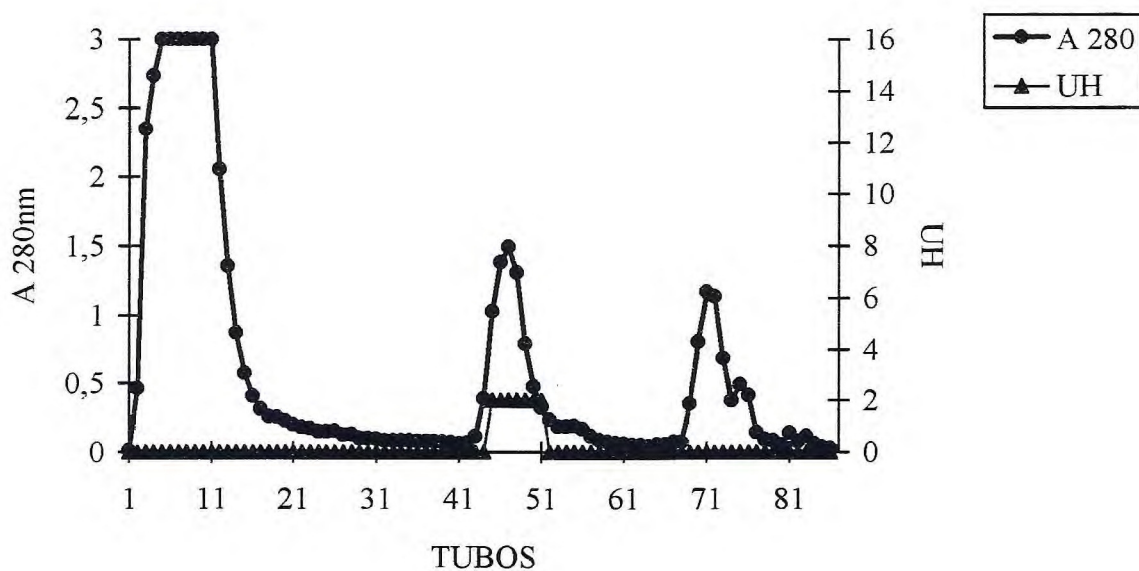


FIGURA 05 - Cromatografia de interação hidrofóbica do PI-DEAE de *Gracilaria cornea* em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, com sulfato de amônio 1,0 M. O primeiro pico (PI-HIC) foi eluído com o tampão de equilíbrio, o segundo (PII-HIC) foi eluído com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 e o terceiro pico (PIII-HIC) foi eluído com água deionizada.

### 6.7.3 - Cromatografia em Coluna de Bio Gel P-100

O pico obtido da cromatografia de interação hidrofóbica (PII-HIC) de *G. cornea* foi submetido à cromatografia de filtração em gel em coluna de Bio Gel P-100 equilibrada com tampão TRIS-HCl 20 mM, pH 7,5 contendo  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  5 mM, apresentando uma eluição de quatro picos (FIGURA 06). Os dois primeiros picos apresentaram atividade hemaglutinante, enquanto os outros dois picos mostraram-se ausentes de atividade hemaglutinante.

### 6.8 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

A FIGURA 07 mostra o perfil eletroforético da fração (PII-HIC) de *G. cornea* analisada em PAGE-SDS na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. O resultado obtido apresentou 8 bandas protéicas de pesos moleculares aparentes variáveis (14 a 45 kDa), mostrando a impureza da fração analisada. Resultado esse confirmado através do perfil cromatográfico obtido por exclusão molecular em Bio Gel P-100.

