



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

**APLICAÇÃO DE CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS NO ISOLAMENTO
DE LECTINAS**

BARTOLOMEU WARLENE SILVA DE SOUZA

**Monografia 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 - BRASIL
2001.2**



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)

Souza, Bartolomeu Warlene Silva de.

Aplicação de carboidratos de Algas Marinhas no isolamento de lectinas / Bartolomeu Warlene Silva de Souza. – 2000.

58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2000.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Algas Marinhas. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. ANA LÚCIA PONTE FREITAS
Orientadora / Presidente

Msc. JOSÉ WILSON CALÍOPE DE FREITAS
Membro

Msc. ARTAMÍZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA
Membro

VISTO:

Dr. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Msc. MARIA SELMA RIBEIRO VIANA
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

À minha querida mãe (*in memoriam*) que sempre foi um exemplo de força e coragem e que mesmo ausente em nossas vidas, nunca deixou de existir em nossos corações .

Ao meu amado Pai que com seus ensinamentos e seus cuidados , foi o maior responsável pela minha formação como cidadão.

Ao amor e ao carinho de meus irmãos, Verlaine e Varlene, e o mais importante a nossa união.

Aos meus estimados tios e tias que sempre com incentivo e apoio foram meios importantes nesta conquista.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, pelo carinho e dedicação que sempre teve comigo, e pelos seus ensinamentos que foram importantes na minha iniciação como pesquisador.

Ao meu grande amigo e Professor, Dárlio Inácio Alves Teixeira, que sempre esteve ao meu lado durante estes anos de trabalho, agradeço pelo incentivo e pelas inúmeras oportunidades que proporcionou, na minha vida acadêmica.

Ao professor Dr. Renato de Azevedo Moreira, que com seus ensinamentos e sugestões, colaborou de forma decisiva para a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Norma Maria Barros Benevides, pela colaboração e apoio que sempre me concede.

Com muito carinho e infinita gratidão a todos os amigos do Laboratório: Lídia, Luiziete, Rúbia, Samya, Nilka, Tereza, Fábria, Areta, professor Calíope, Carlos, Draúlio, Eliomar, e ao meu amigo Márcio Alves.

A todos do Laboratório de Algas Marinhas II (Lab 1045) pelo companheirismo e auxílio na realização deste trabalho.

Ao meu grande Amigo, Norberto Júnior, que durante este anos de faculdade foi um grande companheiro e incentivador do meu trabalho.

Aos meus amigos, Fábio Rabelo e André Coelho, pela atenção que sempre me dedicaram.

À todos os professores e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos os professores do Curso de Engenharia de Pesca em especial aos professores Calíope e Artamizia por aceitarem participar desta banca e pelos seus ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca, em especial a Secretária Leni.

Ao amigo Professor Dr.Edson Vicente da Silva (Cacau) pelas suas palavras de estímulo, que foram fundamentais durante à nossa expedição à Antártica.

As amigas de curso da Engenharia de pesca; Alessandra, Karine, Gleire, Cilene, Janisi, Irlanda, Karol, Luciana, Ana Cristina, que me encheram de Luz e alegria durante estes anos.

Aos amigos da Engenharia de Pesca; Thales, Alex, Charleston, Cristiano, Artur, Ronaldo, Toivi, Romulo, Max, Rossi, Túlio, Lelis, Celso Nagano, pela parceria e amizade.

Aos amigos do instituto Terramar , Cláudio e Jefferson, e a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram,

Meus sinceros agradecimentos.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por auxílios à pesquisa e pela bolsa de iniciação à pesquisa a mim concedida.

Financiamento de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Universidade Federal do Ceará , Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular em cujos laboratórios foi executado este trabalho.

Ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR –CNPq) que através de financiamento ao Projeto Estudo Bioquímico da Flora Antártica, contribuiu na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Algas.....	1
1.2. Carboidratos	2
1.3. Gomas	3
1.3.1. Gomas de Algas Marinhas.....	5
1.4. Lectinas	6
1.4.1. Lectinas de Algas Marinhas.....	7
1.5. Modificação das gomas por reticulação.....	12
1.6. Classificação taxonômica das algas marinhas em estudo.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS.....	15
3.1. Algas.....	15
3.2. Células Sangüíneas.....	15
3.3. Reagentes.....	15
4. MÉTODOS.....	16
4.1. Extração de Carboidratos Sulfatados.....	16
4.2. Reticulação dos Carboidratos pelo Tratamento com Epicloridrina.....	16
4.3. Montagem dos colunas cromatográficas.....	19
4.4. Extração de Proteínas.....	19
4.5. Determinação da Atividade Hemaglutinante	22
4.6. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante.....	22
4.7. Isolamento das Lectinas das Algas <i>Agardhiella ramossisima</i> <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Meristiella echinocarpa</i>	22

4.7.1	Cromatografia de Afinidade em Coluna de Polissacarídeos Sulfatados Reticulados de <i>Agardhiella ramossisima</i>	23
4.7.2	Cromatografia de Afinidade em Coluna de Polissacarídeos Sulfatados Reticulados de <i>Gracilaria cornea</i>	23
4.7.3	Cromatografia de Afinidade em Coluna de Polissacarídeos Sulfatados Reticulados de <i>Meristiella echinocarpa</i>	23
4.8	Eletroforese em PAGE - SDS	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Extração dos Carboidratos Sulfatados de Algas.....	25
5.2	Reticulação dos Carboidratos das Algas <i>A. ramossisima</i> , <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Meristiella echinocarpa</i>	25
5.3	Extração de Proteínas e Determinação da Atividade Hemaglutinante.....	26
5.4	Ensaio de inibição da Atividade Hemaglutinante no Extrato Total.....	26
5.5	Isolamento das Lectinas das Algas <i>Agardhiella ramossisima</i> , <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Meristiella echinocarpa</i>	32
5.5.1	Cromatografia de Afinidade do Extrato de <i>A. ramossisima</i> em Coluna de PS - <i>A. ramossisima</i>	32
5.5.2	Cromatografia de Afinidade do Extrato de <i>G. córnea</i> em Coluna de PS – <i>G. córnea</i>	34
5.5.3	Cromatografia de Afinidade do Extrato de <i>M. echinocarpa</i> em Coluna de PS - <i>M. echinocarpa</i> ...	36

RESUMO

No presente trabalho, polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marinhas vermelhas *Agardhiella ramosíssima*, *Gracilaria cornea* e *Meristiella echinocarpa*, foram utilizados como ferramentas no isolamento de lectinas endógenas (lectinas de algas marinhas), que são proteínas com capacidade de interação específica e reversível a carboidratos.

As colunas cromatográficas preparadas a partir dos polissacarídeos reticulados das algas marinhas em estudo, foram eficientes para o isolamento das lectinas *A.ramosissima*, *Meristiella echinocarpa* e *G. cornea*, nas condições empregadas no presente trabalho.

A análise eletroforética (SDS - PAGE) da fração que interagiu com a matriz PS - *A . ramosissima* mostrou duas bandas protéicas de 51 e 58 kDa, enquanto a fração ligante à matriz PS de *G. córnea* revelou duas bandas protéicas com massas moleculares aparentes de 73 e 88 kDa.

Em decorrência da elevada concentração de carboidratos presentes nas preparações obtidas de *Meristiella echinocarpa*, o perfil eletroforético das proteínas de *M. echinocarpa*, mostrou-se muito difuso, não permitindo a visualização das bandas definidas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Esquema geral de extração de carboidratos sulfatados.....	17
2. Processo de reticulação das gomas com eplicoridrina.....	18
3. Esquema de extração de proteína da alga <i>Agardhiella ramossissima</i> ...	20
4. Esquema de extração de proteína da alga <i>Gracilaria cornea</i>	20
5. Esquema de extração de proteína da alga <i>Meristiella echinocarpa</i>	21
6. Cromatografia de afinidade do extrato concentrado de <i>A. ramossíssima</i> em coluna de goma reticulada de PS-A.ramossissima	33
7. Cromatografia de afinidade do extrato concentrado de <i>G. cornea</i> em coluna de goma reticulada de (PS-G.cornea).....	35
8. Cromatografia de afinidade do extrato concentrado de <i>M. echinocarpa</i> em coluna de goma reticulada de PS- M.echinocarpa	37
9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β - mercaptoetanol do PII da cromatografia em coluna de CS -Gc , referente ao extrato concentrado de <i>Gracilaria cornea</i>	40
10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β - mercaptoetanol do PII da cromatografia em coluna de Polissacarideo sulfatado, referente ao extrato concentrado de <i>Agardhiella ramossissima</i>	41

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1. Classificação Geral das gomas	4
2. Levantamento de lectinas de algas marinhas verdes, isoladas por cromatografia de afinidade	10
3. Levantamento de lectinas de algas marinhas vermelhas, isoladas por cromatografia de afinidade.....	11
4. Cálculo do rendimento dos carboidratos sulfatados.....	25
5. Especificidade da atividade hemaglutinante presente no extrato total de <i>Agardhiella ramossisima</i>	28
6. Especificidade da atividade hemaglutinante presente no extrato total de <i>Gracilaria cornea</i>	29
7. Especificidade da atividade hemaglutinante presente no extrato total de <i>Meristiella echinocarpa</i>	30
8. Purificação das lectinas de <i>Agardhiella ramossisima</i> , <i>Gracilaria cornea</i> e <i>Meristiella echinocarpa</i>	38

APLICAÇÃO DE CARBOIDRATOS DE ALGAS MARINHAS NO ISOLAMENTO DE LECTINAS

BARTOLOMEU WARLENE SILVA DE SOUZA

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Algas

Alga é um termo genérico, desprovido de significado taxonômico, que inclui organismos que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Estes organismos não são necessariamente semelhantes entre si e, nem sempre, possuem origem evolutiva próxima. Desempenham um papel ecológico importante como produtores primários dos ecossistemas onde ocorrem. O fato de serem clorofilados, não implica que sejam verdes, pois além das clorofilas, possuem outros pigmentos denominados acessórios, que podem mascarar a presença da clorofila proporcionando às algas colorações avermelhadas azuladas, pardas ou até enegrecidas.

Quanto à organização do talo as algas apresentam uma diversidade muito grande, existindo em formas microscópicas até formas que atingem 60 metros de comprimento, como as algas pardas do gênero *Macrocystis*.

As algas podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, ocorrendo em formas terrestres e aquáticas, até formas que vivem em associações com outros organismos (ex. líquens: fungo + alga). As formas mais comuns são aquáticas, podendo ocorrer em rios, lagos, mangues e mares. Nestes ambientes, podem fazer parte dos bentos (conjunto de indivíduos que vivem fixos ao substrato) ou plâncton (conjunto de indivíduos que vivem em suspensão na coluna de água devido sua pequena ou nula capacidade de locomoção).

