



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO ENGENHARIA DE PESCA

**CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Amansia*
multifida J. V. LAMOUREUX POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

SUZETE ROBERTA DA SILVA

FORTALEZA
2010

SUZETE ROBERTA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Amansia multifida* J. V. LAMOUROUX POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Trabalho supervisionado modalidade A (Monografia) submetida ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como parte da exigência para obtenção do título de Engenheira de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

**FORTALEZA
2010**

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)

- S583c Silva, Suzete Roberta da.
Caracterização da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux por espectrometria de massa / Suzete Roberta da Silva. – 2010.
56 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
1. Lectinas. 2. Espectrometria de massa. 3. *Amansia multifida*. I. Título.

CDD 639.2

SUZETE ROBERTA DA SILVA



CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Amansia multifida* J. V. LAMOUREUX POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Monografia submetida ao Departamento do curso de graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como parte da exigência para obtenção do título de Engenheira de Pesca.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por ter permitido que eu tivesse força, saúde e determinação para sempre lutar por meus objetivos mesmo em frente às condições mais adversas que encontrei pelo caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano por ter me dado a oportunidade de ingressar no BioMol-Lab, pela paciência e por me ajudar com seus ensinamentos, não somente para a produção desse trabalho, mas para a vida.

Ao professor Dr. Benildo de Sousa Cavada por permitir que eu realizasse esse trabalho no Biomol-Lab.

À professora Dra. Kyria Santiago, pelas dicas e ensinamentos, sendo sempre solícita, me ajudando, tirando minhas dúvidas.

Ao meu co-orientador MSc. Helton Colares da Silva que me ajudou muito na realização desse trabalho, me apoiando e puxando a minha orelha, quando necessário.

Ao professor Dr. Bruno Anderson por sempre ter ajudado, dando sugestões e esclarecendo muitas dúvidas que tive no decorrer do trabalho e pela participação na banca examinadora deste trabalho.

Ao professor Dr. Alexandre Holanda Sampaio pela ajuda nas coletas das algas, por tirar as dúvidas e pela participação na banca examinadora.

À professora Dra. Silvana Saker Sampaio pelo apoio durante o curso, pelos conselhos e amizade.

Aos amigos que fiz no Biomol-Lab Junior, Rafael, Ito, Eduardo, Mayron, Batista que eu sempre perturbei tanto e que sempre me ajudaram me ensinando química de proteínas e sempre me dando dicas para que eu tivesse sucesso em meus resultados.

Às minhas amigas do Biomol-Lab Raquel, Maria Júlia, Camila, Sâmia, Ana Cláudia, Kássia, Mayara e Ivandra.

Aos *meninos da graduação* que também foram sempre legais comigo no laboratório Alfa, Roniere, Guilherme, Rômulo, Rafael, Fernando.

À professora Dra. Sandra Tédde Santaella que me deu a oportunidade de iniciar na vida da pesquisa acadêmica.

Ao professor Dr. Marcelo Sá pelos ensinamentos dado a mim quando fui monitora da disciplina de Limnologia sendo orientada por ele.

À minha amiga Janaina Bernardo que me ajudou muito, me ensinando os passos para fazer o teste de toxicidade, sempre estando disponível para me ajudar.

Aos meus amigos do curso de francês André, Carol, Davi, Demetrius, Edilson, Igor, Jamil, Leo Lincoln, Marina, Tuane e Wolfgang por terem me aguentado quando estava estressada e pelos vários momentos de descontração, tornando a rotina bem mais feliz.

Ao amigo Pedro Filipe que foi um anjo, sempre me socorrendo nos momentos complicados durante o curso.

Ao Madson, que é meu amigo desde o primeiro dia de aula sempre estando do meu lado, sempre me apoiando e se preocupando comigo e dando força nos momentos difíceis.

Às minhas amigas Amanda Swelen e Júlia Nunes, amigas desde o primeiro dia de aula, que estiveram sempre juntas comigo, nas horas alegres, nas tristes, enfrentando as adversidades que encontramos pelo caminho.

À minha amiga Bruna Karoline que me apoiou mesmo quando estava longe.

Ao meu irmão Ailton que também contribuiu para que eu conseguisse essa vitória.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, da maneira deles. Se esforçando para me manter na universidade, segurando as pontas até hoje.

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

RESUMO

Lectinas são (glico) proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que podem se ligar de maneira específica e reversível a mono ou oligossacarídeos, capazes de aglutinar eritrócitos ou outras células não apresentando atividade enzimática contra os seus ligantes. São ubíquas sendo encontradas desde vírus e bactérias a plantas e animais. Em comparação aos estudos realizados com lectinas de plantas terrestres, poucas lectinas de macroalgas marinhas têm sido isoladas e caracterizadas, seguindo um ritmo lento devido à dificuldade de obtenção de material suficiente para estudo. Por outro lado, entre as lectinas caracterizadas os estudos têm mostrado proteínas com diferentes características bioquímicas. Estudos prévios mostraram que a lectina da *Amansia multifida* (AML) é uma proteína com alto potencial para biotecnologia. A AML foi purificada através de uma combinação de precipitação de proteínas com sulfato de amônio seguido por cromatografia de troca iônica. Os processos de purificação e a massa molecular aparente foram analisados por SDS-PAGE, a massa molecular aparente determinada foi de 29 kDa e a massa molecular determinada por espectrometria de massa da AML de 28.385 Da. A partir de peptídeos resultantes das digestões proteolíticas com tripsina e quimiotrisina, foram obtidas sequências parciais mediante espectrometria de massa sequencial. A AML tem elevada similaridade com a sequência da lectina de *Eucheuma serra* (79%). A avaliação da toxicidade de AML para *Artemia* sp. não foi evidenciada. Isso aponta para uma possível candidata para produção de medicamentos, tendo em vista que essa lectina possui atividades biológicas potenciais para farmacologia.

Palavras – chave: Lectinas. Espectrometria de massa. *Amansia multifida*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Representação esquemática da interação lectina – carboidrato na superfície celular.....	16
FIGURA 2	Representação esquemática de merolectinas (heveína – PDB: 1Q9B), hololectinas (Con Br – PDB: 1AZT), quimerolectinas (PPL-2 – PDB: 2GSJ) e superlectinas ainda não tem representantes com a sua estrutura tridimensional elucidada.....	17
FIGURA 3	Náuplio de <i>Artemia</i> sp.....	28
FIGURA 4	Protocolo de purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i> adaptado do protocolo descrito por Costa <i>et al.</i> , (1999). Em vermelho, os passos que foram modificados. Em azul, os passos iguais nos dois protocolos.....	35
FIGURA 5	Representação do teste de toxicidade agudo com náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	37
FIGURA 6	Perfil de eluição da Cromatografia de Troca Iônica em coluna com gel DEAE- Sephacel. A fração 0-70% equilibrada em Fosfato 20 mM pH 7,0 foi aplicada em uma coluna de DEAE-Sephacel (1,5 X 15,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A fração não retida foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração retidas foram eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de 1M de NaCl.....	40
FIGURA 7	Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE). 1- Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrase Carbonica 29 kDa, 20,1 kDa, Inibidor de Tripsina, α -lactoalbumina 14,4 kDa); 2- AML em condições não redutoras; 3- AML reduzida na presença de β -marcaptoetanol	41
FIGURA 8	Análise por Espectrometria de massa com ionização por Eletrospray. Espectro de Massa deconvolvido mostrando a massa da lectina da <i>Amansia multifida</i>	43
FIGURA 9	Alinhamento das seqüências de aminoácidos da lectina de <i>Eucheuma serra</i> (ESA, P84331.1) e peptídeos da lectina de <i>Amansia multifida</i> (AML). As seqüências em preto representam seqüências similares. Os peptídeos provenientes da digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q) estão representados entre parênteses.....	45
FIGURA 10	Análise estatística Teste T (< 0,05) com dados não pareados comparando as médias da concentração letal para 50% dos indivíduos expostos ao Extrato total e a Fração 0 – 70%, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre as CL ₅₀ obtidas no teste de toxicidade.....	46

LISTA DE TABELAS

1	Características da lectinas isoladas de algas marinhas.....	21
2	Atividades biológicas de lectinas de macroalgas marinhas	26
3	Tabela de purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>	41
4	Massas moleculares e sequência de aminoácidos dos peptídeos da lectina <i>Amansia multifida</i> oriundos da digestão com tripsina(T) e quimiotripsina (Q).....	44
5	Toxicidade para <i>Artemia</i> sp.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML	Lectina da alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>
BSL	Lectina da alga marinha vermelha <i>Bryothamnion seafortii</i>
BTL	Lectina da alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i>
CID	Dissociação induzida por colisão
CL₅₀	Concentração letal para 50 % dos indivíduos
DDA	Análise direta de dados
DEAE	Dietilaminoetil
ESA-2	Lectina da alga marinha vermelha <i>Eucheuma serra</i>
ESI	Ionização por Eletrospray
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio
ppm	Partes por milhão
Q-IMS-o-ToF	Quadrupolo Mobilidade Iônica Tempo de Vôo com aceleração ortogonal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
U.H.	Unidade Hemaglutinante
TFA	Ácido Trifluoroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Lectinas.....	13
1.1.1	Histórico.....	13
1.1.2	Definições.....	15
1.1.3	Ocorrência.....	17
1.2	Algas marinhas.....	18
1.2.1	Algas marinhas vermelhas.....	19
1.2.2	<i>Amansia multifida</i>	19
1.3	Lectinas de algas marinhas.....	19
1.4	Aplicações na biotecnologia.....	25
1.5	Caracterização estrutural de lectinas de macroalgas.....	27
1.6	Ensaio de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.....	28
1.6.1	Modelo biológico.....	28
1.6.2	Teste de toxicidade.....	29
1.6.3	Teste de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.....	29
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1	Algas marinhas.....	32
2.2	Purificação da lectina da <i>Amansia multifida</i>.....	32
2.2.1	Extração das proteínas.....	32
2.2.2	Fracionamento protéico do extrato total.....	32
2.2.3	Quantificação das proteínas.....	33
2.2.4	Atividade hemaglutinante.....	33
2.2.5	Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel.....	33
2.2.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.....	34
2.3	Caracterização por espectrometria de massa.....	35
2.3.1	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa.....	35
2.3.2	Sequenciamento por espectrometria de massa.....	36
2.4	Ensaio de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.....	37
2.4.1	Obtenção dos náuplios II.....	38
2.4.2	Teste de sensibilidade.....	38
2.4.3	Teste de toxicidade.....	38

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1	Purificação das lectinas da <i>Amansia multifida</i>.....	40
3.1.1	Cromatografia de troca iônica	40
3.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e estimativa das subunidades.....	41
3.2	Caracterização por espectrometria de massa.....	42
3.2.1	Determinação da massa molecular.....	42
3.2.2	Sequenciamento por espectrometria de massa.....	43
3.3	Teste de toxicidade.....	45
3.3.1	Teste de sensibilidade.....	45
3.3.2	Teste de toxicidade.....	45
4	CONCLUSÕES.....	47
5	PERSPECTIVAS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Histórico

A primeira descrição de uma lectina foi feita por Peter Hermann Stillmark no final do século XIX em sua tese de doutorado publicada na universidade de Tartu, atual Estônia, quando isolou uma hemaglutinina, com efeito tóxico, da semente da mamona (*Ricinus communis*), chamada por ele de ricina, capaz de aglutinar células do sangue humano e animal. Na mesma universidade, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina também tóxica no extrato de jeriquiti (*Abrus precatorius*), chamada de abrina (SHARON; LIS, 2004).

Essas hemaglutininas, ricina e abrina, foram empregadas como modelos de antígenos para estudos de imunologia e em 1890 Paul Ehrlich no Instituto Real de Terapia Experimental, estabeleceu vários dos princípios fundamentais da imunologia, como a especificidade de resposta de anticorpos, memória imunológica e a transferência da imunidade humoral de mãe para filho (SHARON; LIS, 2004).

O termo hemaglutinina foi sugerido pela primeira vez por Elfstrand em 1898, utilizando este termo para todas as proteínas de vegetais que aglutinassem células (VAN DAMME *et al.* 1998).