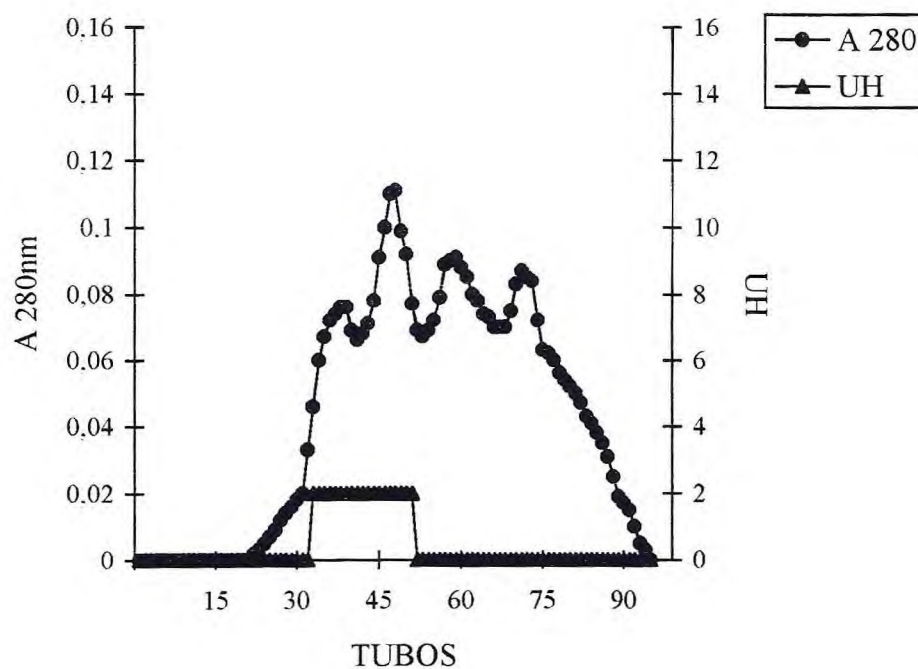


FIGURA 06 - Cromatografia de filtração em gel do PII-HIC de *Gracilaria cornea* em coluna de Bio Gel P-100 equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,02 M, pH 7,5 contendo  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , 5 mM.

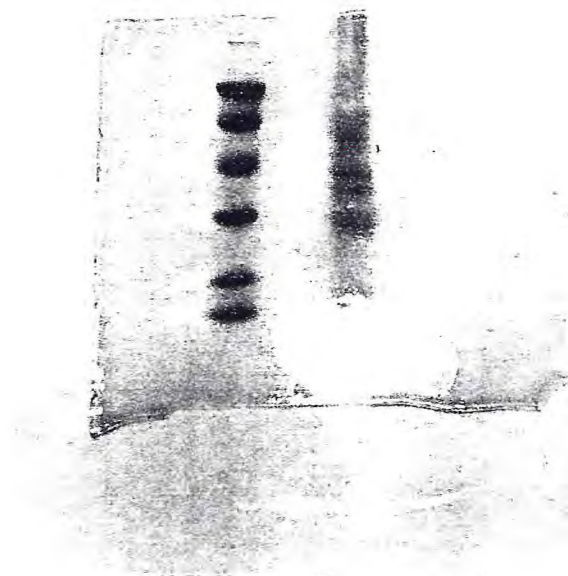


FIGURA 07 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol do PII-HIC de *Gracilaria cornea*. 1: marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; lactoalbumina, 14,2 kDa); 2: PII-HIC.

## 7 - CONCLUSÕES

1. A análise elementar da alga marinha vermelha *G. cornea* apresentou um baixo teor protéico e um elevado teor de carboidratos.
2. A alga *G. cornea* mostrou especificidade por eritrócitos de galinha tratados enzimaticamente com tripsina ou bromelaína.
3. A atividade hemaglutinante não apresentou dependência de cátions divalentes  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ .
4. A atividade hemaglutinante presente em *G. cornea* pode ser considerada termoestável, sendo resistente ao aquecimento a 40 e 50°C por 30 minutos e perdendo toda a atividade a 60°C nos primeiros 10 minutos.
5. A atividade hemaglutinante não foi inibida por açúcares simples nas concentrações utilizadas, porém foi inibida pela glicoproteína mucina na concentração mínima de 625 µg/ml.
6. A cromatografia em DEAE-Celulose separou os pigmentos da fração aglutinante presente no extrato. A fração não adsorvida à coluna (PI-DEAE) encerrou toda a atividade hemaglutinante.

7. O estudo eletroforético em PAGE-SDS obtido com o PII-HIC mostrou a impureza da fração aglutinante, sugerindo a realização de etapas adicionais para a purificação da lectina.
8. A cromatografia de exclusão molecular em Bio Gel P-100 confirmou a presença de diversas frações protéicas, onde os dois primeiros picos encerraram toda a atividade hemaglutinante.
9. Estudos adicionais deverão ser realizados para uma melhor purificação da lectina de *G. cornea*.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. L. P.; COSTA, F. H. F.; CARVALHO, M. C. & PINHEIRO JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica Marina**, **35(11)**: 475 - 479, 1992.
- ALLEN, A. K. & DESAI, N. N. & NEUBERGER, A. (1978). Properties of potato lectins and the nature of its glycoprotein linkages. **Biochem. J.**, **171**: 665 - 674.
- ALLEN, A. K. & NEUBERGER, A. (1973). The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline - containing glycoprotein. **Biochem. J.**, **135**: 307 - 314.
- BAETHGEN, W. E. & ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. **Commun. In Soil Sci. Plant Anal.**, **20 (9/10)**: 961 - 969, 1989.
- BARONDES, S. H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. **TIBS**, **13**: 480 - 482, 1988.
- BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **8(2)**: 117 - 122, 1996.