Quando os organismos marinhos bentônicos (algas e animais) são considerados, pode ser feita uma distinção quanto à faixa do litoral que ocupam. O litoral pode ser dividido em supralitoral, médio-litoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, que mesmo nas marés mais altas não fica submerso. Está sujeito apenas a borrifos de alga salgada, especialmente em locais muito batidos. O médio-litoral corresponde à faixa que pode ser temporariamente descoberta nas marés baixas. O infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar, mesmo nas marés mais baixas.

Algas são seres preferencialmente aquáticos e fotossintetizantes, fornecendo oxigênio para a água e atmosfera, enquanto são produtores primários de glicose. Possuem reservas de cálcio, iodo, potássio, bromo, magnésio, Agar, carragenanas e alginatos usados nas indústrias do Nordeste do Brasil e em várias partes do mundo para alimentação, ração e adubo, na indústria farmacêutica, de cosméticos, têxtil, dentre outras (OGAWA e KOIKE, 1987).

Quanto à sua coloração, as algas são classificadas em quatro grandes grupos:

- ***Chlorophyceae*** → algas verdes
- ***Cyanophyceae*** → algas azuis
- ***Phaeophyceae*** → algas pardas
- ***Rhodophyceae*** → algas vermelhas.

As algas verdes e azuis usualmente crescem em água doce, enquanto as algas pardas e vermelhas em ambiente marinho.

1.2 - Carboidratos

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na face da terra. Certos carboidratos (açúcar comum e amido) são a base da nutrição humana na maioria das partes do mundo e a sua oxidação é a principal via metabólica liberadora de energia em muitas células não - fotossintéticas. Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais, quanto de proteção nas paredes das células bacterianas e vegetais, como em tecidos conjuntivos e de cobertura celular de animais. Outros polímeros de carboidratos agem como lubrificantes das articulações esqueléticas e fornecem coesão entre as células. Polímeros complexos de carboidratos, ligados covalentemente a proteínas ou lipídeos, agem como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico desses glicoconjugados (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Os carboidratos estão presentes em vegetais freqüentemente como polissacarídeos, que são produtos da policondensação de monossacarídeos ou seus derivados (ácidos urônicos, açúcares aminados, etc.), ligados glicosidicamente através da eliminação de água entre duas moléculas adjacentes. A denominação polissacarídeos é limitada aos polímeros de dez ou mais unidades

monossacarídicas. Os polímeros contendo de dois a nove unidades monossacarídicas denominam-se oligossacarídeos. Geralmente os polissacarídeos possuem elevado peso molecular, contendo em alguns casos milhares de unidades monossacarídicas (CORRÊA, 1971).

1.3. Gomas

Inserida na nomenclatura usual dos polímeros naturais, encontramos as gomas, que podem ser obtidas de exsudados de árvores, sementes, algas ou por fermentação microbológica (CHURMS *et al.*, 1986).

O termo goma foi inicialmente atribuído a um grande número de compostos, incluindo polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros sintéticos. Hoje o termo é mais utilizado para polissacarídeos e seus derivados, que hidratam em água, fria ou quente, formando soluções viscosas ou dispersões (PAULA, 1995). As gomas naturais são geralmente insolúveis em solventes orgânicos, sendo, portanto hidrofílicas e se decompõem a temperaturas elevadas. Possuem, em geral, a propriedade de gelificar e são muito utilizadas como espessantes e estabilizantes nas indústrias de alimento e farmacêutica; são compostas principalmente por heteropolissacarídeos complexos, contendo às vezes, compostos protéicos associados em baixa proporção (CHURMS *et al.*, 1986). Inclui-se nesta categoria, os exsudados de plantas e as gomas extraídas de algas e de sementes.

Com características semelhantes às gomas vegetais, podem ser incluídas, aquelas obtidas por fermentação microbológica. Atualmente, além das gomas naturais, são muito utilizadas gomas modificadas e sintéticas (TABELA I).

Tabela 1 - Classificação das gomas quanto à sua natureza*

Gomas Naturais	Exsudatos de Plantas	Goma Arábica
		Goma Karaya
		Goma Ghatti
		Goma do Cajueiro
		Goma do Angico
		Goma Tragacanth
	Extraídas de Algas	Agar
		Carragena
		Alginato
	Extraídas de Sementes	Goma Guar
		Goma Carol
		Goma Tara
		Goma Fenugreek
Fermentação Microbiológica	Dextrana	
	Xantana	
Gomas Modificadas	Celulose	Carboximetilcelulose
		Hidroximetilcelulose
		Hidroxietilcelulose
	Amido	Carboximetilamido
		Hidroxietilamido
		Hidroxipropilamido
		Acetato de amido
	Guar	Carboximetilguar
	Alginato	Alginato de propilenoglicol
	Gomas Sintéticas	Álcool polivinílico
Álcool poliacrílico		
Poliacrilamida		
Polióxido de etileno		

WHISTLER & MILLER (1993); PAULA (1995*).

As gomas modificadas derivam de polissacarídeos insolúveis em água na forma natural, como celulose e amido. As sintéticas são macromoléculas que apresentam propriedades semelhantes às das gomas naturais e por isso, industrialmente, também são denominadas de gomas embora não sejam encontradas na natureza.

1.3.1- Gomas de Algas

As gomas extraídas de algas marinhas são de três tipos diferentes: Agar e carragenanas têm origem em algumas espécies de algas vermelhas, e os alginatos extraídos de algas pardas.

A palavra "Agar" refere-se a membros da classe de galactanas que ocorrem como matrizes intercelulares em numerosas espécies de algas marinhas vermelhas (Rhodophyceae). O Agar tem função estrutural no tecido algal análogo, porém diferente na forma, com relação à celulose em plantas terrestres. Enquanto plantas terrestres requerem estruturas rígidas capazes de resistirem a constantes trações gravitacionais, algas precisam de estruturas mais flexíveis para acomodar o estresse sofrido pelos movimentos de correntes e marés (STANLEY, 1995).

As espécies algais produtoras de Agar são denominadas agarófitas e estão presentes nas famílias Gracilariaceae, Gelidiaceae, Phylloporaceae e Ceramiaceae.

As carragenanas são polissacarídeos bastante usados na indústria alimentícia, embora as indústrias de cosméticos, farmacêuticas, e de tintas, também sejam muito beneficiadas pelo seu uso. As carragenanas são polissacarídeos sulfatados, extraídos de espécies de algas marinhas vermelhas (Rhodophyceae), das famílias Gigartinaceae, Solieriaceae, Phylloporaceae e Hypneaceae (BRITO, 2000).

Alginatos ocorrem como componente estrutural de algas pardas (Phaeophyceae), e como polissacarídeos capsulares de bactérias terrestres.

1.4- Lectinas

As lectinas são consideradas uma classe especial de proteínas, devido a sua propriedade de ligação específica e reversível a carboidratos, sua capacidade decodificadora de informações biológicas, como também o seu possível papel no reconhecimento celular.

O estudo das lectinas foi iniciado por STILLMARK (1888), quando verificou que extratos de sementes de algumas plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicas para animais. Além disso, ele mostrou que a ricina aglutinava células epiteliais, hepáticas e leucocitárias. Na mesma ocasião, o autor encontrou propriedades semelhantes em extrato de outra semente, *Cróton triglium*, que apresentava especificidade diferente da ricina. Em seguida, HELLIN (1891) relatou a presença de uma outra lectina tóxica em sementes de *Abrus precatorius*, que foi denominada de abrina.

As investigações com as lectinas trouxeram diversos avanços para a imunologia, desde que PAUL EHRLICH (1891) reconhecido como o pai da imunologia moderna, descobriu o uso de ricina e abrina como modelos de imunógenos potentes para indução de anticorpos específicos, significativamente melhor que os das bactérias. Posteriormente, NOWEL (1960) demonstrou as propriedades mitogênicas das lectinas ao observar que a lectina de *Phaseolus vulgaris* era capaz de induzir a proliferação “in vitro” de linfócitos.

O conhecimento sobre lectinas tem revelado sucessivas definições para esta proteína especial, dentre as quais, mais recente e mais apropriada é aquela citada por PEUMANS & VAN DAMME (1995), que as definiram como “proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica”. CUMMINGS (1997) definiu uma lectina, como uma proteína que se liga a carboidrato, que não seja anticorpo e não tenha atividade enzimática para carboidratos.

A especificidade por açúcar é uma característica marcante das lectinas. A interação das lectinas com células é, portanto, dependente da presença dos carboidratos apropriados na sua superfície. Deste modo, as lectinas ao interagirem com os carboidratos da superfície dos eritrócitos induzem ligações cruzadas entre as células, que resultam na aglutinação, denominada tecnicamente de aglutinação celular ou hemaglutinação (LIS e SHARON, 1998).

As lectinas são encontradas na maioria dos organismos (vírus, bactérias, plantas, algas e animais). A maioria das lectinas estudadas foi isolada de plantas, dentre mais de 1000 espécies. Estas proteínas estão distribuídas em muitos tecidos vegetais como, raízes, cascas, folhas, frutos, sementes, bulbos e rizomas, dependendo de cada vegetal. É nas sementes, no entanto, onde elas são mais abundantes chegando em alguns casos a 10% das proteínas totais (WHITTAKER, 1969; BROEKART *et al.*, 1984; ETZLER, 1985; VAN DAMME *et al.*, 1987a,b; SHARON e LIS, 1989; 1990).

As lectinas, por apresentarem propriedades particulares, tem sido empregadas largamente no campo da fisiologia e na ciência bioquímica e biomédica. Creditam-se as lectinas um papel de reconhecimento em uma variedade de sistemas biológicos quer sejam microorganismos, plantas ou animais. Assim é que as lectinas, além de serem capazes de precipitar células e glicoconjugados, através de interação com a superfície da membrana, induzem uma série de modificações nas mesmas. Outras investigações têm mostrado a aplicação de lectinas no estudo e caracterização de glicoconjugados de superfície celular, através de cromatografia de afinidade, utilizando lectinas imobilizadas.

1.4.1- Lectinas de Algas Marinhas

As lectinas em algas marinhas foram detectadas pela primeira vez por BOYD *et al.* (1966), quando estudaram 24 extratos aquosos compreendidos entre algas pardas, verdes e vermelhas. Foi observado que seis algas pardas, uma verde e duas pardas aglutinaram inespecificamente eritrócitos de todos os grupos, enquanto uma alga vermelha apresentou especificidade para eritrócitos humanos do grupo A.