Em 1907, Landsteiner e Raubischeck observaram em estudos feitos com extratos de várias sementes a especificidade da atividade hemaglutinante em diferentes tipos sanguíneos e com isso corroboraram com Stillmark em seus primeiros resultados que falavam sobre a certa seletividade que a ricina tinha em aglutinar eritrócitos de diferentes grupos de animais (SHARON; LIS, 2004). Ainda em 1907, eles demonstraram pela primeira vez a presença de lectina não tóxica em sementes de leguminosas. Depois deles, muitos outros trabalhos demonstraram hemaglutininas com efeitos não-tóxico, e com isso, a idéia de lectinas de vegetais tenham efeito tóxico deixou de ser pregada (VAN DAMME *et al.* 1998).

James Sumner em 1919 obteve a primeira lectina pura isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*, a qual ele chamou de concanavalina A (ConA), porém, a primeira demonstração da especificidade desta lectina por açúcares foi feita em 1936 por Sumner e Howell, quando observaram que a hemaglutinação da concanavalina A foi inibida na presença de sacarose. Eles sugeriram que a hemaglutinação da ConA fosse consequência da reação das

proteínas vegetais com carboidratos na superfície celular de eritrócitos (SHARON; LIS, 2004).

Na década de 1940 Renkonen e Boyd descobriram que algumas hemaglutininas mostravam especificidade por células vermelhas de determinado tipo sanguíneo humano. Eles observaram que a atividade hemaglutinante era específica para os diferentes grupos do sistema ABO, onde os eritrócitos aglutinavam na presença de algumas aglutininas e outros não (VAN DAMME *et al.* 1998; SHARON; LIS, 2004).

Nowell em 1960 descobriu a capacidade da fitohemaglutinina (PHA) do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*) de estimular a mitose de linfócitos. A descoberta da atividade mitogênica desta lectina revolucionou os estudos sobre imunologia, já que se pensava, até então, que os linfócitos eram células incapazes de se dividir ou se diferenciar. Logo depois, vários estudos mostraram atividade mitogênica de outras lectinas, evidenciando que a atividade mitogênica resulta da ligação das lectinas a açúcares presentes na superfície celular dos linfócitos, mostrando seu papel biológico (SHARON; LIS, 2004).

A presença de hemaglutininas em animais foi observada cedo, porém, a maioria dos trabalhos era com invertebrados ou vertebrados inferiores e até meados de 1970 apenas três trabalhos foram publicados com hemaglutininas isoladas e caracterizadas dos seguintes animais: caranguejo-ferradura, caracol e com enguia (SHARON; LIS, 2004).

Embora o interesse nas lectinas fosse cada vez maior, apenas em 1966 que houve primeiro registro de lectina de algas, onde verificando a atividade hemaglutinante de extratos de algas marinhas utilizando eritrócitos humanos, Boyd e colaboradores observaram que 11 espécies apresentaram atividade hemaglutinante e que essa atividade não era específica aos grupos sanguíneos testados (BOYD *et al.*, 1966).

Em 1975 Blunden, Rogers e Farnham fizeram um trabalho com mais de 100 espécies de algas objetivando visualizar hemaglutininas em algas secas e trituradas, no entanto, somente 19 espécies apresentaram atividade hemaglutinante de maneira não específica em eritrócitos humanos dos grupos ABO. Eles também observaram se havia diferença entre o tipo de secagem das algas, natural ou em estufa, e concluíram que não havia diferença na atividade hemaglutinante em ambos os processos (BLUNDEN; ROGERS; FARNHAM, 1975).

Embora os trabalhos com lectinas de algas estivessem aumentando, no Brasil, somente em 1991 que se observaram aglutininas isoladas de algas marinhas, através de estudos feitos com espécies de algas marinhas coletadas no estado do Ceará (AINOUZ; SAMPAIO, 1991).



1.1.2 Definições

A primeira definição para lectina foi proposta por Boyd e Shapleigh em 1954. Eles usaram termo lectina do latim “*legere*”, que significa “selecionar” para classificar um grupo de proteínas isoladas de plantas superiores capazes de aglutinar células e/ou precipitarem polissacarídeos e glicoproteínas (SHARON; LIS, 2004).

Goldstein e colaboradores. (1980) definiram as lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. O termo “de origem não-imune” é devido a algumas lectinas estarem presentes no sistema imunológico, porém a síntese da lectina não se dá em resposta a um estímulo do mecanismo de defesa, o que as diferencia de enzimas e imunoglobulinas, além do que as lectinas podem ser isoladas de microrganismos que são desprovidos de sistema imunológico, como as bactérias (SHARON; LIS, 2004).

Após a combinação de muitas definições, Sampaio em sua tese de doutorado definiu lectinas como sendo, em geral, proteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados, sendo a atividade ligante reversível não covalente a carboidratos e substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície celulares, não alterando a estrutura covalente das ligações glicosídicas (SAMPAIO, 1997).

A definição mais utilizada até hoje é a proposta por Peumans e Van Damme que diz que lectinas ou aglutininas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que podem se ligar de maneira específica e reversível a mono ou oligossacarídeos, capazes de aglutinar eritrócitos ou outras células não apresentando atividade enzimática contra os seus ligantes. (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A Figura 1 mostra exemplos da interação entre uma lectina e um carboidrato.

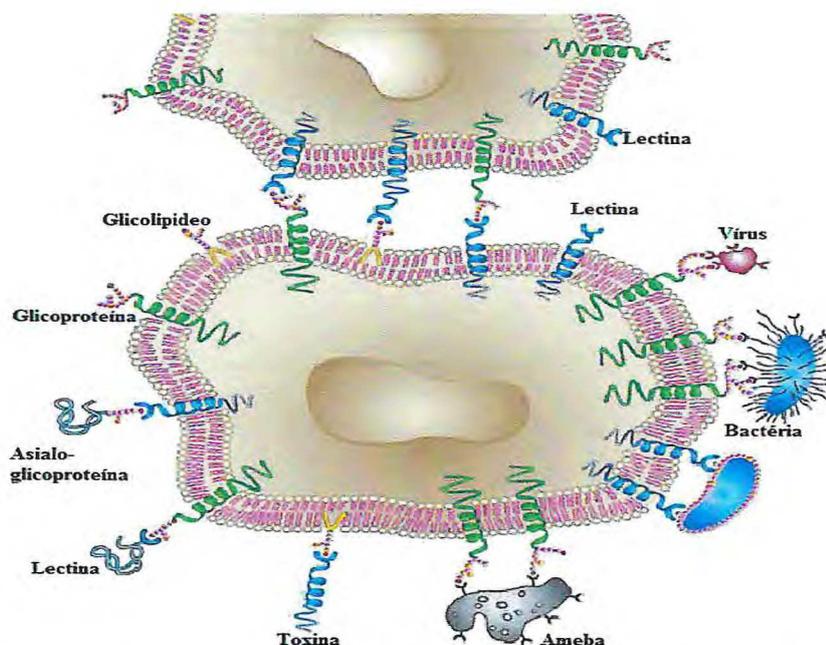


Figura 1. Representação esquemática da interação entre lectina-carboidrato na superfície celular (adaptado de SHARON, LIS, 2004).

Peumans e Van Damme (1995) ainda classificaram as lectinas quanto a sua estrutura dividindo-as em três grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (Figura 2). Merolectinas são proteínas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos, são pequenas e por ser monovalentes são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. As hololectinas representam o grupo de lectinas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos sendo idênticos ou muito homólogos. São, por definição, di ou polivalentes, portanto capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas conhecidas se comporta como hololectinas. As quimerolectinas são caracterizadas por possuírem, além do sítio de ligação a carboidratos, outro sítio de ligação que pode ter uma atividade catalítica bem definida, ou atividade biológica, atuando independentemente do sítio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas, podendo ou não apresentar atividade hemaglutinante. Van Damme e colaboradores (1998) sugeriram a introdução de mais um grupo de lectinas, as superlectinas (Figura 2). Como as hololectinas, as superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, no entanto reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. As superlectinas podem também ser consideradas como um grupo especial composto por duas quimerolectinas com domínios de ligação a carboidratos estruturalmente e funcionalmente diferentes.

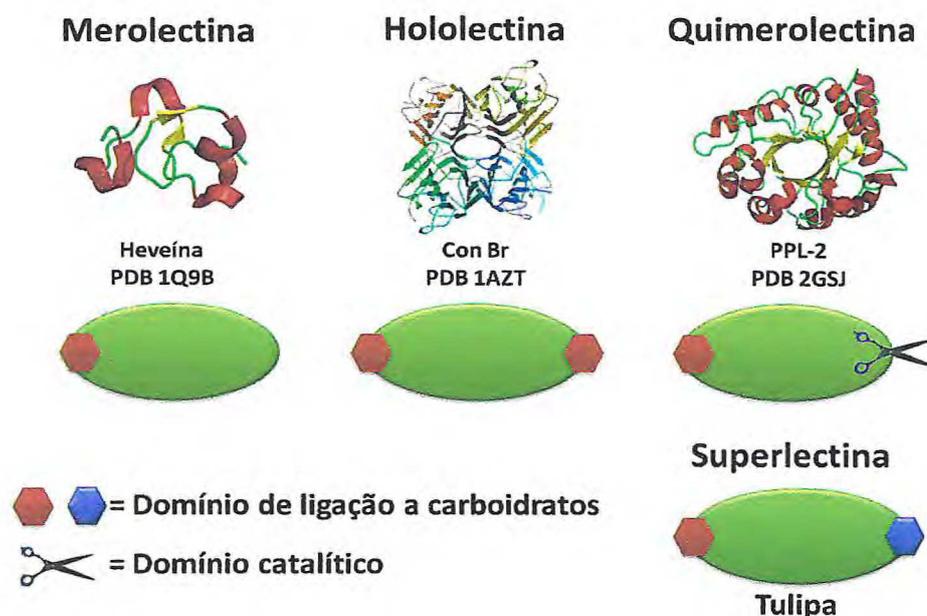


Figura 2. Representação esquemática de merolectinas (heveína – PDB: 1Q9B), hololectinas (Con Br – PDB: 1AZT), quimerolectinas (PPL-2 – PDB: 2GSJ) e superlectinas ainda não tem representantes com a sua estrutura tridimensional elucidada.

1.1.3 Ocorrência

As lectinas são ubíquas na natureza sendo encontradas na maioria dos organismos que vão desde vírus e bactérias a plantas e animais (LIS; SHARON, 1998). Lectinas foram isoladas de organismos como do coral *Gerardia savaglia* (BALZARINI, 2006), em cianobactéria *Oscillatoria agardhii* (SATO *et al.*, 2000), da microalga de água doce *Chlorella pyrenoidosa* (CHU; HUANG; LING, 2006), de anelídeo marinho *Serpula vermicularis* (MOLCHANOVA *et al.*, 2007); do bivalve marinho *Macoma birmanica* (ADHYA; SINGHA; CHATTERJEE, 2009), da hemolinfa do camarão *Fenneropenaeus merguensis* (RITTIDACH; PAIJIT; UTARABHAND, 2007), dos ovos do teleósteo *Tribolodon brandti* (JIMBO *et al.*, 2007), de insetos como da mosca doméstica *musca domestica* (CAO *et al.*, 2010), de frutos como a banana (SWANSON *et al.*, 2010) e também pode-se evidenciar lectinas diferentes isoladas do mesmo organismo como no pepino do mar (Echinodermata: Holoturoideae) *Cucumaria echinata*, onde quatro lectinas dependentes de cálcio foram isoladas e caracterizadas deste invertebrado marinho (HATAKEYAMA *et al.*, 1994).

Embora tenha aumentado o número de estudos de lectinas isoladas de diferentes organismos, a maioria dos estudos ainda se concentram em lectinas isoladas de sementes de plantas. Entretanto, elas não são restritas a sementes, podendo ser encontradas em folhas, caules e frutos (VAN DAMME; PEUMANS, 1990). Em plantas, as lectinas podem atuar contra micro-organismos fitopatogênicos e insetos, bem como contra animais herbívoros. Também se pressupõe que as lectinas estão envolvidas na relação simbiótica entre as plantas leguminosas e as bactérias fixadoras de nitrogênio (SHARON; LIS, 2004). Por outro lado, podem reagir com metabólitos secundários, servir como carreadoras de moléculas hidrofóbicas, como alguns hormônios vegetais, e podem estar envolvidas no processo de defesa da plântula durante a fase de maturação (DELATORRE, 2007).