- BLUMBERG, S. & TAL, N. (1976). **Biochem. Biophys. Acta.** **453:** 357 - 374, citado por MOREIRA, R. A.; AINOZ, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86(11):** 211 - 218, 1991.
- BOYD, W. C.; ALMODOVAR, L. R. & BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **6:** 82 - 83, 1966.
- BOYD, W. C. & REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.**, **62:** 333 - 339, 1949.
- BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E. (1954). *Science* 119, 419. Citado por Liener, I. E.; Sharon, N. e Goldstein, I. J. In *The Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*, 1986.
- BRETTING, H.; JACOBS, G.; TICHÁ, M. & KOCOUREK, J. Studies on lectins LXXIII. Lectins of the sponge *Axinella polypoides* and their dissociation constant. In J. Kocourek & D. L. J. Freud, (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Proceeding of the 10th Lectin Meeting. Vol. 7, pp 187 - 195. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, 1990.

- BROEKAERT, W. F.; NSIMBA - LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. (1984). A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochem. J.**, **221**: 163 - 169.
- CAMMUE, B.; STINISSEN, H. M. & OEUMANS, W. J. A new type of cereal lectin from leaves of couch grass (*Agropyrum repens*). **Biochem. J.**, **148**: 315 - 322, 1985.
- CARLINI, C. R. & GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon** vol. 29, n. 7 p. 791 - 806, 1991.
- CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, **3**: 1 - 9, 1991.
- COSTA, F. H. F. Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina Mitogênica presente na Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* Lamouroux. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 112 pp, Fortaleza, 1995.
- DOYLE, R. J.; THAMASSON, D. L. & NICHOLSON, S. K. Stabilization of Con A by metal ligands. **Carbohyd. Res.**, **46**: 11 - 18, 1976.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chem.**, **28(3)**: 350 - 356, 1956.

FARIAS, W. R. L. Purificação, Caracterização Parcial e Atividade Biológica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Meristella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Unversidade Federal do Ceará, 100 pp, Fortaleza, 1995.

GILBOA - GARBER, N.; CITRONBAUM, R.; LEVENE, C. & SELA, R. H blood group detection by the L - fucose binding lectin of the green marine alga *Ulva lactuca*. **Developmental and Comparative Immunology**, **12**: 695 - 705, 1988.

GOLDTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T. & SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, **285**: 60, 1980.

HAMMARSTROM, S. Snail (*Helix pomatia*) hemagglutinin. **Meth. Enzymol.**, **28**: 368 - 383, 1972.

HORI, K.; IKEGAMI, S.; MIYAZAWA, K. & ITO, K. Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*.

**Phytochemistry**, **27(7)**: 2063 - 2067, 1988<sup>b</sup>.

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

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; FUSETANI, N. & ITO, K. Hypinins, low-molecular weight peptidic agglutinins from the red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica Biophysica Acta**, **873**: 228 - 236, 1986<sup>b</sup>.

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

KAMIYA, H.; SHIOMI, K. & SHIMIZU, Y. Marine biopolymers with cell specificity III Agglutinins in the red alga *Cystoclorium purpureum*: Isolation and characterization. **Journal of Natural Products**, **43(1)**: 136 - 139, 1980.

KILPATRICK, D. C.; GRAHAM, C. & URBANIAK, S. J. The immunosuppressive nature of tomato lectin and its possible clinical relevance. In T. C. Bog - Hansen & J. Breborowicz, (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Proceedings of the 6th Lectin Meeting. Vol. 3, pp. 3 - 14. Walter

de Gruyter Berlin - New York, 1985.

KOBERT, R. (1900). **Arch. Ver. Freunde Naturgesch. Mecklenburg, Suppl. XIII - XIX.** Citado por Kocourek em *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.* (1986).

KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. A note of the recent discussion of definition of term "lectin". In: Bog - Hansen, T. C. and Spengler, g. A. eds.: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.** Proceedings of the 5th lectin meeting, vol. 3 pp. 3 - 6. Walter de Gruyter, Berlin, 1983.

KOSHTE, V. L.; DIJK, W.; STELT, E. & AALBERSE, R. C. Isolation and characterization of BanLec I, a mannoside - bending lectin from *Musa paradisiacae* (banana). **Biochem. J., 272:** 721 - 726, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature, 227:** 680 - 685, 1970.

LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKEK, H. In: *Handbuck der Biochemie des Menschen und der Tiere* (C. Oppenheimer ed.) Isted. Vol. 2 Part 1 pp. 399 - 406. Fisher. Jena. Citado por Jan Kocourek, 1986.