A partir deste trabalho inicial, muitos outros relacionados ao levantamento da atividade hemaglutinante em extratos de algas foram realizados. Paralelamente a isto, algumas lectinas de algas passaram a ser isoladas e caracterizadas por diversos pesquisadores de várias partes do mundo. Este interesse levou à obtenção de dados interessantes sobre estas proteínas, o que permitiu uma melhor compreensão de suas mais importantes características.

As lectinas de algas marinhas são um grupo de proteínas com características físico-químicas e estruturais distintas, comparativamente as lectinas de plantas

superiores. Quanto às suas estruturas primárias, apenas recentemente, foram elucidadas parcialmente as seqüências de três lectinas: hypninas A-1 e A-2, de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*,2000), e a aglutinina de *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) (CALVETE *et al.*,2000). As hemaglutininas, hypninas A-1 e A-2, são polipeptídeos de cadeia única, compostos de 90 resíduos de aminoácidos que incluem quatro "half-cystines", isto é, duas pontes dissulfeto (intracadeia) envolvendo os resíduos Cys⁵ - Cys⁶² e Cys¹² - Cys⁸⁹. As massas moleculares de 9146,7 e 9109,7 Da obtidas para, as hypninas A-1 e A-2, respectivamente, coincidiram com os valores determinados de 9148 e 9109 Da através de espectrometria de massa. As lectinas diferiram levemente uma da outra: para a hypnina A-1 as posições Pro¹⁹, Arg³¹ e Phe⁵² correspondem a Leu¹⁹, Ser³¹, e Tyr⁵² para a hypnina A-2. Aproximadamente 43% do número total de resíduos, consistiram de três tipos de aminoácidos: serina, glicina, e prolina.

A aglutinina de *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin), teve sua seqüência de aminoácidos determinada pela combinação do método clássico de degradação de Edman e por espectrometria de massa. Esta lectina foi isolada anteriormente por AINOUZ *et al.* (1995), quando uma massa molecular em torno de 5.000 Da foi obtida por filtração em gel de Sephadex G-75. Entretanto, CALVETE *et al.* (2000), apresentaram para suas isoformas, valores correspondentes a 8980,5, 8964,4 e 8949,5 Da conforme calculados por espectrometria de massa.

O isolamento e a purificação de lectinas foi inicialmente feito através de métodos clássicos de fracionamento de proteínas tais como, precipitação salina, cromatografias e eletroforeses. Com a descoberta da cromatografia de afinidade por AGRAWAL e GOLDSTEIN (1965), quando isolaram a Con A em coluna de Sephadex, hoje praticamente todo o processo de isolamento de lectinas depende da cromatografia de afinidade e ocasionalmente de outro método convencional auxiliar. O esquema de fracionamento a ser seguido depende da especificidade da lectina por açúcar. Em muitos casos matrizes estão disponíveis comercialmente, como o Sephadex e a Sepharose. Em outros casos, são utilizadas colunas de mono e oligossacarídeos e glicoproteínas ligadas à matrizes estáveis, como Avidina-Sepharose (COSTA, 1995), Mucina-Sepharose (NEVES, 1999), e mais recentemente, tem se desenvolvido muito o uso de gomas naturais, após tratamento por reticulação com epícloridrina (MOREIRA *et al.*,1997; ROSA,2000; MELO,2001). A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia de adsorção, no entanto, a

natureza da sua ligação é mais específica, e a matriz escolhida deverá conter um ligante que será reconhecido pela molécula. Quando aplicamos a esta matriz uma solução protéica, e o ligante apresenta afinidade por uma proteína de interesse, esta ficará retida à matriz, enquanto as demais proteínas serão eluídas por lavagem com tampão de equilíbrio.

O emprego desta nova técnica de cromatografia de afinidade tem proporcionado alguns avanços na facilitação do isolamento e no aumento do rendimento da proteína isolada. As TABELAS 2 e 3 reúnem exemplos de lectinas de algas marinhas verdes e vermelhas, respectivamente, isoladas e purificadas pelo emprego da *cromatografia* de afinidade. Lectinas de sete espécies de algas *Chlorophyceae*, apresentaram em sua maioria, especificidade por N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc), foram purificadas em colunas de GalNAc -Sephrose ou GlcNAc-agarose (LOVELESS & ROGERS, 1985; FABREGAS *et al.*, 1988; ROGERS & FANGLU, 1991; BENEVIDES, 2001). Oito espécies de algas *Rhodophyceae* foram isoladas ou purificadas através de um bom número de matrizes de afinidade. Dentre as espécies testadas, metade tiveram suas lectinas isoladas em coluna de Manana-Sephrose e inibidas por um grande número de glicoproteínas (HORI *et al.*, 1987; OKAMOTA *et al.*, 1990., FARIAS, 1995; BENEVIDES *et al.*, 1996).

TABELA 2. Levantamento de Lectinas de Algas Marinhas Verdes, isoladas por Cromatografia de Afinidade.

ESPÉCIES DE ALGAS VERDES	AÇÚCAR INIBIDOR		SUPORTE UTILIZADO	MASSA MOLECULAR		REFERENCIA
	Açúcar Simples	Glicoproteína		Gel Filtração (Da)	PAGE-SDS (Da)	
<i>Codium fragile ssp atlantico</i>	(1)		GalNAc-Sepharose 6B	60.000	15.000	LOVELESS & ROGERS, 1985
<i>C. fragile ssp tomentosoides</i>	(1)		GalNAc-Sepharose 6B	60.000	15.000	LOVELESS & ROGERS, 1985
<i>C. tomentosum</i>	(3)		GlcNAc-agarose		16.000 15.000	FABREGAS et al., 1988
<i>C. vermilara</i>	(1)		GalNAc-Sepharose 6B		13.800 17.800	ROGERS & FANGLU, 1991
<i>C. bursa-pastoris</i>	(1)		GalNAc-Sepharose 6B	18.400	14.000	ROGERS & FANGLU, 1991
<i>Ulva fasciata</i>	(2)	(4)	Goma de Guar Mucina-Sepharose 4B	21.270	20.560	PEREIRA, 2000
<i>Caulerpa cupressoides</i>	(1)		α -lactose-agarose	44.700	23.158	BENEVIDES, 2001

Açúcar simples/Glicoproteína: (1) N-acetilgalactosamina (2) L-fucose; (3) N-acetilglicosamina; (4) Mucina de estomago de porco.

TABELA 3. Levantamento de Lectinas de Algas Marinhas Vermelhas, isoladas por Cromatografia de Afinidade.

ESPÉCIES DE ALGAS VERMELHAS	AÇÚCAR INIBIDOR		SUPORTE UTILIZADO	MASSA MOLECULAR		REFERENCIA
	Açúcar simples	Glicoproteína		Gel Filtração (Da)	SDS-PAGE (Da)	
<i>Carpolpetes flabelata</i>		(4);(10); (14)	Manana-Sepharose 4B		25.000	HORI et al.,1987
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>		(1);(4);(10); (13)	Manana-cellufine	15.500	30.000	OKAMOTA et al.,1990
<i>Meristiela echinocarpa</i>		(2);(3);(4); (10);(11)	Manana-Sepharose	28.900	30.000	FARIAS,1995
<i>Solieria chordalis</i>		(4);(9);(11); (12)	Fetuina-agarose		35.000	ROGERS & TOPLISS,1983
<i>Solieria filiformis</i>		(2);(3);(10); (13)	Manana-Sepharose 4B		29.000	BENEVIDES et al.,1996
<i>Enantiocladia duperreyi</i>	(6);(8)	(4);(11)	α -lactose-agarose	24.700	16.072	BENEVIDES et al.,1998
<i>G. caudata</i>		(4);(11)	Mucina-Sepharose	10.000		NEVES,1999
<i>Vidalia obtusiloba</i>	(7);(15);(16); (17)	(11)	Goma de Guar α -lactose-agarose GalNAc-agarose		74.807	MELO,2000

Açúcar simples/Glicoproteína: (1) Asialofetuina; (2) Avidina; (3) Egg white; (4) Fetuina; (5)Fucose; (6) Fucose e derivados (7) D(+) Galactose; (8) Galactose e derivados; (9) Sialoglicoproteína MN de humano; (10) Manana de levedura; (11) Mucina de estomago de porco; (12) Mucina da glândula maxilar de boi;(13) Ovalbumina; (14) Transferrina; (15) α -lactose; (16) D(+) Galactosamina; (17)N-acetilgalactosamina.

1.5- Modificação das Gomas por Reticulação

Existem vários tipos de modificações de polímeros como, a introdução na cadeia de grupos neutros, ácidos, básicos e etc. Todas essas modificações têm por objetivo, dar ao material, características adequadas às necessidades de sua aplicação final.

A modificação por reticulação de gomas envolve a formação de ligações cruzadas entre as cadeias dos polissacarídeos, para a formação de uma rede estrutural, com resistência e insolubilidade fundamentais para a sua utilização.

Devido às gomas naturais serem solúveis em água, estas só podem ser utilizadas como matrizes cromatográficas, por modificação química, quando submetidas a tratamentos com agentes formadores de ligações cruzadas. Como agentes reticuladores podemos citar: epícloridrina, vinilsulfona e diisotiocianato . A epícloridrina forma ligações cruzadas nas cadeias dos polissacarídeos, resultando em um material que, em contato com a água, intumescce e produz um gel viscoso. A goma arábica, conhecida como acácia, foi utilizada por FUGITA *et al.* (1975) para a confecção de uma matriz cromatográfica de afinidade por reticulação com epícloridrina. A cromatografia foi desenvolvida usando um filtrado de cultura de *Streptomyces* sp, contendo lectinas específicas por galactose.

1.6 -Classificação Taxonômica das Algas Marinhas em Estudo

Agardhiella ramossissima (Harv.) Kylin,

Gracilaria cornea (J. Agardh)

Meristiella echinocarpa (Areschoug) Cheney et Gabrielson

Segundo a classificação taxonômica temos:

Divisão	Rhodopyta	Rhodopyta	Rhodopyta
Ordem	Gigartinales	Gracilariales	Gigartinales
Família	Solieriaceae	Gracilariaceae	Solieriaceae
Genero	<i>Agardhiella</i>	<i>Gracilaria</i>	<i>Meristiella</i>
Especie	<i>Agardhiella ramossissima</i> (Harv.) Kylin	<i>Gracilaria cornea</i> (J. Agardh)	<i>Meristiella echinocarpa</i> (Areschoug) Cheney et Gabrielson.

2- OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos realizar o isolamento de polissacarídeos de três espécies de algas marinhas vermelhas, fracioná-los e reticulá-los com epícloridrina e, em seguida, avaliar a eficiência das matrizes obtidas para o isolamento de lectinas endógenas.