1.2 Algas

Algas são organismos constituem um grupo bem heterogêneo de vegetais que podem ser procariontes ou eucariontes, uni ou pluricelulares (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). As macroalgas, algas pluricelulares, eucariontes e autótrofas, podem ser classificadas quanto à predominância de pigmentos fotossintéticos, Cyanobacteria (algas azuis), Chlorophyta (algas verdes), Rhodophycophyta (algas vermelhas), Heterokontophyta (algas pardas) (ALGAEBASE, 2010).

Na natureza, as algas estão amplamente distribuídas, sendo encontradas em ambientes marinhos, de água doce ou terrestre. São os maiores contribuintes para a produtividade dos ecossistemas, nos locais em que se desenvolvem, desempenhando papel ecológico comparável ao das plantas nos *habitats* terrestres. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As algas marinhas são a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por quase a metade da fotossíntese que acontece no planeta (DAY *et al.*, 1999) além de serem fontes ricas de compostos com alto potencial biotecnológico (CARDOSO *et al.*, 2007).

1.2.1 Algas marinhas vermelhas

Na divisão Rhodophyta soma-se mais de 6000 espécies, sendo a grande maioria marinha e apenas cerca de 200 espécies duciaquícolas, podendo crescer em rochas ou sobre outras algas (ALGAEBASE, 2010).

As algas vermelhas são fonte de ágar, um polissacarídeo sulfatado composto por moléculas de galactose e que é bastante utilizado na indústria alimentícia na fabricação de cremes, geléias, gelatinas, e farmacêutica sendo usados como dispersantes em drogas, emulsificantes. Além do Agar, algumas algas vermelhas também são ricas no polissacarídeo carragenana que é utilizada como agente gelificante, estabilizante, emulcificante (RIVIERS, 2006).

1.2.2 *Amansia multifida*

A alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux pertencente ao Filo Rhodophycophyta, Subfilo Eurhodophytina, Classe Florideophyceae, Subclasse Rhodymeniophycidae, Ordem Ceramiales, Família Rhodomelaceae, Tribo Amansieae, Gênero *Amansia*. Existem 43 espécie, porém atualmente apenas 12 estão aceitas taxonomicamente (AMANSIA multifida, 2010).

Essa alga ocorre em todo litoral sendo encontradas na região do meso-litoral, com modo de vida sésil, fixadas no substrato (DANTAS, *et al*, 2006).

1.3 Lectinas de macroalgas marinhas

Em comparação aos estudos realizados com lectinas de plantas terrestres, poucas lectinas de macroalgas têm sido isoladas e caracterizadas, seguindo um ritmo lento desde a primeira demonstração em 1966 por Boyd da atividade hemaglutinante em extratos de algas (Boyd 1966). Isto se deve, em parte, à dificuldade de se obter quantidade de lectinas que sejam suficientes para os estudos (ROGERS; HORI, 1993).

A grande maioria das lectinas de macroalgas são monoméricas com baixo peso molecular (ROGERS; HORI, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2002) e a atividade hemaglutinante da maioria destas lectinas é inibida por glicoproteínas e açúcares complexos. Espécies de macroalgas tais como *Bryothamnion seafortii* e *B triquetrum* (AINOUZ *et al.* 1995), *Amansia*

multifida (COSTA *et al.*, 1999), *Bryopsis hypnoides* (NIU *et al.*, 2009), *B. plumosa* (HAN *et al.*, 2010), *Tichocarpus crinitus* (MOLCHANOVA *et al.*, 2010) possuem lectinas que não dependem de cátions divalentes para expressar a atividade hemaglutinante, no entanto, outros trabalhos já exibiram que algumas algas, tanto vermelhas como a *P. filicina* (SAMPAIO, ROGERS; BARWELL, 1998b) e algas verdes, por exemplo, *U. lactuca* (SAMPAIO, ROGERS; BARWELL, 1998a) que dependem de cátions divalentes como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} .

Mesmo com o aumento significativo no número de trabalhos referentes à lectinas de macroalgas marinhas, as informações bioquímicas e estruturais são escassas, e as informações estruturais já existentes apontam uma grande variedade de famílias de lectinas nas diferentes espécies de macroalgas marinhas (CALVETE *et al.*, 2000), e entre essas espécies investigadas estão as algas verdes *Enteromorpha prolifera* (AMBROSIO *et al.*, 2003), *Ulva pertusa* (WANG *et al.*, 2004), *Ulva limnetica* (ISHIHARA; SHIMADA, 2009), *Bryopsis hypnoides* (NIU *et al.*, 2009), *B. plumosa* (HAN *et al.*, 2010a; HAN *et al.*, 2010b), as espécies de algas vermelhas *Ptilota filicina* (SAMPAIO *et al.*, 1998b), *P. serrata* (SAMPAIO *et al.*, 1999), *P. plumosa* (SAMPAIO *et al.*, 2002), *Eucheuma serra* (KAWAKUBO *et al.*, 1999; HORI *et al.*, 2007), *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000), *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 2000), *H. musciformis* (NAGANO *et al.*, 2005a; NAGANO *et al.*, 2005b), *H. cervicornis* (NAGANO *et al.*, 2005a, NASCIMENTO *et al.*, 2006), e *Griffithsia sp* (MORI *et al.*, 2005). Nenhuma dessas lectinas apresentou similaridade com lectinas de plantas terrestres, exceto a última que mostrou similaridade com a lectina de jaca (*Artocarpus integrifolia*).

Calvete e colaboradores (2000) sugeriram que a lectina de *B. triquetrum* (BTL) pertence a uma nova família de lectinas. Porém esta lectina possui sequência similar com as sequências das isolectinas HJA1 e HJA2 isoladas da alga *H. japonica* (HORI *et al.*, 2000). Por outra parte, foram relatadas diferenças estruturais entre lectinas das macroalgas marinhas vermelhas *H. cervicornis* e *H. musciformis* encontradas na costa do nordeste brasileiro e a lectina da alga *H. japonica* da costa do Japão, evidenciando que pode existir uma variedade de lectinas entre espécies do mesmo gênero que habitam ecossistemas distantes (NAGANO *et al.*, 2005b). Embora o número de trabalhos de caracterização estrutural de lectinas de macroalgas marinhas tenha aumentado, ainda há dificuldades na classificação funcional e filogenética destas proteínas, pois as informações existentes estão restritas a poucas espécies (NAGANO *et al.*, 2005a), sendo mais concentradas nas algas marinhas vermelhas. Na tabela 1 estão listadas as características bioquímicas das lectinas que foram isoladas de diversas espécies de algas marinhas.

Tabela 1. Características de lectinas isoladas de algas marinhas.

Espécies	Especificidade por grupo sanguíneo	Inibição por *		Masa molecular aparente (Da)		Subunidades	pI	Dependência de Cátions	Referências
		Monossacarídeo	Glicoproteína	Filtração em gel	SDS-PAGE				
Chlorophyceae									
<i>Boodlea coacta</i>	Não	S/I	manano	17.500	14-15.000	monômero	4,9	-	HORI <i>et al.</i> , 1986
<i>Bryopsis hypnoides</i>	Não	GlcNAc* GalNac	Msb	-	27.000	-	5 - 6	Não	NIU <i>et al.</i> , 2009
<i>B. plumosa</i>	Não	D-manose L-fucose	α -metil-D-manose	-	17.000	monômero	7,3	Não	HAN <i>et al.</i> , 2010A HAN <i>et al.</i> , 2010B
<i>Caulerpa cupressoides</i>	Não		mep	44.700	23.158	dímero	-	-	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2001.
<i>Codium adherens</i>	A ₁	GalNac	Mep fetuína	13.360 65.794	- 11.420	-	-	-	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>C. bursa</i>	Não	GalNac	NT	18.400	14.000	monômero	3,47	Não	ROGERS; FLANGU, 1991
<i>C. capitatum</i>	A ₁	GalNac	Mep fetuína	62.864	12132 13.024	-	-	-	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>C. effusum</i>	A ₁	GalNac	mep fetuína	13.983 86.472	- 11.668	-	-	-	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>C. fragile ssp atlaticum</i>	A ₁	GalNac	NT	60.000	15.000	tetrâmero	3,8	Não	LOVELESS; ROGERS, 1985
<i>C. fragile ssp. tomentosoides</i>	A ₁	GalNac	NT	60.000	15.000	tetrâmero	3,8	Não	LOVELESS; ROGERS, 1985
<i>C. giraffa</i>		GalNac GlcNAc	-	-	17.800	monômero	6.4	Não	ALVAREZ-HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 1999.
<i>C. platilobium</i>	-	GalNac	Mep fetuína	12.765 78.843	13.551 12.367	-	-	-	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>C. tomentosum</i>	-	GlcNAc	NT	-	16.000 15.000	-	4,01- 4,64	-	FABREGAS <i>et al.</i> , 1988
<i>Ulva lactuca</i>	Não	L-fucose	mep,msb,fucoidano	8.370	17.120	monômero		Sim	SAMPAIO <i>et al.</i> , 1998A

Espécies	Especificidade por grupo sanguíneo	Inibição por *		Masa molecular aparente (Da)		Subunidades	pI	Dependência de Cátions	Referências
		Monossacarídeo	Glicoproteína	Filtração em gel	SDS-PAGE				
Chlorophyceae									
<i>U. laetevirens</i>	Não	S/I	mep,msb,asialom sb, fucoidano	29.800	19.180	monômero		Sim	SAMPAIO, <i>et al.</i> , 1996
<i>U. pertusa</i>	Não	GlcNAc	Tiroglobulina	-	23.000	monômero		Sim	WANG <i>et al.</i> , 2004
<i>Enteromorpha prolifera</i>	-	L-fucose D-manose	manano fucoidano	60.000 ^a (EPL1) 59.500 ^a (EPL2)	22.000 20.000	homodímero homotetrâmero		Não Sim	AMBROSIO <i>et al.</i> , 2003
Rhodophyceae									
<i>Agardhiella tenera</i>	Não	S/I	NT	12.000	13.000	monômero	6,1	Não	SHIOMI <i>et al.</i> , 1979
<i>Amansia multifida</i>	Não	S/I	avidina	26.900	24.500	monômero	5,45- 6,25	Não	COSTA <i>et al.</i> , 1999
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Não	S/I	fetuína. mep avidina	4.500	-	monômero	-	Não	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
<i>B. triquetrum</i>	Não	S/I	fetuína. mep avidina	3.500	-	monômero	-	Não	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995 CALVETE <i>et al.</i> , 2000
<i>Carpopeltis flabellata</i>	Não	S/I	manana	25.000	25.000	monômero	6,6-6,8	-	HORI <i>et al.</i> , 1987
<i>Cystoclonium purpureum</i>	Não	S/I	NE	12.500	6.000	dímero	5,6	Não	KAMIYA <i>et al.</i> , 1980
<i>Enatiocladia duperreyii</i>	Não	GalNAc rafinose	mucina porcina	24.700	16.072	dímero	-	Sim	BENEVIDES <i>et al.</i> , 1998
<i>Eucheuma amakusaensis</i>	Não	S/I	tiroglobulina	25.000	29.000	monômero		Não	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1999
<i>E. cottonii</i>	Não	S/I						Não	
<i>E. serra</i>	Não	S/I	manana tiroglobulina	25.000	29.000	monômero	4,75- 4,95	Não	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1997
<i>Georgiella confluens</i>	galinha	S/I	Mep, fetuína	25.500	21.500	monômero	-	Não	SOUSA <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	-	S/I	ovalbumina	15.500	30.000	monômero	4,7	-	OKAMOTO <i>et al.</i> , 1990
<i>G. cornea</i>	galinha	S/I	Fetuína, mep	66.000	57.000	monômero	4.3	Não	LIMA <i>et al.</i> , 2005