- LIENER, I. E.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions and Application in Biology and Medicine**, 600 pp., Academic Press, New York, 1986.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higher plants. **The Biochemistry of Plants**, 6: 371 - 447, 1981.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265 - 275, 1951.
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Fenn.**, 35(11): 1 - 156, 1957.
- OKAMOTO, R.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. & ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa - pastoris*. **Experientia**, 46: 975 - 977, 1990.
- PEUMANS, W. J.; NSIMBA - LUBAKI, M.; PEETERS, B. & BROEKAERT, W. F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. **Plant Physiol.**, 164: 75 - 82, 1985.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Lectins as defence proteins. In: Pusztai, A. and Bardocz, S. eds. **Lectins:**

**Biomedical Properties**, 331 pp, Taylor & Francis, London, 1995.

PUSZTAI, A. & STEWART, J. C. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*.  
Phytochemical studies. **Biochem. Biophys. Acta**, **536**: 38 - 49,  
1978.

PUSZTAI, A. Plant Lectins. Cambridge, Cambridge University Press,  
263 pp, 1991.

RAVIDRANATH, M. H. & COOPER, E. L. Crab lectins: receptor  
specificity and biomedical applications. **Prog. Clin. Biol. Res.**,  
**157**: 83 - 96, 1984.

RENKONNEN, K. O. Studies on the hemagglutinins present in seed of  
some representatives of the family *Leguminosae*. **Ann. Med.**  
**Exptl. Fenniae (Helsinki)**, **26**: 66, 1948.

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

ROGERS, D. J. & BLUNDEN, G. Structural properties of the anti-B  
lectin from the red alga *Ptilota plumosa* (Hunds.) C. Ag.  
**Botanica marina**, **23(7)**: 459 - 462, 1980.

- ROGERS, D. J. & FISH, B. C. Marine algal lectins. In D. C. Kilpatrick; E. Van Driessche & T. C. Bog - Hansen (Eds). **Lectins Reviews**. Proceedings of the first Lectin Meeting. Vol. 1, pp. 129 - 142. Sigma Chemical Company. St. Louis, Missouri, USA, 1991.
- ROGERS, D. J.; FISH, B. C. & BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins 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. Vol. 7, pp. 49 - 52. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, 1990.
- ROGERS, D. J. & HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiology**, **260/261**: 589 - 593, 1993.
- ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W. & BALDING, P. Isolation and characterization of the lectins from sub - species of *Codium fragile*. In T. C. Bog - Hansen & J. Breborowicz, (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Proceedings of the 7th Lectin Meeting. Vol. 5, pp. 155 - 160. Walter de Gruyter, Berlin - New York, 1986.
- ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W. & NORTHCOTT, M. J. Specificity studies on lectin - type haemagglutinins from *Codium*

*fragile*. **J. Pharmacol.**, **36**: 71, 1984.

ROGERS, D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G. & CRITCHLEY, A. T. Binding of N - acetyl -  $\alpha$  - D - galactosamine by lectins from species of the green marine algal genus, *Codium*. In E. Van Driessche; J. Fisher; S. Beechmans & T. C. Bog - Hansen, (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Vol. 10, pp. 162 - 165, Published by Tertop, Hellerup (Denmark), 1994.

ROGERS, D. J. & TOPLISS, J. A. Purification and characterization of an anti - silicic acid agglutinin from the red alga *Solieria chordalis* (C. Ag.). **J. Ag. Botanica marina**, **26(6)**: 301 - 305, 1983.

SAMPAIO, A. H.; AINOUS, I. L.; FREITAS, A. L. P. & BENEVIDES, N. M. B. Hemaglutininas de Algas Marinhas. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **5(2)**: 171 - 177, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. 126 pp., Chapman and Hall, London, New York, 1989.

SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, **4**: 3198 - 3208, 1990.

- SHIOMI, K.; KAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. Purification and characterization of na agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*, **Biochimica Biophysica Acta**, **576**: 118 - 127, 1979.
- SHIOMI, K.; YAMANAKA, H. & KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA - 1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, **47(8)**: 1079 - 1084, 1981.
- STILMARK, H. Uber ricin, ein giftiges ferment aus saem von *Ricinus communis* L., und einiger anderen euphorbiaceen. Tese de Doutorado, Univ. de Dorpat, Dorpat (Tortu), 1988.
- TALBOT, C. F. & ETZLER, M. E. Isolation and characterization of a protein from leaves and stem of *Dolichus biflorus* that cross reacts with antibodies to the seed lectin. **Biochemistry**, **17(8)**: 1474 - 1478, 1978.
- TAYLOR, Wm. R. Marine algae of the Eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. **University of Michigan Studies Scientific Series**, V. XXI, 1960.
- TRIBOLD, H. O. **Quantitative Analyses with Applications to Agricultural and Food Products**. 331 pp., D. Van Nostrand Co., New York, 1946.

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

VASTA, G. R. & MARCHALONIS, J. J. Lectins from tunicates and  
cyclostomes a biochemical characterization. In T. C. Bog -  
Hansen & G. A. Spengler, (Eds). **Lectins: Biology,  
Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Proceedings of the 5th  
Lectin Meeting. Vol. 3, pp. 461 - 468. Walter de Gruyter, Berlin -  
New York, 1983.