3. MATERIAIS

3.1 – Algas

As espécies algais foram coletadas periodicamente em maré de sizígia na praia de Fleixeiras e Guajirú no município de Trairí, Ceará. Após a coleta, as algas foram transportadas para o laboratório em recipientes isotérmicos, onde foram lavadas, separadas, identificadas, livre de epífitas e armazenadas em sacos plásticos e estocadas a -20°C para posterior utilização.

3.2- Células Sangüíneas

Amostras de sangue de coelho albino foram obtidas de animais adultos e sadios mantidos em cativeiro no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará.

Sangue de galinha foi obtido de animais criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

3.3 – Reagentes

Acrilamida, N,N'-metileno bisacrilamida, Agarose, Albumina Sérica Bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250, Tripsina, Bromelaína, Papaína, Epicloridrina, Cetyl Pyridine Chloridric (CPC) foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

β -Mecaptoetanol, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e DEAE- celulose, DEAE-Sephrose, CM-Sephadex, foram adquiridos de Merck, Darmstadt, Alemanha.

Marcadores para eletroforese: Fosforilase B - 94 kD, Albumina Sérica Bovina - 67 kD, Ovalbumina - 43 kD, Anidrase carbônica - 30 kD, Inibidor de tripsina de soja - 20 kD e (-Lactoferrina - 14,4 kD, fornecidos por Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4. MÉTODOS

4.1- Extração de Carboidratos Sulfatados (CS)

As extrações dos carboidratos sulfatados das algas marinhas *Adardhiella ramossissima*, *Gracilaria cornea* e *Meristiela echinocarpa* foram feitas à quente, quando uma hidrólise com papaína foi conduzida a 60°C por 24h. Após este período o material foi filtrado à vácuo, para separação de um hidrolizado que foi posteriormente tratado com cetylpyridinium chloride (CPC) para a precipitação da fração de carboidratos sulfatados. A suspensão foi centrifugada e, a fração rica em carboidratos sulfatados foi lavada com álcool e acetona para a remoção de excesso de enzimas. Em seguida, procedeu-se a secagem ao ar livre (Figura 1).

4.2- Reticulação dos Carboidratos pelo Tratamento com Epicloridrina.

Esta etapa corresponde ao tratamento dos carboidratos sulfatados com epicloridrina, para a obtenção de matrizes de afinidade, goma natural de algas modificadas segundo APPUKUTTAN et al. (1977).

No método mencionado, para cada 0,5g de goma foram adicionados 1,5 mL de NaOH 3 M , seguido de 0,15 mL de epicloridrina. A mistura foi agitada mantida por 24 horas a 40°C e por 12 horas a 70°C. A pós o material foi homogeneizado e em seguida feita a montagem das colunas cromatográficas (Figura 2).

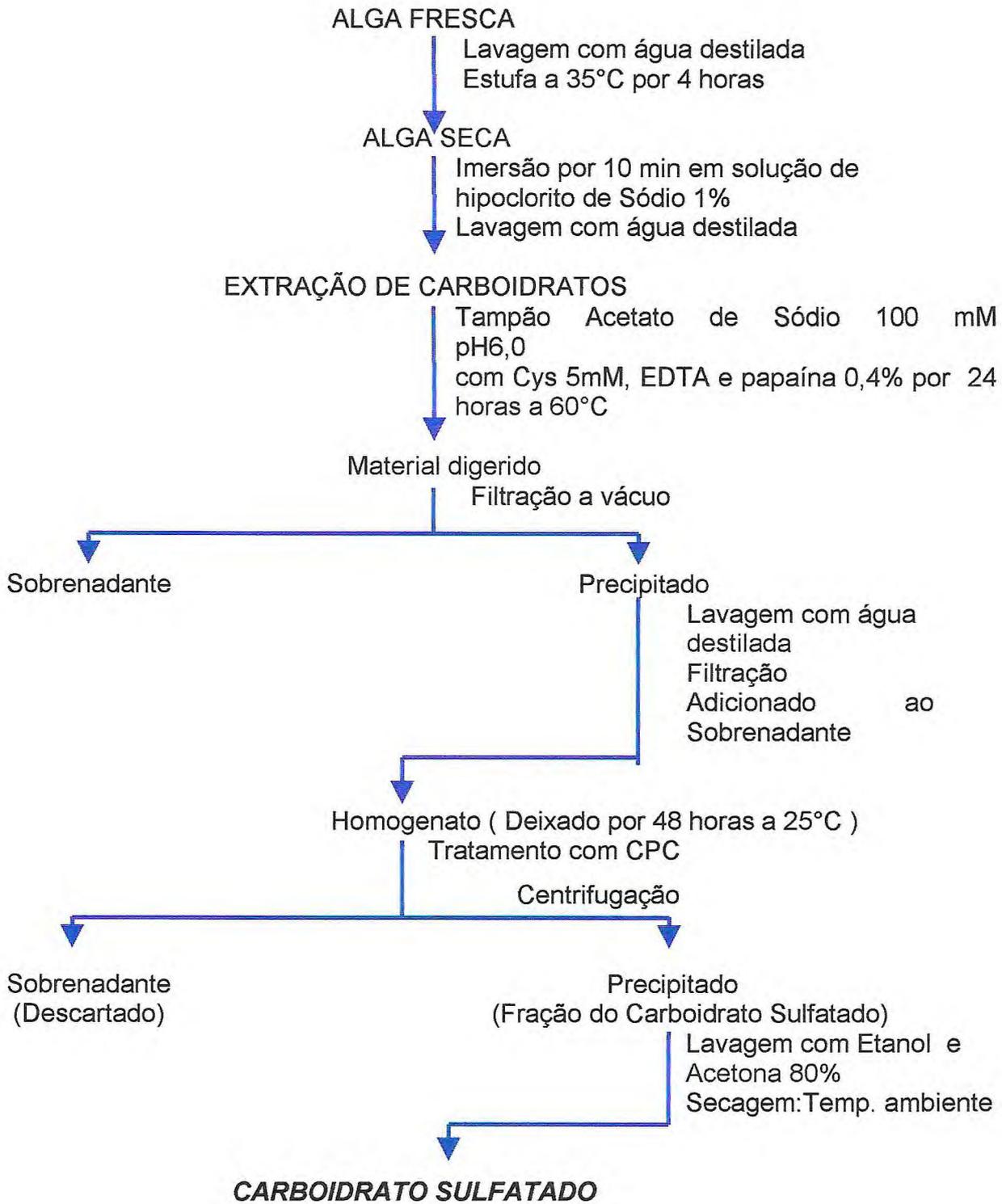


Figura 1: Esquema Geral de Extração de Carboidratos Sulfatados. (FARIAS et al ., 2000)

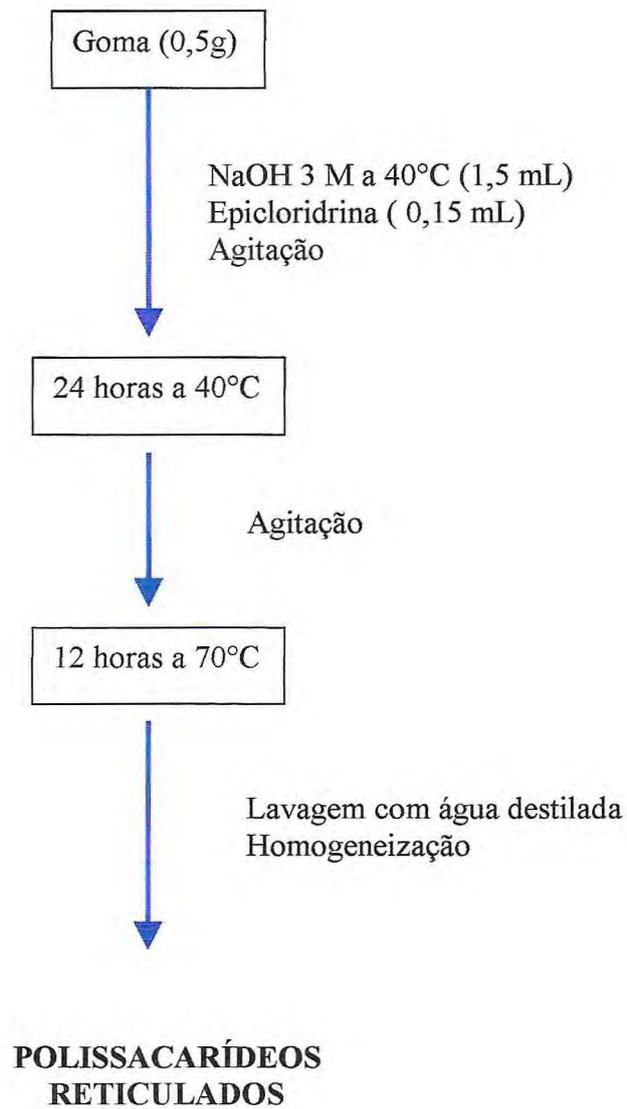


Figura 2. Processo de Reticulação das Gomas com Epicloridrina (APPUKUTTAN *et al.*, 1977).

4.3- Montagem das Colunas

As colunas foram montadas empregando-se um tubo de vidro cilíndrico de dimensões equivalentes a 10 cm de altura por 2,8 cm de diâmetro. O gel inchado e equilibrado com tampão ou salina 0,15M, foi montado por sedimentação sob a ação da gravidade. Após a completa sedimentação do gel, uma coluna homogênea se mostrou pronta para utilização em cromatografias de afinidade.

4.4 - Extração de Proteínas

As extrações protéicas das algas marinhas *A. ramossissima*, *G. córnea* e *M. echinocarpa* foram feitas em meio salino e/ou tamponante, em pH próximos à neutralidade. As amostras foram trituradas na presença de nitrogênio líquido e o homegenato deixado em contato com o meio extrator à temperatura ambiente até a centrifugação. Os extratos obtidos foram submetidos à tratamentos iniciais para eliminação de pigmentos, concentrados por liofilização parcial e submetidos à cromatografias de afinidade (Figuras 3, 4 e 5).