Espécies	Especificidade por grupo sanguíneo	Inibição por *		Masa molecular aparente (Da)		Subunidades	pI	Dependência de Cátions	Referências
		Monossacarídeo	Glicoproteína	Filtração em gel	SDS-PAGE				
Rhodophyceae									
<i>G. ornata</i>	Não	S/I	Mep, lactotransferrina, asialofetúina, tiroglobulina	17.400	17.000	monômero	5,4		LEITE <i>et al.</i> , 2005
<i>G. tikvahiae</i>	Não	NeuNAc	lactoferrina inibidor tripsina fetúina	150.000	29.700 24.900	-	-	-	CHILES; BIRD 1990 DALTON <i>et al.</i> , 1995
<i>G. verrucosa</i>	Não	S/I	NT	41.000	10.500 12.000	tetrâmero	4,8	-	SHIOMI <i>et al.</i> , 1981
<i>Griffithsia sp</i>	NT	Glu/Man	NT	26.000	13.000	dímero	-	-	MORI <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypnea cervicornis</i>	Não	S/I	mep	-	9.000	monômero	-	Não	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006
<i>Hypnea musciformis</i>	Não	S/I	NT	11.000	9.000	monômero	-	Não	NAGANO <i>et al.</i> , 2002
<i>Hypnea japonica</i>	Não	S/I	asialofetúina asialo-transferrina	4.200	4.200	monômero	4,3	Não	HORI <i>et al.</i> , 1986 HORI <i>et al.</i> , 1990 HORI <i>et al.</i> , 2000
				8.400	4.200	dímero	ND		
				8.400	4.200	dímero	ND		
				12.000	12.000	monômero	ND		
<i>Palmaria palmata</i>	Não	NeuNAc	NE	43.000	20000	dímero	4,6	Não	KAMIYA <i>et al.</i> , 1982
<i>Plumaria elegans</i>	Não	S/I	mep msb fetuina ovalbumina	18.500	-	-	-		ROGERS <i>et al.</i> , 1990
				35.000					
<i>Ptilota plumosa</i>	B	pnp- α -D-galactosídeo	NT	65.000 170.000	65.500 163.000	-	-		ROGERS <i>et al.</i> , 1977
<i>P. plumosa</i>	B	pnp- α -D-galactosídeo glicose	S/I	52.540	17.440	trímero		Sim	SAMPAIO <i>et al.</i> , 2002

Espécies	Especificidade por grupo sanguíneo	Inibição por *		Masa molecular aparente (Da)		Subunidades	pI	Dependência de Cátions	Referências
		Monossacarídeo	Glicoproteína	Filtração em gel	SDS-PAGE				
Rodophyceae									
<i>P. serrata</i>	-	GalNAc lactose	mep msb	64.500	-	-	-	Sim	ROGERS <i>et al.</i> , 1990
<i>P. serrata</i>	Não	NPNAcGal	mep. amsb. asialofetuin	55.470	18.390	trímero		Sim	SAMPAIO <i>et al.</i> , 1999
<i>P. filicina</i>	Não	NPNAcGal	mep. amsb. Msb	56.900	19.320	trímero		Sim	SAMPAIO <i>et al.</i> , 1998b
<i>Solieria robusta</i>	-	S/I	manano	23.000	29.000	monômero	4,3	Não	HORI <i>et al.</i> , 1988
<i>S. filiformis</i>	Não	S/I	manano avidina. ovalbumina	21.900	29.000	monômero		Não	BENEVIDES <i>et al.</i> , 1996
<i>Vidalia obtusiloba</i>	O	GalNAc, α -lactose, D-galactose, D-galactosamina	mep	78.900	59.600 15.200	dímero	4 - 5	Sim	MELO <i>et al.</i> , 2004
<i>Tichocarpus crinitus</i>	Não	não	Mep	41.000		monômero	4,93	Não	MOLCHANOVA. <i>et al.</i> , 2010
Phaeophyceae									
<i>Fucus vesiculosus</i>	-	S/I	Msb, fetuína, tiroglobina	2x10 ⁶	-	monômero	3.2	-	FERREIROS; CRIADO, 1983

NT=Não testado; S/I=Sem inibição; ND= Não determinado; *=inibidor principal; - = Sem informação; msb = mucina submaxilar bovina; mep = mucina de estômago porcino; NeuNAc = ácido neurâmico; GlcNAc = N-acetil-glicosamina; GalNAc = N-acetil-galactosamina; pnp = ρ -Nitrofenil; fucoidano = polissacarídeo composto de fucoses sulfatadas; NPNAcGal = Nitrofenil-N-acetil-galactose. amsb = asialomucina da glândula submaxilar bovina ^aDeterminado mediante equilíbrio de sedimentação. Atualizado de NAGANO (2007)

1.4 Aplicações na biotecnologia

Por possuírem sítios específicos de ligação aos carboidratos, as lectinas são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações entre moléculas, células e organismos. Além disso, podem substituir os ligantes naturais e ativar as células, através das diferentes vias de sinalização intracelular (SELL; COSTA, 2000).

As lectinas podem ser utilizadas para identificação de grupos sanguíneos humanos, por possuírem especificidade no reconhecimento dos antígenos dos grupos A, B e O (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Algumas lectinas de plantas podem, de maneira indireta, ter ação antiviral, por exemplo, a presença de lectinas inseticidas pode inibir e /ou diminuir a disseminação de insetos e indiretamente doenças de transmissão viral. (PEUMANS; VAN DAMME, 1995)

As presenças de hemaglutininas em algas marinhas podem ser utilizadas como potenciais ferramentas para diferenciação de espécies em estudos de quimiotaxonomia, além de ter outras aplicações na biotecnologia e farmacologia, aliado-as a características bioquímicas e morfológicas (SAMPAIO *et al.*, 1993).

Lectinas de algas marinhas são especialmente interessantes para aplicação biológica, pois, em comparação com as lectinas de plantas superiores, são moléculas menores, assim induzem menor imunogenicidade, além de possuírem maior estabilidade química e térmica e devido à alta seletividade para carboidratos complexos e glicoconjugados presentes na superfície celular.

Algumas atividades biológicas de lectinas de algas estão listadas na tabela 2 evidenciando as diversas aplicações dessas moléculas na biotecnologia. Além disso, esses estudos mostram que as lectinas de algas possuem grande potencial na farmacologia e biotecnologia.

Tabela 2. Atividades biológicas de lectinas de macroalgas marinhas.

Aplicação biológica	Referência
Atividade Antibiótica	
<i>Eucheuma serra</i>	LIAO <i>et al.</i> , 2003
<i>Galaxaura marginata</i>	SILVA <i>et al.</i> , 2010
<i>Pterocladia capillacea</i>	HOLANDA <i>et al.</i> , 2005
<i>Solieria filiformis</i>	
Atividade anti - HIV	
<i>Griffithsia sp</i>	MORI <i>et al.</i> , 2005; BALZARINI, 2006
Atividade anti-inflamatória	
<i>Amansia multifida</i>	NEVES <i>et al.</i> , 2007
<i>Caulerpa cupressoides</i>	VANDERLEI <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypnea cervicornis</i>	BITENCOURT <i>et al.</i> , 2008
Atividade antinociceptiva	
<i>Amansia multifida</i>	NEVES <i>et al.</i> , 2007
<i>Bryotamnion seafortii</i>	VIANA <i>et al.</i> , 2002; VIEIRA <i>et al.</i> , 2004
<i>B. triquetrum</i>	
<i>Caulerpa cupressoides</i>	VANDERLEI <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypnea cervicornis</i>	BITENCOURT <i>et al.</i> , 2008
<i>Pterocladia capillacea</i>	SILVA <i>et al.</i> , 2010
Atividade inseticida	
<i>Gracilaria ornata</i>	LEITE <i>et al.</i> , 2005
Atividade mitogênica para linfócitos de ratos	
<i>Eucheuma serra</i>	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1997
Indução da morte celular de células cancerígenas	
<i>Eucheuma serra</i>	SUGAHARA <i>et al.</i> , 2001
Indução da migração de neutrófilos	
<i>Amansia multifida</i>	
<i>Bryotamnion seafortii</i>	NEVES <i>et al.</i> , 2001
<i>B. triquetrum</i>	
<i>Gracilaria caudata</i>	
<i>Hypnea cervicornis</i>	FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2010
Inibição da formação de biofilme	
<i>Bryotamnion seafortii</i>	
<i>B. triquetrum</i>	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2010
Liberação de óxido nítrico	
<i>Bryothamnion seafortii</i>	LIMA, R. F. <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypnea cervicornis</i>	FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2010
Reconhecimento de células cancerígenas	
<i>Bryotamnion seafortii</i>	
<i>B. triquetrum</i>	PINTO <i>et al.</i> , 2009
Regulador de resposta imunológica	
<i>Amansia multifida</i>	LIMA <i>et al.</i> , 1998

1.5 Caracterização estrutural de lectinas macroalgas marinhas

Há pouco mais de uma década, para se fazer estudos de caracterização estrutural era preciso de uma quantidade substancial de proteína, pois o método utilizado para se obter a sequência primária era a degradação de Edman (STEEN; MANN, 2004). Este método desenvolvido por Peter Edman além de requerer uma grande quantidade de proteína com alto grau de pureza, também é necessário que haja resíduos amino-terminal livre para que ocorra a reação de Edman, por isso geralmente havia falhas no sequenciamento de aminoácidos por causa de bloqueios do resíduo amino-terminal ou por falha na purificação da proteína. Para lectinas de algas a dificuldade era maior, pois o rendimento na purificação dessas proteínas é baixo (NAGANO *et al.*, 2005a).

Com o desenvolvimento e a introdução de técnicas amenas de ionização, como a eletronebulização (ElectroSpray Ionization ou ESI) (FENN *et al.*, 1989) e a dessorção a laser assistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (HILLENKAMP *et al.*, 1991), estudos objetos de prêmio Nobel em química em 2002, tornou-se possível analisar biomoléculas de vários tamanhos moleculares, incluindo peptídeos e proteínas e impulsionaram a análise de proteínas através de espectrometria de massa.

Durante a década de 1990 a espectrometria de massa passou a complementar a degradação de Edman na caracterização estrutural de proteínas. Neste método, as biomoléculas são ionizadas e sua massa molecular é medida. A molécula carregada (ion) tem a sua razão massa/carga (m/z) medida de acordo com a sua trajetória em um campo elétrico em sistema de vácuo. De modo simplificado, um espectrômetro de massa é basicamente dividido em três partes, sendo: 1) fonte de ionização, 2) analisador e 3) detector. Este método é muito mais sensível (fmol x pmol) e rápido em relação à degradação de Edman (STEEN; MANN, 2004).

Para caracterização de lectinas de algas, são necessárias técnicas analíticas muito sensíveis e com o desenvolvimento da espectrometria de massa surgiu uma nova e potencial abordagem para se determinar estruturas primárias de lectinas de macroalgas marinhas.

1.6 Ensaios de toxicidade com *Artemia* sp.

1.6.1 Modelo biológico

Artemia sp. (Figura 3) é um microcústáceo pertencente ao filo Artropoda, classe Crustacea, subclasse Branchiopoda, ordem Anostrocata, família Artemidae e gênero *Artemia* (LEACH, 1819). A artêmia possui duas estratégias reprodutivas, sendo uma sexualmente e a outra através de partenogênese com formação de cistos resistentes (NUNES *et al.*, 2006), sendo a segunda estratégia a que facilita a dispersão e favorecendo a sua ampla distribuição entre os continentes, tornado essa espécie cosmopolita.

Seu habitat natural são lagos de águas salgadas e salinas, este organismo é adaptado para a sobrevivência em águas que sofrem grandes variações de salinidade e oxigênio dissolvido e se alimentam por filtração, sendo o filtro não-seletivo, o que permite maior interação com meio.

As artêmias são de fácil aquisição, cultivo e manutenção em laboratório e ainda são sensíveis a várias classes de contaminantes. Esses fatores descritos fazem da artêmia um organismo muito utilizado e bem difundido em ensaios de toxicidade (VEIGA; VITAL, 2002; NUNES *et al.*, 2006).



Figura 3. Náuplio de *Artemia* sp.