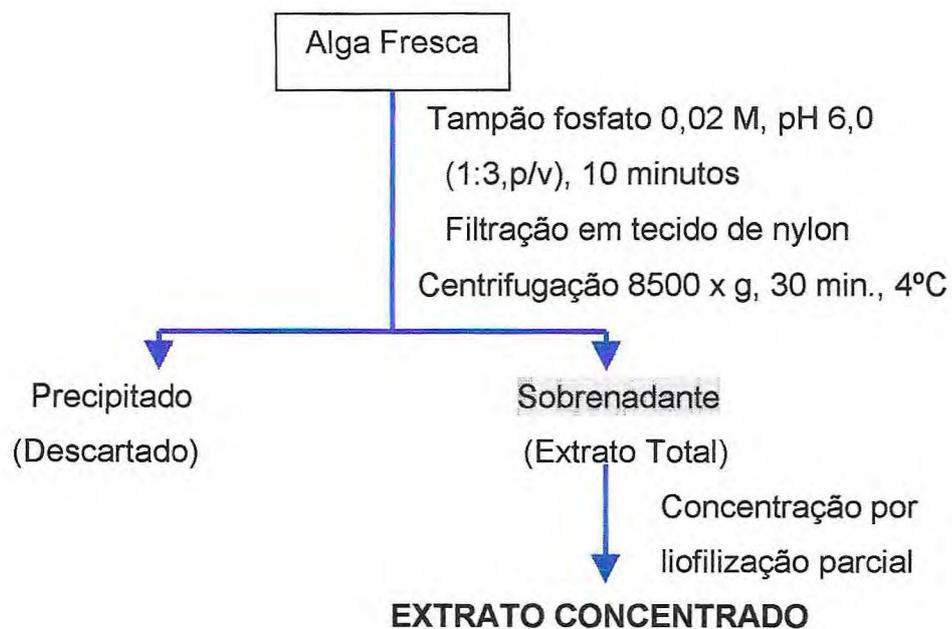


Figura 3: Esquema de Extração de Proteína da Alga *A. ramossissima*

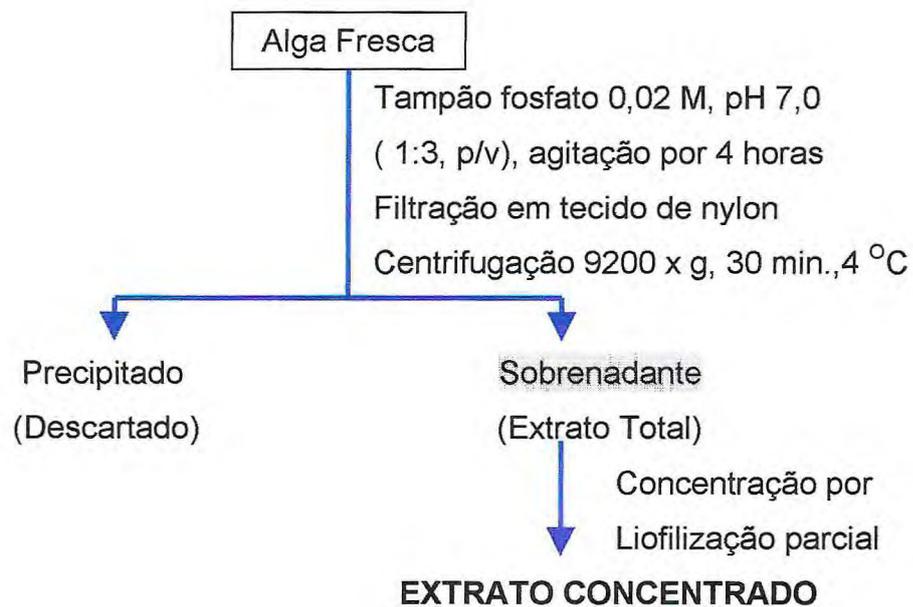


Figura 4 : Esquema de extração de proteínas da Alga *Gracilaria córnea*.

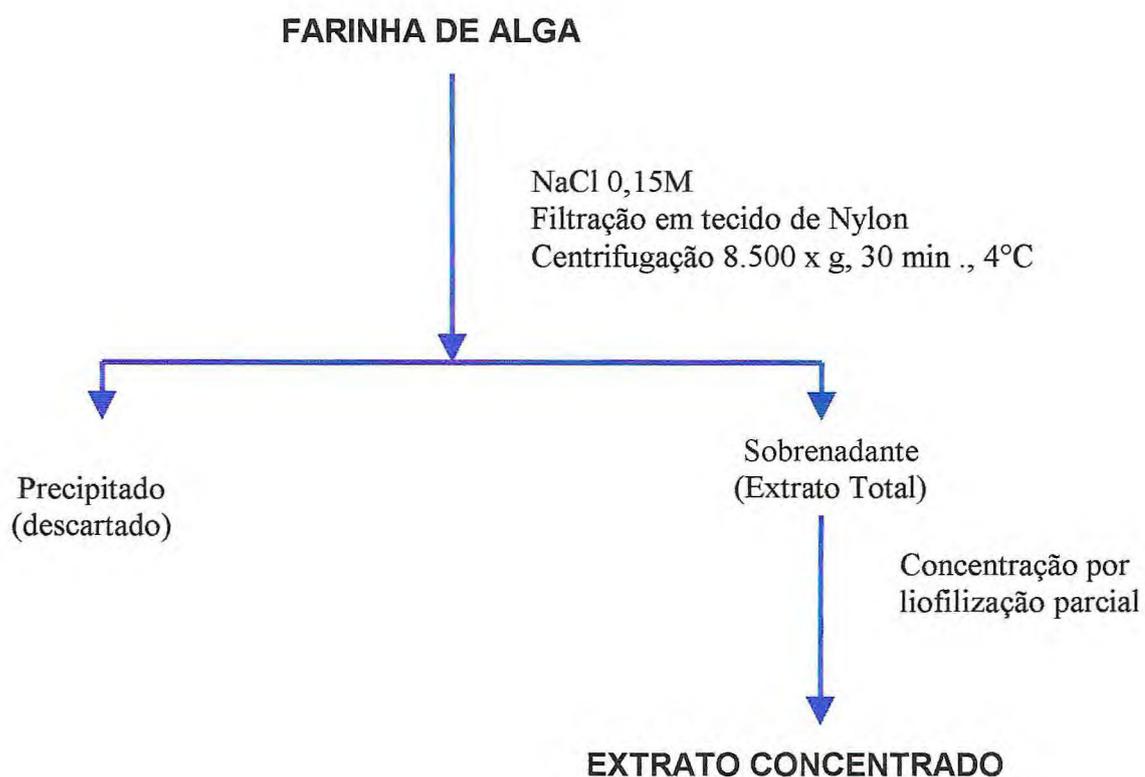


Figura 5 : Esquema de Extração de proteína de *Meristiella echinocarpa*

4.5 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada por diluições sucessivas (1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, etc.) em tubos de ensaio, com NaCl 0,15 M. A 200 μ l de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos e a mistura foi deixada em repouso por 60 minutos a 25° C. Após centrifugação à 2000 x g por 30 segundos, foi feita a leitura dos títulos. Uma unidade de hemaglutinação (UH/mL) foi definida como sendo o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda será capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%.

4.6 - Estudos de Inibição da Atividade Hemaglutinante

O extrato protéico de cada espécie em estudo, rico em atividade hemaglutinante, foi submetido ao ensaio de inibição desta atividade através de diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, ...) das soluções de açúcares simples na concentração de 0,1 M e glicoproteínas encerrando 5 mg/mL, em NaCl 0,15 M. Os tubos referentes ao ensaio permaneceram 60 minutos à 25°C, após este período, foram adicionados 400 μ l de suspensão de eritrócitos tripsinizados a 2%, deixados em repouso por 60 minutos à 25°C, centrifugado a 2000 x g por 30 segundos. A especificidade da lectina foi determinada de acordo com a inibição observada.

4.7 - Isolamento das Lectinas das Algas *Agardhiella ramossissima*, *Gracilaria cornea* e *Meristiella echinocarpa*.

Os extratos protéicos ricos em atividade hemaglutinante das algas estudadas, foram submetidos aos testes cromatográficos de afinidade em colunas preparadas a partir de polissacarídeos sulfatados reticulados de algas (gomas naturais modificadas).

4.7.1 - Cromatografia de Afinidade em coluna de polissacarídeos sulfatados reticulados de *Agardhiella ramossissima*

O extrato concentrado de *A. ramossissima*, foi aplicado à coluna e deixado em contato por 24 horas. A eluição inicial foi feita com o tampão de equilíbrio, e o pico retido foi eluído com NaOH 0,1 M. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 60 mL/h e as frações obtiveram um volume de 3 mL/ tubo e foram submetidas a determinação de sua absorbância a 280 nm. O pico adsorvido à coluna foi dialisado contra água destilada, e concentrado por parcial liofilização.

O sistema cromatográfico utilizado foi um coletor Pharmacia LKB - Frac - 100, acoplado a um registrador e bomba peristáltica tipo P₁.

4.7.2 - Cromatografia de Afinidade em coluna de polissacarídeos sulfatados reticulados de *Gracilaria cornea*

Os extratos concentrados de *Gracilaria cornea*, foram aplicados em coluna de polissacarídeos sulfatados reticulados de *G.cornea*, e deixado em contato por 24 horas. A eluição inicial foi feita com tampão de equilíbrio, e o pico retido foi eluído com NaOH 0,1 M. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 60mL/h e as frações obtiveram um volume de 3 mL / tubo e foram submetidas a determinação de sua absorbância a 280 nm. O pico adsorvido à coluna foi dialisado contra água destilada, e concentrado por parcial liofilização.

O sistema cromatográfico utilizado foi um coletor Pharmacia LKB - Frac - 100, acoplado a um registro e bomba peristáltica tipo P₁.

4.7.3 - Cromatografia de Afinidade em coluna de polissacarídeos sulfatados reticulados de *Meristiella echinocarpa*

O extrato concentrado de *Meristiella echinocarpa*., foi aplicado em coluna de polissacarídeos sulfatados reticulados de *M. echinocarpa*, e deixados em contato por 24 horas. . A eluição inicial foi feita a solução de equilíbrio, e o pico retido foi eluído com Galactose 0,4M. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 60mL/h e as

frações obtiveram um volume de 3 mL / tubo e foram submetidas a determinação de sua absorbância a 280 nm. O pico adsorvido à coluna foi dialisado contra água destilada, e concentrado por parcial liofilização.

O sistema cromatográfico utilizado foi um coletor Pharmacia LKB - Frac - 100, acoplado a um registro e bomba peristáltica tipo P₁.

4.8 - Eletroforese em PAGE - SDS

As corridas eletroforéticas foram feitas seguindo o método de LAMMELI (1970). Para a montagem das placas foi usado um gel de aplicação contendo 3,95% de acrilamida em tampão Tris - HCl 1 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5% de acrilamida em tampão Tris - HCl 1 M, pH 8,8. As amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos. Glicerol e azul de bromofenol a 0,05 % foram adicionados às amostras a fim de aumentar a densidade e permitir a visualização da frente de corrida, respectivamente.

Após a corrida, as proteínas foram visualizadas com nitrato de prata segundo a metodologia descrita por BLUM *et al.* (1987).

Proteínas de massas moleculares aparentes conhecidas, foram usadas como marcadores de peso molecular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Extração dos Carboidratos de Algas

As algas marinhas em estudo foram utilizadas para a extração de carboidratos sulfatados como mostrado na Figuras 1. A Tabela 4 apresenta um sumário mostrando o rendimento obtido dos carboidratos sulfatados das algas *Agardhiella ramossisima*, *Gracilaria cornea* e *Meristiella echinocarpa*.