1.6.2 Teste de toxicidade

Há três tipos de sistema para realizar testes de toxicidade que são estático, semi-estático e de fluxo contínuo. O mais utilizado para teste de toxicidade agudo são os sistemas de teste estático, que consiste em não haver troca da solução-teste no período em que os organismos ficam em contato com a solução. Este sistema é recomendado para testes com substâncias estáveis, quando o teste é feito tendo período curto de exposição dos organismos à solução-teste, ou quando a espécie utilizada possui tamanho reduzido, impossibilitando o uso do fluxo contínuo, por provável perda (mortalidade e/ou escape) dos organismos na renovação da solução (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O teste de toxicidade aguda avalia os efeitos rápidos sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em curto período de tempo, geralmente de 24 à 96 horas. Por conta da facilidade de execução, rapidez e por ser relativamente barato, os testes de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, por esse motivo, constituem a base de dados ecotoxicológicos. Nestes ensaios geralmente são avaliados a mortalidade ou a efetividade que pode verificar imobilidade ou algum tipo de comportamento apresentado pelos organismos (BIRGE; BLACK; WESTERMAN, 1985). Em geral, procura-se fazer uma estimativa da concentração-teste que cause efeito a mortalidade de 50 % da população exposta, durante um período de tempo determinado. Tal concentração corresponde à CE (Concentração Efetiva) ou CL₅₀ (Concentração Letal Mediana), obtidas a partir de dados quantais, como número de vivos e de mortos (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004). A fase de náuplio II é utilizada nos testes de toxicidade, pois nesta fase os indivíduos já se alimentam do meio, o que não ocorre com os náuplios na fase I que possuem reserva de vitelo, sendo assim, mais resistentes aos testes e não mostrando dados precisos (VEIGA; VITAL, 2002).

1.6.3 Teste de toxicidade com *Artemia* sp.

O início da utilização de testes de toxicidade no Brasil foi pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), por volta da década de 80. Em 1985 o Centro de Pesquisas e Desenvolvimento (CENPES) da PETROBRAS começou a usar *Artemia* sp. na avaliação da toxicidade de produtos derivados do petróleo e efluentes da indústria do petróleo. Após outras pesquisas avaliando a toxicidade

de produtos dispersantes de óleos, viram que a artêmia é capaz de diferenciar marcas de dispersantes comerciais quanto ao nível de toxicidade e por isso em 1992 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) definiu que os fabricantes desses produtos só receberiam registro, se apresentassem laudo de avaliação de toxicidade de seus produtos contra *Artemia* sp.. Além disso, o teste de avaliação de toxicidade, podem ser utilizados para classificação e ordenação quanto nível de toxicidade, permitindo selecionar entre produtos os que possuem menor toxicidade que tenham a mesma finalidade (VEIGA;VITAL, 2002).

Considerando a facilidade de aquisição dos cistos, implantação do teste, rapidez e baixo custo, a artêmia se enquadra como ótima opção para avaliação preliminar da amostra, como parte integrante de um conjunto de avaliações com outros organismos de outros níveis tróficos, ou se não houver possibilidade de se utilizar outros organismos em testes de toxicidade (VEIGA; VITAL, 2002).

Por causa da suas características intrínsecas, a artêmia se torna um bom modelo biológico para testes de toxicidade sendo utilizada em avaliação de toxicidade de diferentes substâncias, não somente de efluentes industriais (PIMENTEL *et al.*, 2009), mas também de extratos de plantas como, extratos de raízes e caules de *Terminalia brownii*, uma planta comumente usada na África por curandeiros para doenças relacionadas ao trato digestório (MBWAMBO *et al.*, 2007), extratos da folha de *Euphorbia conspicua* (Euphorbiaceae) (SANTOS *et al.*, 2007), extratos de nim utilizados na medicina, cosmética e agricultura (BEVILACQUA; SUFFREDINI; BERNARDI, 2008), extratos de folhas de *Cassia grandis* (Leguminoaseae) (AWAL; ASHRAFUZZAMAN; HAQUE, 2009), extratos de diatomáceas (CALDWELL; BENTLEY;OLIVE, 2003), aldeídos extraídos de algas (TAYLOR; CALDWELL; BENTLEY, 2005), agentes terapêuticos (NUNES; CARVALHO; GUILHERMINO, 2006), lectinas de plantas (SANTOS *et al.*, 2009). Esses trabalhos mostram que a artêmia é um organismo bem difundido na utilização para teste de toxicidade.

Estudos mostram que a AML possui vários efeitos biológicos interessantes como a capacidade de induzir ou inibir linfócitos, agindo como um potencial regulador não específico de resposta imunológica (LIMA *et al.*, 1998), indução da migração de neutrófilos em camundongos (NEVES *et al.*, 2001) , potentes efeitos antinoceptivos, indicando grande potencialidade como medicamento analgésico (NEVES *et al.*, 2007). Considerando essas informações, é interessante investigar o nível de toxicidade da lectina de *A. multifida* visando sua possível utilização na produção de biofármacos, por exemplo. Com isso, o presente

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Algas marinhas

A alga marinha vermelha *Amansia multifida* foi coletada, nos substratos rochosos do meso-litoral durante as marés de sizígia nas praias do Pacheco, município de Caucaia e Fleixeiras, município de Trairí, Ceará, sendo então transportadas em sacos plásticos para o laboratório, lavadas com água corrente, separadas de epífitas e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Purificação da lectina de *Amansia multifida*

2.2.1 Extração das proteínas

O protocolo de extração foi adaptado de Costa *et al.*, (1999). As algas foram desidratadas por liofilização e trituradas em um moinho até a obtenção de um pó fino, denominado farinha. O material foi suspenso em uma solução tampão de fosfato 0,02 M, pH 7,0, com NaCl 0,15 M (PBS), na proporção de 1: 20 p/v e submetido à agitação constante por quatro horas em temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada em tecido de nylon e o filtrado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada a 7000 x g por 30 minutos à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi então descartado e o sobrenadante foi denominado extrato total.

2.2.2 Fracionamento protéico do extrato total

O extrato total foi submetido à precipitação protéica 70 % de saturação com sulfato de amônio (Fração 0-70). O material ficou em repouso a temperatura ambiente por 16 horas, em seguida, foi submetido à centrifugação (7000 x g por 30 minutos à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). O precipitado foi ressuspenso com menor volume de água destilada possível e em seguida dialisado exaustivamente contra água destilada e posteriormente contra tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 para equilibrar a amostra para cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE Sephacel.

2.2.3 Quantificação das proteínas

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

2.2.4 Atividade hemaglutinante

O teste de detecção de atividade hemaglutinante foi realizado com eritrócitos de coelho tratados com tripsina a 3 %. O sangue foi retirado de coelhos saudáveis mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em "V". As amostras, em duplas seriadas, foram diluídas em cada poço (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, em seguida adicionou-se 50 μ L da suspensão de hemácias de coelho a 3 % em NaCl 0,15 M tratado com tripsina a cada uma das diluições. O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos, em seguida deixado em temperatura ambiente por mais 30 minutos e após esse período a hemaglutinação das hemácias foi detectada macroscopicamente. Os resultados foram expressos em Unidades de Hemaglutinação (U.H.) que é o inverso da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação visível.

2.2.5 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

A fração 0-70 foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (1,5 X 15,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas que não interagiram com a coluna foram lavadas com o tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio adicionado de 1 M de NaCl. Frações de aproximadamente 1,5 mL foram coletadas manualmente, sendo o fluxo obtido por gravidade, e monitoradas a 280 nm.

As frações referentes a cada pico obtido foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada, e, então, liofilizadas. A atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todos os picos cromatográficos foram avaliados.

2.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

O grau de pureza e a estimativa da massa molecular aparente da AML foram avaliados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS (SDS-PAGE) e 2-mercaptoetanol, adaptada da metodologia descrita por Laemmli (1970).

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

A eletroforese foi realizada no sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad) com a voltagem de 150 V, potência de 5 W e amperagem de 35 mA. O tampão usado para a corrida da eletroforese continha Tris 0,025 M, pH 8,8, glicina 0,192 M e SDS 0,1 %.

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

Todos os passos do processo de purificação estão resumidos na Figura 4.

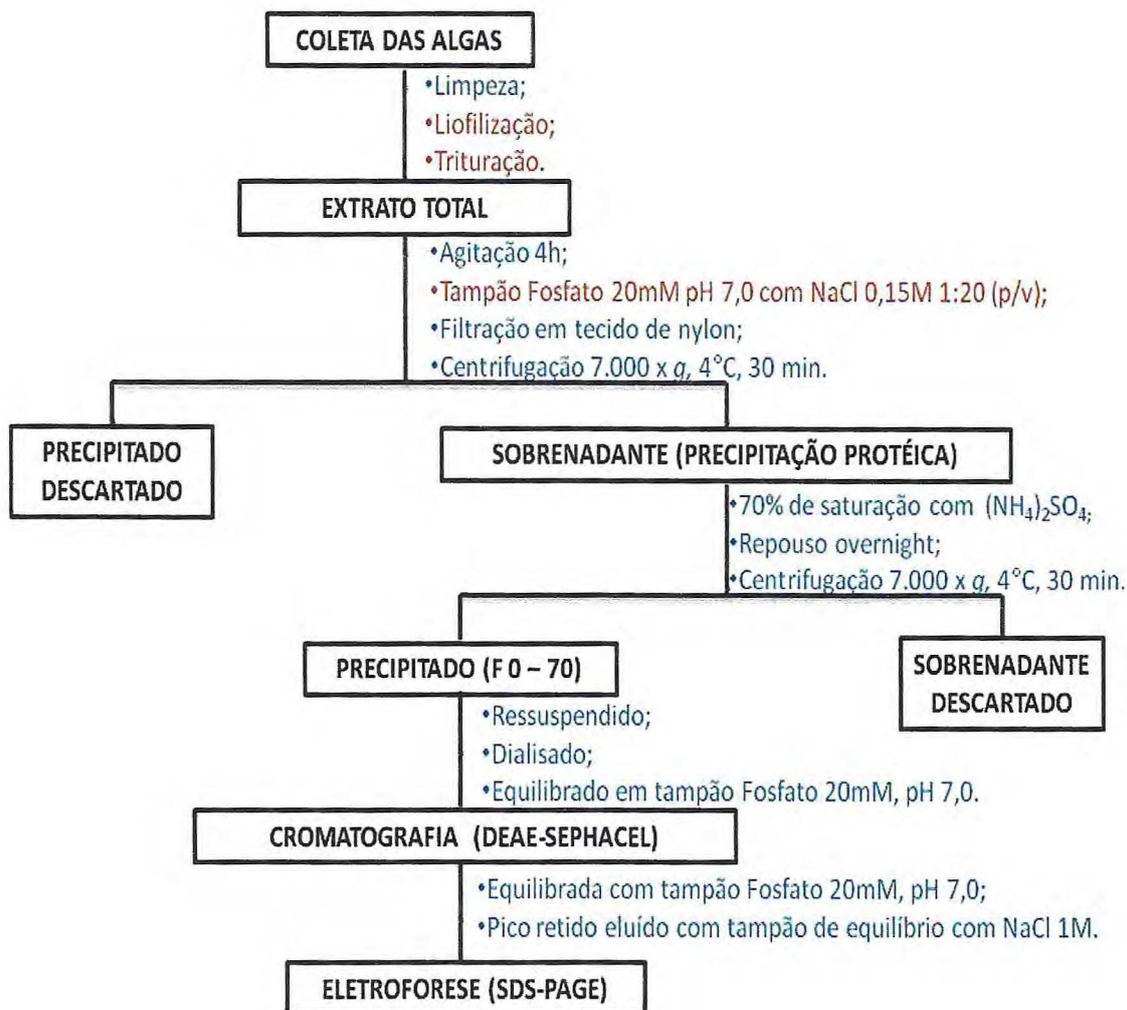


Figura 4. Protocolo de purificação da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* adaptado do protocolo descrito por Costa *et al.*, (1999). Em vermelho, os passos que foram modificados. Em azul, os passos iguais nos dois protocolos.

2.3 Caracterização por Espectrometria de Massa

2.3.1 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massa

A massa molecular da AML foi determinada pela análise da proteína intacta através da ionização por eletronebulização e os íons foram injetados em um instrumento híbrido Synapt HDMS (Q-IMS-o-ToF Synapt HDMS, Waters) com uma resolução de 10.000 e uma precisão de 10 ppm.

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

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

2.3.2 Sequenciamento por espectrometria de massa

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

2.4 Ensaio de toxicidade com *Artemia* sp.

O ensaio de toxicidade foi adaptado da metodologia descrita por Veiga e Vital (2002). O cálculo da CL_{50} foi feito com o programa estatístico TSK (Trimmed Spearman-Kärber) bem como confiança de 95% (HAMILTON *et al.*, 1977) e após a obtenção dos valores de CL_{50} , esses valores foram comparados por teste T de Student com dados não pareados, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 3.0 onde foi verificada se houve diferença estatisticamente significativa entre efeito tóxico do extrato total (ET), fração protéica (FI) e da AML, adotando 95 % de confiança. O esquema do teste de toxicidade está representado na Figura 5.

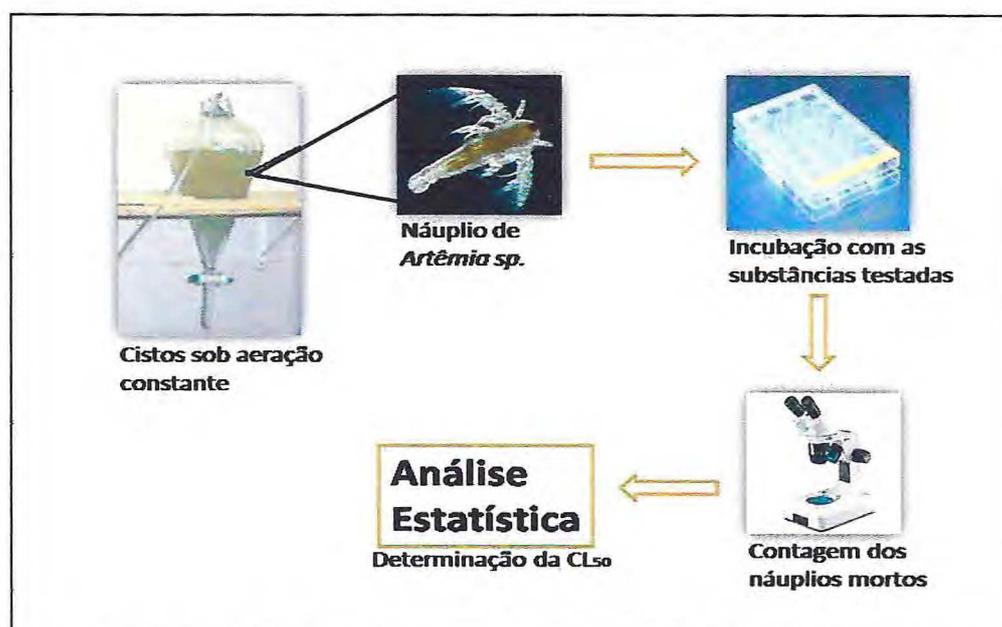


Figura 5. Representação do teste de toxicidade agudo com náuplios de *Artemia* sp.

O teste feito foi do tipo estático, sem renovação de água, esse tipo de teste é o mais utilizado para teste de toxicidade agudo, no qual, os organismos ficam em contato com a solução testada. Esse sistema é recomendado para testes com substâncias estáveis, quando o teste é feito tendo período de exposição do curto dos organismos a solução testada, ou quando a espécie utilizada no teste tem tamanho reduzido (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

2.4.1 Obtenção dos náuplios II

Os cistos de artêmia foram adquiridos em lojas de aquário. Para obtenção dos náuplios pesou-se 30 mg de cistos que foram hidratados durante uma hora em água destilada sob aeração constante. Esse procedimento permite que os cistos desidratados, que possuem forma bicôncava, passem a apresentar uma forma mais esférica e dessa forma sofrer melhor ação do hipoclorito de sódio (agente desencapsulante).

Após a hidratação os cistos passaram por um tratamento com hipoclorito de sódio na concentração de 50 %, sob agitação constante, até passarem da cor marrom para a cor alaranjada. O hipoclorito de sódio além de diminuir da camada do córion, facilitando a eclosão, também promove a assepsia dos cistos.

Ao atingirem a cor alaranjada os cistos foram imediatamente lavados com água corrente, sem deixar resíduos do agente desencapsulante para que a solução de hipoclorito de sódio não atingisse o embrião, e depois com água destilada e transferidos para um recipiente com fundo cônico com água do mar filtrada, recebendo aeração constante, e após 48 h, os náuplios estavam na fase II, prontos para serem utilizados nos testes de toxicidade.

2.4.2 Teste de sensibilidade

Foi realizado um teste de sensibilidade utilizando SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), para verificar se os organismos utilizados estavam dentro do padrão de sensibilidade descrito (VEIGA; VITAL, 2002). As concentrações usadas no teste foram 9, 12, 16, 21, 27, e 35 mg.L⁻¹, sendo obtidas a partir da diluição de uma solução estoque com concentração de 1,5 g.L⁻¹. Para controle do teste, foi utilizado apenas água do mar filtrada. O teste foi feito em triplicata e cada réplica recebeu 10 náuplios na fase II. Em 24 horas foi determinada a CL₅₀ contando os náuplios mortos com auxílio de uma lupa.

2.4.3 Teste de toxicidade

O extrato total, a fração 0-70 e a AML liofilizado, foram solubilizados em água do mar obtendo-se uma solução estoque na concentração de 500 µg.mL⁻¹ e a partir dessa solução estoque fez-se diluições obtendo as concentrações de teste (1, 5, 10, 50 e 100 µg.mL⁻¹). Para controle utilizou-se apenas água do mar filtrada. Todas as concentrações e o controle foram

feitos em triplicata e repetido quatro vezes. Em cada réplica foram adicionados 10 náuplios na fase II.

O ensaio foi montado em placas de acrílico estéreis com 24 poços, sendo verificada a mortalidades dos náuplios a cada 24 horas com auxílio de uma lupa.

O tempo de duração dos testes foi de 72 horas, sendo que a cada 24 horas contados os números de náuplios mortos com o auxílio de lupa. Para a aceitabilidade do teste admitiu-se 10 % de mortalidade no controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação da lectina da alga marinha

3.1.1 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica está apresentada na Figura 6. Duas frações distintas foram observadas e ambas apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, seguindo o mesmo perfil apresentado por Costa *et al.* (1999), onde a fração PI apresentou maior atividade hemaglutinante específica (Tabela 3).

O fator de purificação da lectina obtida na cromatografia de troca iônica em gel DEAE-Sephacel apresentou um valor de 12,7 vezes, aproximadamente o dobro do valor descrito por Costa *et al.*, (1999) (Tabela 3).

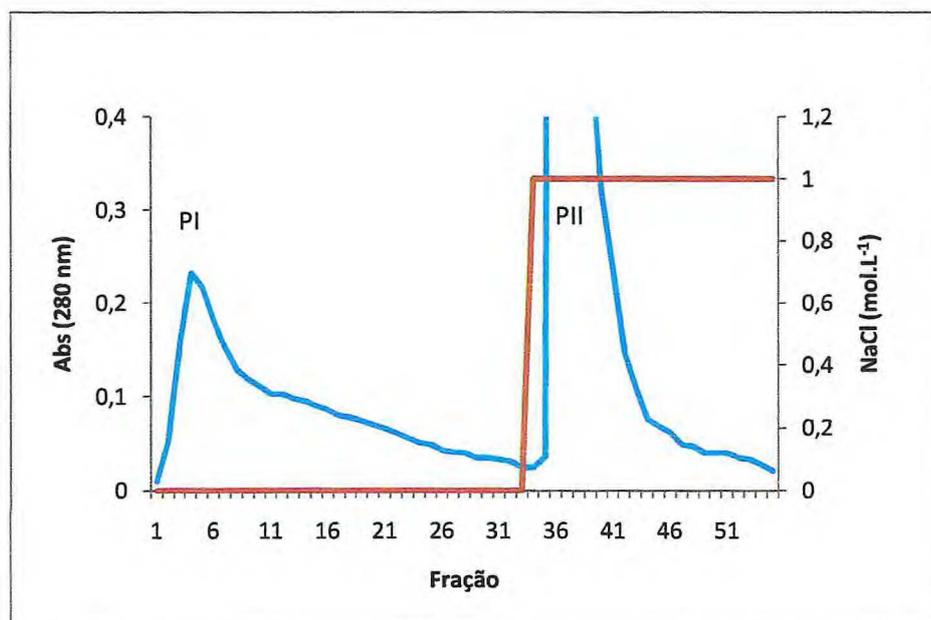


Figura 6. Cromatografia de troca iônica em coluna com gel DEAE- Sephacel da fração 0-70% de *Amansia multifida*. A fração 0-70% equilibrada em tampão fosfato 20 mM pH 7,0 foi aplicada em uma coluna de DEAE-Sephacel (1,5 x 15,0 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A fração não retida foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração retida foi eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de 1M de NaCl com o fluxo obtido por gravidade.

Tabela 3. Tabela de purificação da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*

Fração	¹⁾ Proteínas (mg/mL)	²⁾ Atividade Hemaglutinante (UH/mL)	³⁾ Atividade Hemaglutinante específica (U.H./mgP)	⁴⁾ Fator de Purificação
Extrato total	0,071	8.192	115.223	1,0
Fração 0 – 70%	0,092	16.384	177.506	1,5
Fração PI DEAE	0,022	32.768	1.460.194	12,7

1) Concentração de proteínas solúveis (BRADFORD, 1970); 2) Atividade hemaglutinante (U.H./mL.); 3) Atividade hemaglutinante específica (UH/mgP), sendo a relação entre a atividade hemaglutinante total e a concentração de proteínas; 4) Fator de purificação calculado a partir da relação entre atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo seguinte.

3.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e estimativa das subunidades

A homogeneidade da lectina foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE). A lectina obtida na fração PI da cromatografia de troca iônica mostrou apenas uma banda protéica de aproximadamente 29 kDa tanto na presença quanto na ausência de um agente redutor (Figura 7), estando de acordo com os resultados obtidos por Costa *et al.*, (1999); e apresenta semelhança com a massa molecular das lectinas isoladas das algas do gênero *Eucheuma* (KAWAKUBO *et al.*, 1997; KAWAKUBO *et al.*, 1999).

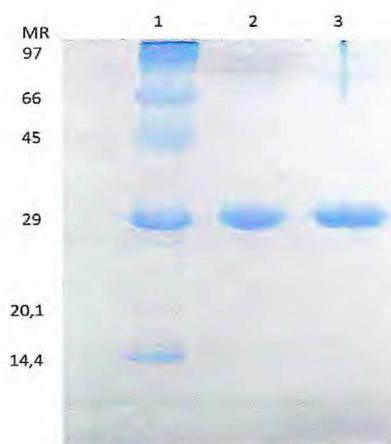


Figura 7. Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE). 1- Marcadores moleculares (fosforilase B 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbonica 29 kDa, 20,1 kDa, inibidor de tripsina, α -lactoalbumina 14,4 kDa); 2- AML em condições não redutoras; 3- AML reduzida na presença de β -mercaptoetanol.

3.2 Caracterização por Espectrometria de Massa

3.2.1 Determinação da massa molecular

A massa molecular do íon majoritário da AML determinada por espectrometria de massas com ionização por eletronebulização foi de 28.385 \pm 2 Da (Figura 8). O valor encontrado é bastante próximo ao da massa molecular aparente determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 7). A informação obtida por espectrometria de massa é mais precisa devido ao possível erro esperado ser de apenas 2 Da, enquanto que os dados obtidos por eletroforese pode ser influenciada por alguns interferentes como a hidrofobicidade, natureza da composição de aminoácidos e coeficiente hidrodinâmico da molécula.

Além do íon majoritário de 28.385 Da, íons de intensidades menores foram observados (28.361, 28.733, 28.753, 28.771, 29.657 e 29.686 Da) como mostrados na Figura 8. Costa e colaboradores (1999), utilizando a técnica de focalização isoelétrica, evidenciaram a presença de cinco isoformas da AML. Em vista disso, os íons com diferentes valores de massa observados nos experimentos de ESI-MS podem corresponder às diferentes isoformas da AML. Alguns desses valores de massa podem corresponder à aductos de sódio ou potássio, que ionizam o analito (A) e dessa forma apresentam um acréscimo de valores de massa correspondente ao aducto ($A+Na^+$ ou $A+K^+$) (GRIFFITHS *et al.*, 2001).