TABELA 4 : Cálculo do Rendimento dos Carboidratos Sulfatados

ALGA	RENDIMENTO (%)
<i>Agardhiella ramossisima</i>	15,6
<i>Gracilaria cornea</i>	21,4
<i>Meristiella echinocarpa</i>	20,0

5. 2. Reticulação dos Carboidratos das algas *A. ramossisima* , *G. cornea* e *M. echinocarpa* pelo tratamento com Epicloridrina.

Os carboidratos sulfatados das algas *Agardhiella ramossisima*, *Gracilaria córnea* e *Meristiella echinocarpa*, apresentaram boa reticulação, seguindo-se a metodologia descrita por APPUKUTTAN *et al.* (1977). Neste experimento, para cada 0,5 g de goma, foi utilizado 1,5 mL de NaOH 3M e 0,15 mL de epicloridrina. De acordo com o método adotado para reticulação das gomas de algas, observamos que os géis mostraram-se homogêneos, com consistência adequada e boa capacidade de retenção de lectinas. Entretanto, novos testes da capacidade de retenção de lectinas deverão ser realizados, empregando-se novas matrizes, obtidas

por reticulação em diferentes concentrações de goma, NaOH e epícloridrina, tendo em vista que as concentrações de proteína aplicadas em todos os testes, não corresponderam à quantidade saturante de cada lectina.

5.3. Extração de Proteína e Determinação da Atividade Hemaglutinante.

Os resultados, indicaram que a faixa de pH neutro para a extração de proteínas das algas *A. famosíssima* e *G. córnea* são concordantes com dados fornecidos por outros autores, para o isolamento de hemaglutininas de algas marinhas (FABREGAS *et al.*, 1988; OKAMOTO *et al.*, 1990; AINOUIZ *et al.*, 1995). A atividade hemaglutinante presente nos extratos protéicos ou frações purificadas, foi detectada utilizando-se suspensões de eritrócitos a 2%, de coelho para *A. ramosíssima* e *Meristiella echinocarpa* e, de galinha para *G. córnea*, submetidas ao tratamento com tripsina.

O melhor meio de extração utilizado para a proteína de *M. echinocarpa* foi NaCl 0,15 segundo (FARIAS, 1995). A atividade hemaglutinante presente no extrato protéico foi detectada utilizando-se suspensões de eritrócitos de coelho a 2%, tratados com tripsina. Os valores dos títulos de hemaglutinação obtidos para *A. ramosíssima*, *G. córnea* e *M. echinocarpa* foram na ordem, 32, 16 e 128 UH.mL⁻¹, respectivamente.

5.4. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante no Extrato Total

A TABELA 5 apresenta os valores de concentrações mínimas de açúcares e glicoproteínas, capazes de inibir uma unidade de hemaglutinação. A atividade hemaglutinante no extrato total de *A. ramosíssima* foi fortemente inibida por D(+) rafinose, um oligossacarídeo formado por unidades de galactose, glicose e frutose, bastando que esteja presente na concentração mínima para inibição (CMI) de 1,56 mM. D(+) glucosamina hidrocloreídrica, D (+) glucosamina salina, D(-) celobiose e D(-) frutose também inibiram a atividade hemaglutinante, porém em concentrações mais elevadas (25 mM). Dentre as glicoproteínas testadas (avidina, ovalbumina, fetuína, manana de levedura e mucina), apenas avidina não foi capaz de inibir a

atividade hemaglutinante de *A. ramossissima*, entretanto, manana de levedura foi a glicoproteína mais potente, com CMI de $312,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os dados obtidos para os extratos de *G. córnea*, estão reunidos na TABELA 6. A atividade hemaglutinante não apresentou especificidade por nenhum dos açúcares simples testados, até a contração de 25 mM. Das glicoproteínas testadas (fetuína, mucina da glândula maxilar de boi, mucina do estômago de porco e ovalbumina), apenas mucina do estômago de porco não inibiu a atividade hemaglutinante de *G. córnea*, enquanto ovalbumina revelou-se o inibir mais potente (CMI= $312 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Como observado, as atividades presentes nos extratos de *A. ramossissima* e *G. córnea* foram igualmente inibidas por carboidratos sulfatados endógenos. Curiosamente, os polissacarídeos sulfatados da primeira espécie (**PS-*A. ramossissima***), inibiram a atividade hemaglutinante da segunda, além de causar inibição, quando presente na concentração mínima de $625 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em seu próprio extrato. O mesmo comportamento foi registrado para os polissacarídeos sulfatados de *G. córnea*, diferindo apenas quanto à concentração mínima requerida para inibir as atividades nos extratos. A concentração mínima para inibição (CMI) dos carboidratos de *G. córnea* (**PS-*G. córnea***) correspondeu a $1250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para ambas espécies.

A TABELA 7 apresenta os valores de concentração mínima de açúcares e glicoproteínas, capazes de inibir uma unidade de hemaglutinação. A atividade hemaglutinante no extrato total de *M. echinocarpa* não foi inibida por nenhum dos açúcares simples testados. Dentre as glicoproteínas testadas (fetuína, ovalbumina, mucina, manana de levedura), manana de levedura foi a glicoproteína mais potente, com CMI de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 5. Especificidade da Atividade Hemaglutinante presente no Extrato Total de *A. ramossissima*.

Açúcares	Concentração Mínima*(mM)
D(-) arabinose	N.I.
L(+) arabinose	N.I.
D(-) celobiose	25
D(-) frutose	25
D galactose	N.I.
D(+) glucosamina hidrocloreídrica	25
D(+) glucosamina saliana	25
Glucose	N.I.
Lactose	N.I.
D(+) manose	N.I.
N-acetil galactosamina	N.I.
N-acetil glucosamina	N.I.
D(+) rafinose	1,56
L(+) rhamnose	N.I.
D(+) xilose	N.I.

Glicoproteína	Concentração Mínima* (µg/mL)
Avidina	N.I.
Ovalbumina	1250,0
Fetuína	1250,0
Manana de levedura	312,5
Mucina de estômago de porco	625,0

Polissacarídeos sulfatados de algas	Concentração Mínima* (µg/mL)
PS Total <i>A. ramossissima</i>	625,0
PS Total <i>G. córnea</i>	1250,0

*Concentração mínima de inibidor ainda capaz de inibir a atividade hemaglutinante.

N.I.: Não inibiu até na concentração de 25 mM com os açúcares simples.

Não inibiu até na concentração de 1,25 mg/mL com as glicoproteínas

TABELA 6: Especificidade da Atividade Hemaglutinante presente no Extrato Total de *G. cornea*.

Açúcares	Concentração Mínima* (mM)
N-acetil-D-glucosamina	N.I.
N-acetil-galactosamina	N.I.
L(+) arabinose	N.I.
D-celobiose	N.I.
D(+) galactose	N.I.
D(+) glucosamina	N.I.
D(+) glucosamina hidrocloreídrica	N.I.
Glucose	N.I.
D(+) manose	N.I.
α -metil-D-glicopiranosídeo	N.I.
Rafinose	N.I.
D(+) rhamnose	N.I.
Salicina	N.I.
D(+) xilose	N.I.

Glicoproteínas	Concentração Mínima* (μg/mL)
Fetuína	625,0
Mucina de boi	625,0
Mucina de porco	N.I.
Ovalbumina	312,0

Polissacarídeos sulfatados de algas	Concentração Mínima*(μg/mL)
PS Total <i>A. ramossisima</i>	625,0
PS Total <i>G. córnea</i>	1250,0

*Concentração mínima de inibidor ainda capaz de inibir a atividade hemaglutinante.

N.I.: Não inibiu até na concentração de 25 mM com os açúcares simples.

Não inibiu até na concentração de 1,25 mg/mL com as glicoproteínas.

TABELA 7: Especificidade da Atividade Hemaglutinante presente no Extrato Total de *M. echinocarpa*.

Açúcares	Concentração Mínima* (mM)
N-acetil-D-glucosamina	N.I.
N-acetil-galactosamina	N.I.
L(+) arabinose	N.I.
D-celobiose	N.I.
D(+) galactose	N.I.
D(+) glucosamina	N.I.
D(+) glucosamina hidrocloreídrica	N.I.
Glucose	N.I.
D(+) manose	N.I.
metil-D-glicopiranosídeo	N.I.
Rafinose	N.I.
D(+) rhamnose	N.I.
Salicina	N.I.
D(+) xilose	N.I.

Glicoproteínas	Concentração Mínima* (µg/mL)
Fetuína	625,0
Mucina	156,0
Manana de levedura	0,3

Polissacarídeos sulfatados de algas	Concentração Mínima*(µg/mL)
PS de <i>A. ramossisima</i>	1250,0
PS de <i>M.echinocarpa</i>	625,0

*Concentração mínima de inibidor ainda capaz de inibir a atividade hemaglutinante.
 N.I.: Não inibiu até na concentração de 25 mM com os açúcares simples.
 Não inibiu até na concentração de 1,25 mg/mL com as glicoproteínas.

Os dados obtidos para os extratos de *A. ramossisima* estão reunidos na Tabela 5. A atividade hemaglutinante apresentou especificidade por alguns dos çúcares simples testados até uma concentração de 25mM como: D(-)celobiose 25mM; D(-) frutose 25mM; D(+)glucosamina hidrocloreídrica 25mM; D(+) glucosamina salina 25mM; D(+) rafinose 1,56 mM. Das glicoproteínas testadas mucina de porco foi a que revelou inibição mais potente CMI = 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os dados para *G. córnea*, estão reunidos na Tabela 6. A atividade hemaglutinante não apresentou especificidade por nenhum dos açúcares simples testados, até a concentração de 25 mM. Das glicoproteínas testadas, apenas muicina de porco não inibiu a atividade hemaglutinante de *G. córnea*, enquanto ovalbumina revelou-se o inibidor mais potente (CMI = 312 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A Tabela 7 mostra os dados de *M. echinocarpa*. A atividade hemaglutinante não apresentou especificidade por nenhum dos açúcares simples testados, até a concentração de 25mM. Das glicoproteínas testadas manana de levedura foi a que apresentou uma forte ação inibitória da atividade hemaglutinante (CMI = 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

As atividades presentes nos extratos de *A. ramossisima*, *G. córnea* e *M. echinocarpa* foram igualmente inibidas por carboidratos endógenos. Como observado, os polissacarídeos sulfatados de *A. ramossisima* foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante presente nos extratos de *A. ramossisima* e *G. córnea*, na concentração mínima de 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Uma CMI de 1250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observada para os polissacarídeos sulfatados de *G. cornea*, frente aos extratos de *A. ramossisima* e *G. cornea*. Os polissacarídeos sulfatados de *A. ramossisima* e *M. echinocarpa* mostraram uma CMI de 1250,0 e de 625,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *A. ramossisima* e *M. echinocarpa*, respectivamente.

5.5. Isolamento das Lectinas das Algas *A. ramosíssima*, *G. cornea* e *M. echinocarpa*.

5.5.1- Cromatografia de Afinidade do Extrato de *A. ramossisima* em Coluna de **PS** - *A. ramossisima*.

O extrato concentrado de *A. ramossisima* submetido à cromatografia de afinidade em coluna de **PS**-*A. ramossisima*, apresentou dois picos. O primeiro pico (PI), não retido à matriz, foi eluído com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 com NaCl 0,15 M. Este pico apresentou-se pigmentado e com pouca atividade hemaglutinante. O segundo pico (PII), retido à matriz, foi eluído com NaOH 0,1 M, e encerrou toda a atividade hemaglutinante (Figura 6). O PII, correspondendo a um rendimento protéico em torno de 0,7 %, apresentou uma purificação de 2,8 vezes com relação a atividade específica observada para o extrato total concentrado (Tabela 8)

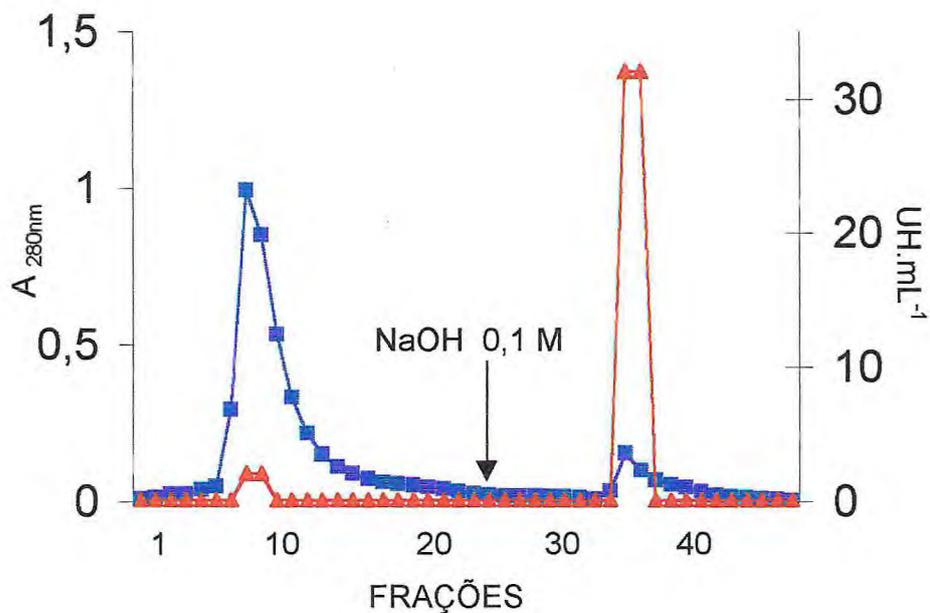


FIGURA 6 - Cromatografia de Afinidade do Extrato Concentrado de *A. ramossissima* em coluna de goma reticulada de **PS-A.ramossissima**, equilibrada e eluída inicialmente com tampão Fosfato 0,02 M, pH 7,0 com NaCl 0,15 M, seguido de eluição com NaOH 0,1 M. Volume da Coluna: 1,5 mL; Volume da Amostra: 4mL; Fluxo: 0,5 mL/min Frações: 3,0 mL/tubo.

— $A_{280\text{ nm}}$ — UH.mL⁻¹

5.5.2. Cromatografia de Afinidade do Extrato de *G. cornea* em Coluna de PS – *G. cornea* .

O extrato concentrado de *G. córnea* quando submetido à cromatografia de afinidade em coluna de **PS** - *G.cornea* , foi eluído em dois picos. O primeiro pico (PI), não retido, livre da atividade hemaglutinante e bem pigmentado, foi eluído com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 com NaCl 0,15 M. O segundo pico (PII), encerrando toda a atividade hemaglutinante, foi adsorvido da coluna pela passagem de NaOH 0,1 M (Figura 7). O PII, correspondendo a um rendimento protéico em torno de 0,06 %, apresentou uma purificação de 24,5 vezes com relação a atividade específica observada para o extrato total concentrado (Tabela 8)

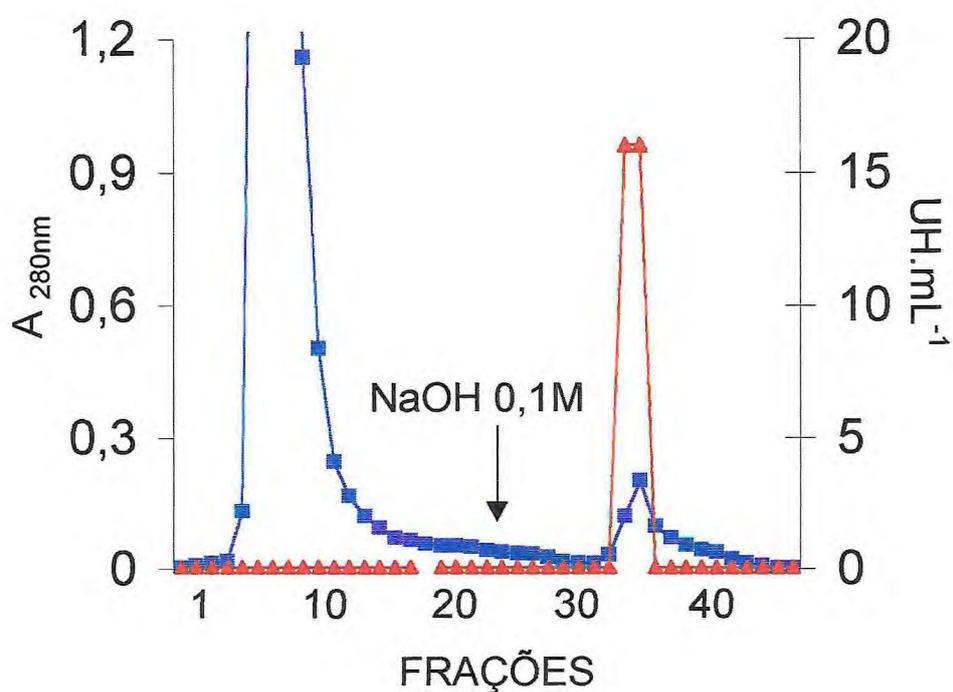


FIGURA 7. Cromatografia de Afinidade do Extrato Concentrado de *G. cornea* em coluna de Goma Reticulada de (PS-*G.cornea*) equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 com NaCl 0,15 M, eluída com o tampão de equilíbrio, seguida de NaOH 0,1 M. Volume da Coluna: 4,4 mL; Volume da Amostra: 4 mL; Fluxo: 0,5 mL/min; Frações: 3,0 mL/tubo.

— A_{280 nm} — UH.mL⁻¹

5.5.3. Cromatografia de Afinidade do Extrato de *M. echinocarpa* em Coluna de **PS** - *M.echinocarpa*.

O extrato concentrado de *M.echinocarpa* submetido à cromatografia de afinidade em coluna de goma reticulada de **PS**-*M.echinocarpa*, foi eluído em dois picos. O primeiro pico(PI), não retido à matriz, foi eluído com NaCl 0,15M, apresentando pigmentação e baixa atividade hemaglutinante. O segundo pico (PII), retido à matriz, foi eluído com uma solução de Galactose 0,4 M, e encerrava toda a atividade hemaglutinante (FIGURA 8). O pico retido, mostrou um rendimento protéico em torno de 6%, apresentando uma purificação de 2,5 vezes com relação a atividade específica observada para o extrato total concentrado (Tabela 8).

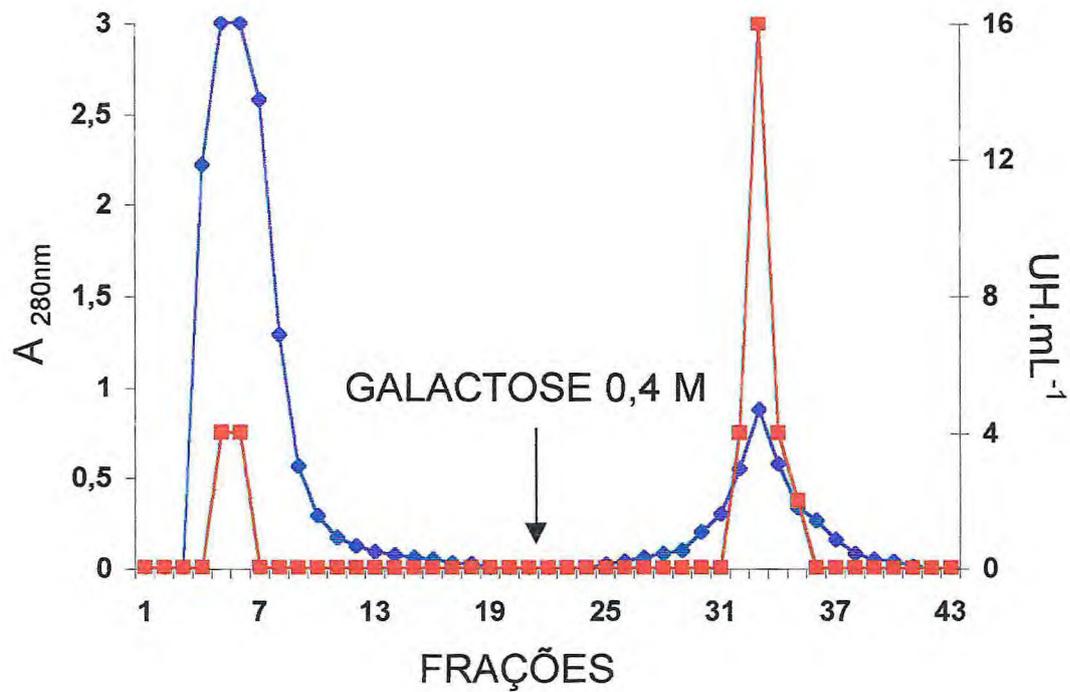


FIGURA 8. Cromatografia de afinidade do extrato concentrado de *M. echinocarpa* em coluna de goma reticulada de **PS- *M. echinocarpa***, equilibrada e eluída inicialmente com NaCl 0,15M, seguido de eluição com solução de Galactose 0,4M.