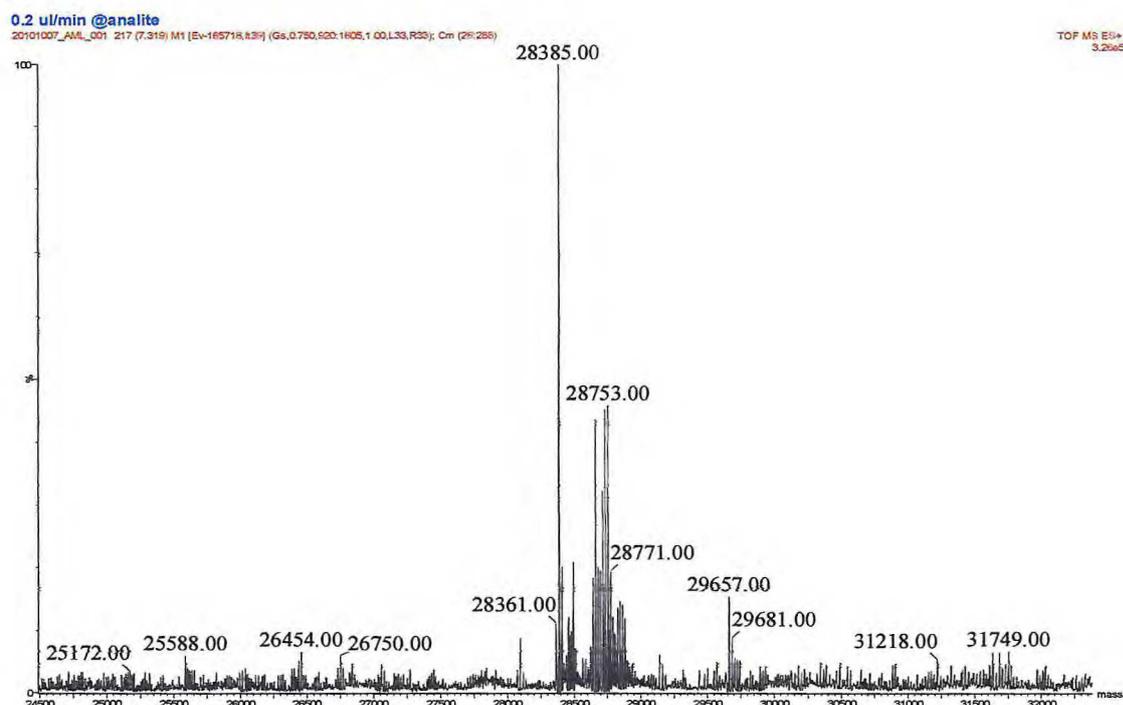


Figura 8. Análise por Espectrometria de massas com ionização por Eletronebulização. Espectro de Massa deconvoluído mostrando a massa da lectina da *Amansia multifida*.

A massa molecular da AML é semelhante à massa molecular medida por ESI-MS da isolectina ESA-2 (27.949 Da) isolada da alga marinha *E. serra* (HORI *et al.*, 2007).

3.2.2 Sequenciamento por espectrometria de massa

Os conjuntos de dados das digestões enzimáticas com tripsina e quimiotripsina da AML não apresentaram identificação significativa nos padrões de fragmentação dos espectros de massas quando comparados com as informações dos bancos de dados de lectinas. A identificação dos íons e a obtenção de algumas sequências de aminoácidos dos peptídeos foram determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (Tabela 4).

O somatório das massas dos peptídeos encontrados foi de 13.307 Da. A relação do somatório das massas em respeito à massa molecular da AML (28.385 Da), corresponde a 46,88 % da sequência completa da lectina.

Tabela 4. Massas moleculares e sequência de aminoácidos dos peptídeos da lectina de *Amansia multifida* oriundos da digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q)

Peptídeo	Massa molecular (Da)*		Diferença de massa (Da)	Sequência de aminoácidos
	Medida	Calculada		
T1	2.688,3245	2.688,3196	0,00	YTLQNQWGGSSAPWNAAGLWVLGGR
T2	1.069,4951	1.069,5080	0,01	YSGEGPIGYK
T3	1.177,5028	1.177,5073	0,00	TFDGTMTYSR
T4	2.684,1843	2.684,2368	0,05	YDVDNQWGGSSAPWHAGGLDAVIGGR
T5	930,4844	930,5386	0,05	VVAVDLTSK
T6	1.524,6263	1.524,6359	0,01	DGNASFEGTMTYSR
T7	1.626,7711	1.626,7904	0,02	SAPWNQAGVWALGDR
T8	943,4443	943,4875	0,04	AGVWALGDR
T9	774,4924	774,4924	0,00	EGPIGFR
T10	973,4712	973,4981	0,03	AGSWLLGDR
Q1	1.598,6877	1.598,7036	0,02	TGDMQYEREGPLGF

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

No sequenciamento foram detectadas sobreposições de sequências dos peptídeos T3 e T2 onde há uma substituição do aminoácido G/R, e na sequência dos peptídeos T6 e Q1, também há sobreposição e substituição dos aminoácidos D /T, T/D e S/E. Essas sobreposições com substituições indicam a presença de isoformas (Figura 9), resultado também descrito por Costa e colaboradores (1999) quando detectaram essas isolectinas por focalização isoeletrica.

Comparando a sequência parcial de aminoácidos da lectina da *A. multifida* com a da lectina da *E. serra* 2 (P84331.1) (HORI *et al.*, 2007), encontrou-se 79 % de identidade. Por outro lado, as sequências dos peptídeos da AML apresentaram alta homologia de sequência com outras lectinas da família da bactéria do solo *Myxococcus xanthus* (HORI *et al.*, 2007) que incluem além da lectina ESA-2, a lectina da cianobactéria *Oscillatoria aghardii* (SATO *et al.*, 2000, SATO; HORI., 2009).

Esse elevado grau de identidade também pode justificar as semelhanças das características bioquímicas entre essas lectinas como estabilidade da proteína em uma ampla faixa de pH, possuírem afinidade para oligômeros de manose (KAWAKUBO *et al.*, 1999), e por não dependerem de cátions divalentes para atividade hemaglutinante, sendo esta última bastante comum entre lectinas de algas marinhas (Tabela 1).

ESA X AML

```

ESA 01 GRYTVQQQWG GSSAPWNDAG LWILGRGNQ NVMAVDVNSS DGGANINGTM TYSGEGPIGY
AML (T1)YTLQNQWG GSSAPWNAAG LWVLGSR (T2)YSGEGPIGF
(T3)DGNASFEGTM TYSR

ESA 61 KGARRGESNV YDVENQWGGS SAPWHAGG-Q FVIGSRSGQG VLAVNITSSD GGKTLTGTMT
AML K (T4)YDVDNQWGGS SAPWHAGGLQ AVIGGR (T5)VVAVNITSK (T6)TFDGTMT
(Q1)TGDMQ

ESA 121 YEREGPIGFK GTQSGGDTYN VENQWGGSSA PWNKAGIWAL GDRSGQAMIA MDVSSSDGGK
AML YSR (T7)SA PWNKAGVWAL GDR
YEREGPIGF (T8)AGVWAL GDR

ESA 181 TLEGTMQYKG EGPIGFRGKL SGANNYSVEN QWGGSSAPWN AAGDWLIGDR HNQNITAVKV
AML (T9)EGPIGFRGK (T10)AGSWLIGDR

ESA 241 SSDNDGKNLD GTCTYEREGP IGFKGVATS
AML

```

Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos da lectina de *Eucheuma serra* (ESA, P84331.1) e peptídeos da lectina de *Amansia multifida* (AML). As sequências em preto representam sequências similares. Os peptídeos provenientes da digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q) estão representados entre parênteses.

3.3 Teste de toxicidade

3.3.1 Teste de sensibilidade

As CL_{50} encontradas ficaram sempre dentro do valor de referência, tendo valor médio de $15,17 \text{ mg.L}^{-1}$. Para a aceitabilidade do teste de toxicidade a $CL_{50} - 24 \text{ h}$ encontrada para a substância tóxica de referência (SDS) deve estar contida no intervalo entre 13,1 e $30,9 \text{ mg.L}^{-1}$ (VEIGA; VITAL, 2002).

3.3.2 Teste de toxicidade

O extrato total e a fração 0-70 apresentaram resultados de toxicidade (CL_{50}), somente após 72 horas após o início do teste. Para testes agudos, o tempo de avaliação da toxicidade pode ser de 24 até 96 horas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A AML não foi tóxica nas concentrações testadas em no período do teste. Nas concentrações testadas não foi determinada CL_{50} para a AML, indicando que essa lectina não teve efeito tóxico agudo em 72 horas de teste, enquanto que para o Extrato total e para a Fração 0 - 70 obteve-se valores médios de CL_{50} de $8,78 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7,083 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5). As CL_{50} não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 10), o que se permite dizer que

compostos removidos no decorrer do processo de purificação, tem ação tóxica contra *Artemia* sp.

Algumas lectinas de vegetais terrestres com afinidade por glicose/ manose se mostraram tóxicas para a artemia salina. As CL_{50-24h} determinadas para as lectinas de *Cratylia floribunda* (CFL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *D. grandiflora* (DGL) e *D. virgata* (Dvir) foram de , $4.75 \mu.mL^{-1}$, $5.21 \mu.mL^{-1}$, $2.52 \mu.mL^{-1}$ e $2.77 \mu.mL^{-1}$, respectivamente. Embora essas lectinas tenham características química, físico-química e estrutural semelhantes elas apresentaram diferenças na sua atividade biológica (SANTOS *et al.*, 2010).

A AML possui mais de um domínio de ligação a carboidratos por monômero e lectinas de vegetais do gênero *Dioclea* possuem apenas um domínio de reconhecimento, e as lectinas isoladas desse gênero, DGL e a Dvir apresentaram elevada toxicidade para artêmia salina. O efeito biológico dessas lectinas são maiores quando estas estão na forma de dímero ou tetramero. Diante dessa premissa, a hipótese foi que a AML poderia ter efeito biológico maior por não ter essa dependência de oligomerização. Entretanto, a AML não se mostrou tóxica, e possui potencial biotecnológico já evidenciado (LIMA *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2007).

Tabela 5. Toxicidade contra *Artemia* sp.

Toxicidade para <i>Artemia</i> sp. ($\mu g.mL^{-1}$)		
	CL50 média [IC _{95%}]	Desvio padrão
Extrato total	8,78 [7,87 - 9,70]	4,4
Fração proteica	7,08 [5,49 - 8,68]	1

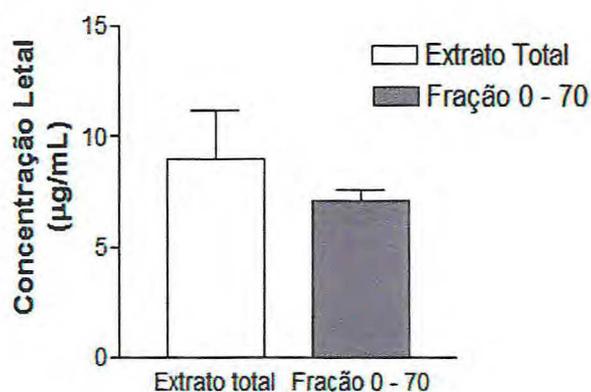


Figura 10. Análise estatística Teste T ($< 0,05$) com dados não pareados comparando as médias da concentração letal para 50% dos indivíduos expostos ao Extrato total e a Fração 0-70%, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre as CL_{50} obtidas no teste de toxicidade.

4 CONCLUSÕES

1. A adaptação do protocolo de purificação da lectina da *Amansia multifida* descrito por Costa e colaboradores (1999) foi eficiente, obtendo elevado grau de pureza da lectina.
2. Através da espectrometria de massa foi possível determinar a massa molecular nativa da lectina, bem como obter informações parciais da estrutura primária que servirão de base para o desenho de oligonucleotídeos no intuito de clonar e expressar a lectina através de técnicas de biologia molecular.
3. A sequência parcial da lectina de *A. multifida* apresentou elevado grau de identidade (79%) com a ESA 2 e com outras lectinas da família de lectinas da bactéria do solo. A similaridade de sequências pode justificar as semelhanças bioquímicas entre essas lectinas e por outra parte aponta para diversas potencialidades biotecnológicas.
4. A lectina da *A. multifida* não foi tóxica para *Artemia* sp. nas concentrações testadas. Isso aponta para uma possível candidata para produção de medicamentos, tendo em vista que essa lectina possui atividades biológicas potencias para farmacologia.