— $A_{280\text{ nm}}$ — UH.mL^{-1}

TABELA 8 .Purificação das Lectinas de *G.cornea* , *A .ramossisima* e *M. echinocarpa*

Alga	Fração	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Rendimento (%)	Atividade Hemaglutinante UH*Total	UH/mgP	Purificação	CMA** (µg)
<i>A . ramossisima</i>	Extrato concentrado	150	63,3	100,0	4800	75,8	1	13,2
	PII Afinidade	3	0,45	0,7	96	213,3	2,8	4,7
<i>G. cornea</i>	Extrato concentrado	220	1243,0	100,0	3520	2,8	1	353,1
	PII Afinidade	3	0,7	0,06	48	68,6	24,5	14,6
<i>M.echinocarpa</i>	Extrato concentrado	200	120	100,0	25600	213,3	1	4,6
	PII Afinidade	120	7,2	6	3840	533,3	2,5	1,9

* UH: Unidade de Hemaglutinação.

** CMA: Concentração mínima de proteína capaz de causar aglutinação.

5.6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e β - mercaptoetanol

As figuras 9 e 10, mostram os perfis eletroforéticos correspondentes ao PII de *A. ramossissima* e PII de *G. córnea*, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a presença de duas bandas protéicas, para as duas amostras, cujos dados de *A. ramossissima* apontaram bandas protéicas de 51 e 58 kDa, e para *G. córnea* as massas moleculares aparentes foram de 73 e 88 kDa.

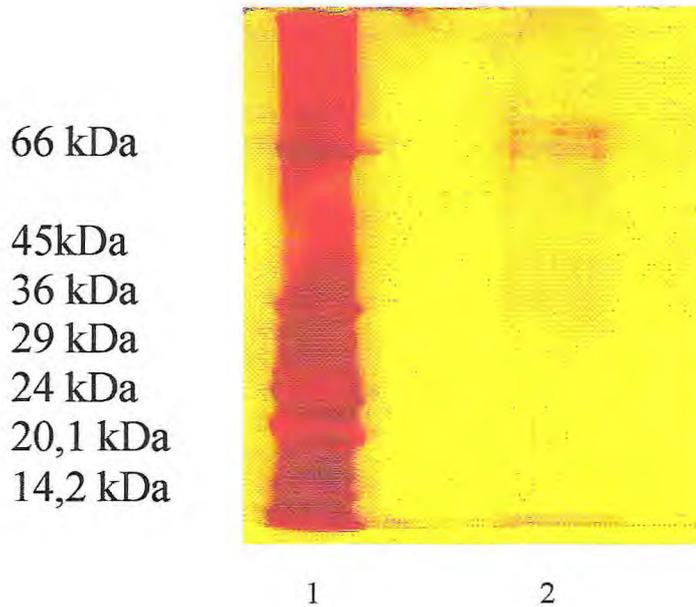


FIGURA 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β - mercaptoetanol do PII da cromatografia em coluna de CS -Gc , referente ao extrato concentrado de *Gracilaria cornea*.

1- marcadores de massa molecular albumina serica bovina, 66kDa; ovalbumina, 45kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbonica, 29kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; lactoalbumina, 14,2 kDa;

2- P II - CSs- *Gracilaria cornea*

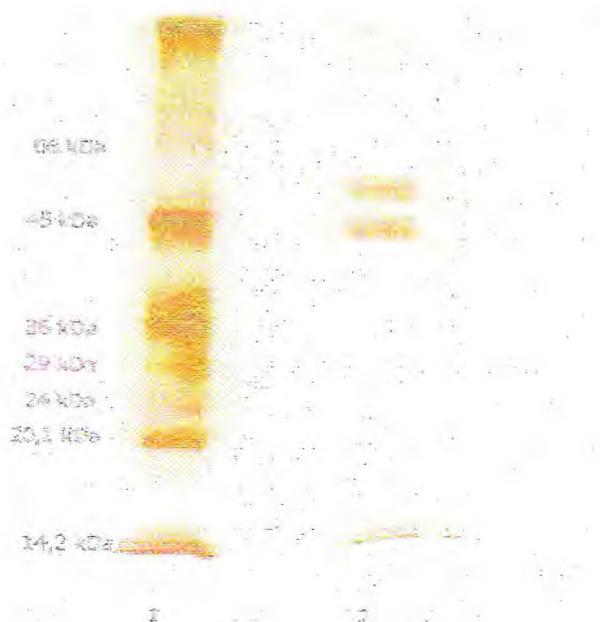


FIGURA 10 : Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol do PII da cromatografia em coluna de Polissacarídeo sulfatado, referente ao extrato concentrado de *Agardhiella ramossisima*.

- 1) Marcadores de massa molecular - albumina sérica bovina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase, 36kDa; anidrase carbônica, 29kDa; tripsinogênio, 24kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; lactoalbumina, 14,2 kDa.

- 2) PII *Agardhiella ramossisima*

6 – CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Agardhiella ramosissima*, *Gracilaria córnea* e *Meristiella echinocarpa*, quando reticulados com epicloridrina, nas condições empregadas no presente trabalho, mostraram-se eficientes no isolamento de lectinas endógenas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, A.L.P.; BENEVIDES, N.M.B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **R.Bras.Fisiol.Veg.7(1)**: 15-19, 1995.

AGRAWAL, B.B. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalina A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, **96**: 23-25, 1965.

APPUKUTTAN, P. S., SUROLIA, A. e BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J. Biochem. Biophys.**, **14**: 382-384, 1977.

BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., MONTEIRO, A. C. O. & FREITAS, A. L. P. Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v. 44, 2001.

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.

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

BLUM, H., BEIER, H. e GROSS, H. J. Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93 – 99, 1987.

BRITO, A.C.F. Composição e efeito de íons nas propriedades físico-química da goma exsudada da *Sterculia striata* (chichá). Dissertação de Mestrado apresentada ao

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, 81pp, Fortaleza, 2000.

BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. **Biochemical Journal**, **221**: 163-164, 1984.

CALVETE, J.J.; COSTA, F.H.F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M.P.M; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; BLOCH Jr. C.; SILVEIRA, S.B.; FREITAS, B.P.; SAMPAIO, A .H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marina algae *Bryothamionion triquetrum* defines a novel lectin struture. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.57, p.343-350, 2000.

CORREA, J.B.C. Métodos químicos para determinação de estrutura de polissacarídeos Notas de aula, 62p, 1971.

COSTA, F.H.F., **Purificação e Caracterização Parcial de uma lectina Mitogênica presente na Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* Lamouroux**. Fortaleza, 1995.112f. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

CHURMS, S.C.; STEPHEN, A .M.; STEYN, C.B. **Phytochemistry (Oxford)**, Kidlington, v.25, p.2807, 1986.

CUMMINGS, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In glyco-sciences, status and perspectives. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Chapter 10. **Published by Champman & Hall GmbH**, Weinheim, Germany, p. 191-199, 1997.

EHRlich, P. Experimentelle Untersuchungewr uber Immunitat II. Uber Ricin **Dtsch. Med. Wschr**, **17**, 1218-1219, citado port Gold & Balding, (1975), 1981b.

ETZLER, M.E. Plant lectins molecular and biological aspects. **Ann. Ver. Plant. Physiol.** **36**: 209-234, 1985.

FABREGAS, J., MUÑOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A. Purification and partial characterization of tomentine: an N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stackh. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **124**: 21-30, 1988.

FARIAS, W. R. L. Purificação, Caracterização Parcial e Atividade Biológica da lectina da Alga Marinha Vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 104 pp. Fortaleza, 1995.

FARIAS, W. R. L., VALENTE, A. P., PEREIRA, M. S. e MOURÃO, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275, nº 38, 29299 – 29307 pp, 2000.

FUJITA, Y., OISHI, K. SUZUKI, K. & IMAHORI, K. Purification and properties of an anti-B hemagglutinin produced by *Streptomyces sp.* **Biochemistry** **14**(20): 4465-4470, 1975.

HELLIN, H. Der giftig Eiweisskorper Abrin und dessen wirkung auf das Blut. Thesis, Dorpat, 1891. citado por Gold & Balding (1975)

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

HORI, K.; MATSUBARA, K.; KEISUKE, M. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red algae, *Hypnea japonica*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1474,p.226-236,2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227: 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. ; NELSON, D.L.; COX, M.M. Carboidratos In: Princípios de Bioquímica. 2. Ed. São Paulo: Savier.p.222-241, 1995.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Ver.**, **98**: 637-674, 1998.

LOVELESS, R. W. & ROGERS, D. J. Biochemical studies on the lectins from subspecies of *Codium fragile*. **Br. Phycol. J.** **20**: 188, 1985.

MOREIRA, R.A . MONTEIRO, A . C.O. HORTA, A . C. G. OLIVEIRA, J.T.A . & CAVADA, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. mergacarpa seed lectin **Phytochemistry**,**46** (1): 139-144, 1997.

MELO, M.R.S. **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE CARBOIDRATOS DAS ALGAS MARINHAS VERMELHAS *Agardhiella ramossissima* (Harv.) Kylin e *Gracilaria cornea* (J.agardh)**. Fortaleza, 2001. 102f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

NEVES, S.A . **Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento, caracterização parcial e estudo comparativo do seu efeito indutor de migração de neutrófilos, *in vivo in vitro*, com o de outras lectinas de algas marinhas**. Fortaleza, 1999. 104f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

NOWEL, P.C. Phytohemagglutinins as initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, **20**,462p., 1960.

OKAMOTA, 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.

OGAWA, M.; KOIKE, J. Manual de Pesca .1.ed.Fortaleza: Arte impressão Gráfica Batista: p.113-127, 1987.

PAULA, R. C. M. Characterisation of Braziliam Tree Exudate Gums from *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* B. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Química da Universidade de Manchester, 169 pp., Oxford Road, 1995

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense protein. **Plant Physiology**, **109**: 347-352, 1995.

ROGERS, D.J. & FANGLU, H. Lectins from *Codium* species. **Br. Phycol. J.** **26**: 95-96, 1991.

ROSA, I.G. **Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.: Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose.** Fortaleza, 2000. 114f. Dissertação de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. 126p. Chapman and Hall, London, 1989.

SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins. - a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, **4**: 3198-3207, 1990.

STILLMARK. **Über Rizin, ein Giftiges Ferment aus Samen Von *Ricinus Communis* L., und Einizen Anderen Euphorbianceen.**Tese de Doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), citado por Liener(1986), 1988.

STANLEY, N. In: STEPHEN, A..M. Food Polysaccharides and their Applications. Marcel Dekker. Inc. New York-USA, 1995.

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, 1987a.

VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A . K. & PEUMANS, W.J. Leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol**, **85**: 566-569, 1987b.

WHISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. Polysaccharides and Their Derivatives. In: **Industrial Gums**. New York: Academic Press, 3^a Gums.ed., 619p. 1993.

WHITTAKER, R.H. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science** **163**: 150-160, citado por Câmara (1994), 1969.