5 PERSPECTIVAS

1. Quantificar cisteínas livres e pontes dissulfeto por espectrometria de massa;
2. Com a sequência da lectina obtida por espectrometria de massa, fazer desenho de oligonucleotídeos no intuito de clonar e expressar a lectina através de técnicas de biologia molecular;
3. Realizar estudos de cristalografia para determinar a estrutura quaternária da proteína e procurar entender os seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ALGABASE. Listing the world's algae. Disponível em: < <http://www.alagebase.org> > Acesso em: 2 de novembro de 2010.

ADHYA, M., SINGHA B., CHATTERJEE, B. P. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine specific lectin from marine bivalve *Macoma birmanica* **Fish & Shellfish Immunology** v. 27, p. 1–8, 2009.

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

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

AMBROSIO, A. L. *et al.* Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 415, n. 2, p. 245-250, July 2003.

AWAL, M.; ASHRAFUZZAMAN, S.; HAQUE, M. E. Studies on Antibacterial Activity and Brine Shrimp Toxicity of Leaf Extract of *Cassia grandis* **Bangladesh Journal of Medical Microbiologists** v.3, n. 1, p. 17-19, January 2009.

BALZARINI, J., Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral Research**. v. 71, p. 237 – 247, 2006.

BENEVIDES N. M. B. *et al.*, Purification and partial characterization of the lectin from the red marine alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Faalkenberg. **Botanica Marina** v. 41, p. 521-525, 1998.

BENEVIDES, N. M. B., LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8, p. 117 - 122, 1996.

BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M., *Neem Azadirachta indica* A. Juss. (*Meliaceae*) toxicity in *Artemia* sp.: comparison of a commercial preparation and the pure oil **Revista do Instituto de Ciência da Saúde** v.26, n. 2, p.157-160, 2008.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

BITENCOURT, F.D.*et al.*, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377, p. 139-148, 2008.

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

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

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BULGAKOV, A. A. *et al.*, Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in **Korea Fish & Shellfish Immunology** v.16, p. 487 - 499, 2004.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p. 878, 2004.

CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G.; OLIVE, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes **Toxicon** v.42, p.301-306, June 2003.

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

- CARDOSO, K. H. M. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology Pharmacology**. v. 146, p. 60 - 78, 2007.
- CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57, p. 343 – 350, 2000.
- CHILES T.C., BIRD K.T. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comparative. Biochemistry Physiology** v. 94, n 1, p. 107-111, 1989.
- CHU, C. Y.; HUANG, R.; LING L. P. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 33, p. 967–973, June 2006.
- COSTA, F. H. F. *et al.*, Purification and partial characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology. Molecular Biology Plants**.v.5, p.53-61, 1999.
- DALTON S.R., LONGLEY R.E., BIRD K.T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. **Journal of Marine Biotechnology** v.2, p. 149-155, 1995.
- DANTAS, N. P. *et al.*, Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará. *In*:MATTHEWS-CASCON, H.; LOTUFO, T. M. C. (Org.). **Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará**. 1 ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, v. 24, p. 7-70, 2006.
- DAY, J. G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cell Dev Biology – Plant**. v. 35, p. 127 – 136, March-April 1999.
- EDMAN, P, BEGG G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**. v. 1, n. 1, p. 809, 1967.
- FÁBREGAS J *et al.*, Purification and partial purification of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from green alga *Codium tomentosum* (huds) Stackh. **Journal of Experimental Marine Biololy and Ecology** v. 124, p. 21-30, 1988.
- FERREIROS C.M., CRIADO M.T. Purification and partial characterization of a *Fucus vesiculosus* agglutinin. **Revista Espanhola de Fisiologia**. 39:51-60, 1983.

FENN, J. B. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

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

FIGUEIREDO, J. G. *et al.*,; Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, p. 371-377, 2010.

HAN, J. W. *et al.*, Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa* **Phycological Research** v. 58, p. 143–150, March 2010a.

GRIFFITHS, W. J. *et al.* Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochem. J.** v.355, p.545-561, 2001.

HAN J. W. *et al.*, Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa* **Journal Applied of Phycology**, DOI 10.1007/s10811-010-9575-x, September 2010b.

HATAKEYAMA, T. *et al.*, Purification and Characterization of Four Ca^{2+} Dependent Lectins from the Marine Invertebrate, *Cucumaria echinata* **Journal of Biochemistry** v.116, n. 1, p. 209 – 214, 1994.

HILLENKAMP, F. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical Chemistry**. v. 63, p. 1193A-1203A, 1991.

HOLANDA, M. L. *et al.*, Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria **Brazilian Journal Medical and Biological Research** v. 38, n.12, p. 1769 – 1773, 2005.

HORI, K. *et al.*, Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**. v. 27, n. 7. p. 2063-2067, 1988a.

HORI, K., MATSUBARA, K., MIYASAWA, K.. Primary structures of two hemagglutinins from marine red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, p. 226 – 236, January 2000.

HORI, K. *et al* A mitogenic agglutinin from red alga *Carpopeltis flabellata*, **Phytochemistry**. v. 26, n.5, p. 1335-1338, 1987.

HORI K. *et al.*, Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins from the red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 873, p. 228-236, 1986.

HORI, K., MIYASAWA, K., ITO, K.. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia** v. 204/205, p. 561 – 566, 1990.

HORI, K.. *et al.*, Evidence for wide distribution of agglutinins in marine algae. **Botanica Marina**. v. 31, n. 2, p. 133-138, 1988b.

ISHIHARA K.; ARAI S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from macroalga *Ulva limnetica* (ulcales, Chlorophyta). **Phycological Research**. v.57, p.104-110, 2009.

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

KAMIYA H., SHIOMI K., SHIMIZU Y. Marine biopolymers with cell specificity III agglutinins in the red alga *Cystoclonium purpureum*: isolation and characterization. **Journal of Natural Products**. v. 43, n. 1, p. 136-139, 1980.

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

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

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

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

- LEITE Y. F. M. M. *et al.*, Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1724, p. 137 – 145, April 2005.
- LIAO, W. R. *et al.*, Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 433 – 439, July 2003.
- LIMA, R.F; *et al.*, *Bryothamnion seaforthii* Lectin Relaxes Vascular Smooth Muscle: Involvement of Endothelium and NO Synthase. **Protein and Peptide Letters**, v. 17, p. 305-310, 2010.
- LIMA, H. C. *et al.*, Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida* **Journal of Applied Phycology**, Belgium v. 10, p. 153 – 162, 1998.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins mediate cellular recognition. **Chemical reviews**. v. 98, n. 2, p. 637 - 674, 1998.
- LOVELESS R.W., ROGERS D.J. Biochemical studies on the lectins from subspecies of *Codium fragile*. **British Phycology Journal** v. 20, p.185, 1985.
- MANN, M.; STEEN, H. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews Molecular Cell Biology**. v. 5, p. 699 - 711, September 2004.
- MBWAMBO, Z. H. *et al.*, Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 7, n. 9, p. 1-5, March 2007.
- MOLCHANOVA, V. *et al.*, A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** v. 145, p. 184–193, 2007
- MOLCHANOVA, V. *et al.*, Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta) **Botanica Marina** v. 53, p.69 – 78, February 2010.
- MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **Journal Biology et Chemical**, v.280, n.10, p. 9345-9353, March 2005.

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

NAGANO, C. S. *et al* Crystallization and Preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*, **Acta Crystallographica section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v67. p. 997 – 999, October 2005a.

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

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

NEVES, S.A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 40, n. 1, p. 127 - 134, 2007.

NEVES, S.A. *et al.*, Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins **Inflammation Research** v. 50, p. 486-490, 2001.

NIU, J. *et al.*, Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides* **Chinese Journal of Oceanology and Limnology** v. 27, n 3, p. 502-512, 2009

NUNES, B;CARVALHO F.;GUILHERMINO, L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica* **Chemosphere** v.62, p. 581–594, 2006.

OLIVEIRA, S.R.M.,*et al.*, Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 25, n. 4, p, 397 – 403, Dezembro 2002.

OKAMOTO R. *et al.*, Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia** v. 46, p. 975-977, 1990.

- PIMENTEL, M. F. *et al.*, Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol **PANAMJAS Pan – American Journal of Aquatic sciences**. v. 4, n. 3, p. 363 – 368, 2009.
- PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma Cells **Advances in Pharmacological Sciences**. Septembre 2009.
- PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347 - 352, May 1995.
- RAVEN, P. H.; EVERT, F. R.; EICHHORN, S. E. (2007) **Biologia vegetal** 7ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 830p.
- RITTIDACH, W., PAIJIT, N., UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1770, p. 106–114, 2007.
- RIVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Editora Artmed, Porto Alegre, 280p. ISBN 85-3630660-2. 2006.
- ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia** v. 260/261, p. 589–93, 1993.
- ROGERS D.J., FLANGU H. Lectins from *Codium* species. **Br. Phycology. Journal**. v. 26, p. 95-96, 1991.
- ROGERS D.J., BLUNDEN G., EVANS P.R.. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med. Lab. Sciences** v. 34, p. 193-200, 1977.
- ROGERS D.J., FISH B., BARWELL C.J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In. **INTERNATIONAL LECTIN MEETING**, 10., 1990, Berlin/New York. Proceedings of the 10th Lectin Meeting. Berlin/New York : Walter de Gruyter v. 7, p. 49-52, 1990.
- ROGERS D.J. *et al.*, Binding of N-acetyl- α -D-galactosamine by lectins from species of green marine alga genus, *Codium*. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 10, p. 162-165, 1994.

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

SAMPAIO, A. H. (1997) **Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species**. Ph.D Thesis. University of Portsmouth, Inglaterra, p. 191 + XV.

SAMPAIO A.H., ROGERS D.J., BARWELL C.J. Characterization of a new lectin from the green alga *Ulva laetevirens*. **Lectins: Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry** v.11, p. 96-100, 1996.

SAMPAIO, A. H., ROGERS D. J. AND BARWELL C. J. Isolation and characterization of the lectin from the Green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina**. v. 41 p. 427 – 433. 1998a.

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

SAMPAIO A.H. *et al.*, A new isolation and further characterization of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **Journal Applied of Phycology** v.10, p. 539 - 546, 1999.

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

SANTOS, A. F. *et al.*, The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina* **Bioresource Technology** v. 98,p.135–139, 2007.

SATO T, HORI K., Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fish Sci** v.75, p743–753, 2009.

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

SELL, A. M., COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina **Acta Scientiarum** v. 22, n. 2, p. 297 - 303, 2000.

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

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

SHIOMI K., YAMANAKA H., KIKUCHI T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries** v. 47, n.8, p. 1079 – 1081.

SILVA *et al.*, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**.v. 33, n. 5, p. 830 – 835, May 2010.

SOUSA *et al.*, Haemagglutinin of the antarctic seaweed *Georgiella confluens* (Reinsch) Kylin: isolation and partial characterization **Polar Biology** v.1, p. 1 - 8, May 2010.

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

SWANSON, M. D. *et al.*, Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication **The Journal of Biological Chemistry** v.285, n. 12, p. 8646–8655, March 2010.

TAYLOR, R. L.; CALDWELL G. S.; BENTLEY M. G. Toxicity of algal-derived aldehydes to two invertebrate species: Do heavy metal pollutants have a synergistic effect? **Aquatic Toxicology** v. 74, p. 20–31, April 2005.

TEIXEIRA, E. H.; *et al.*, In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001-1006, October 2007.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**. v. 17, n 6, p. 575 - 672, 1998.

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

VANDERLEI, E. S. O. *et al.*, Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1-6, 2010.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. *In*: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil**. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.

VIANA, G. S. B., *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 35, p. 713 – 722, 2002.

VIEIRA, L. A. P. *et al.*, The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, n. 7, p. 1071- 1079, 2004.

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

WILM, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano electrospray mass spectrometry. **Nature**. v. 379, p.466 - 469, 1996.

YAMAGUCHI, M., *et al* Isolation and Characterization of a Mannan-Binding Lectin from the Freshwater Cyanobacterium (Blue-Green Algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 265, n. 3, p. 703 – 708, 1999.

YAMAGUCHI, M., *et al.*, Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** v. 119, p. 593–597, 1998.

YOON, K. S. *et al* Molecular characterization of the lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumosa* (chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 44. p. 103-112, February 2008.

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, 1ª Edição, São Paulo, 2008.