

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
Centro de Ciências  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

EFEITOS TÓXICOS DE LECTINA E TOXINA DA ALGA  
MARINHA *Solieria filiformis* SOBRE CAMUNDONGOS  
E *Boophilus microplus* (CARRAPATOS)

ANTONIA EDNA DO NASCIMENTO

N.Cham. T574.192 N193e

Autor: Nascimento, Antonia

Título: Efeitos tóxicos de lectina e tox



13827537

UFCE - BCT

FORTALEZA - CEARÁ  
2003

**EFEITOS TÓXICOS DE LECTINA E TOXINA DA ALGA MARINHA  
*Solieria filiformis* SOBRE CAMUNDONGOS E *Boophilus microplus*  
(CARRAPATOS)**

**ANTONIA EDNA DO NASCIMENTO**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2003**

**EFEITOS TÓXICOS DE LECTINA E TOXINA DA ALGA MARINHA  
*Solieria filiformis* SOBRE CAMUNDONGOS E *Boophilus microplus*  
(CARRAPATOS)**

**ANTONIA EDNA DO NASCIMENTO**

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**MARÇO/2003**

R 13827537 (CATIVO)

A 64645

T 574.192

N 193e

N 193 e Nascimento, Antonia Edna do  
Efeitos Tóxicos de lectina e toxina da alga  
marinha *Solieria filiformis* sobre camundongos e  
*Boophilus microplus* (carrapato)/Antonia Edna do  
Nascimento. \_ Fortaleza: 2003.  
130p.:il. \_  
Orientador: Norma Maria Barros Benevides  
Tese (Doutorado) em Bioquímica  
1.Lectina 2. Toxina 3. Alga marinha 4.  
*Boophylus microplus* (carrapatos) I. Universidade  
Federal do Ceará

C.D.D. 574.192  
C.D.U. 577.1

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

---

ANTONIA ÉDNA DO NASCIMENTO

TESE APROVADA EM: 20 / 03 / 2003.

*norma maria Barros Benevides*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Drá. Norma Maria Barros Benevides  
Orientadora

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira  
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular.  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Maria da Guia Silva Lima  
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular –  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Genário Sobreira Santiago  
Faculdade de Veterinária – Universidade  
Estadual do Ceará

---

Profa. Drá. Selene Maia de Moraes  
Depto. Química – CCT-Universidade  
Estadual do Ceará

Aos meus pais **José e Lúcia**,  
(*IN MEMORIAN*)  
Meus Irmãos e **Winnie**,  
Meu esposo **Célio**,  
Minha filha **Marília**, com amor.

**DEDICO.**

“Não siga aonde leva a trilha.  
Em vez disso, vá aonde não  
há trilha e deixe seu rastro”.

Do livro *Comment To Excellence*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. **Norma Maria Barros Benevides** pela orientação segura e objetiva, dedicação, compreensão e amizade demonstradas ao longo de nossa convivência no decorrer deste curso.

Aos conselheiros Prof. Dr. **Renato de Azevedo Moreira**, Profa. Dra. **Maria da Guia Silva Lima**, Profa. Dra. **Celene Maia de Moraes** e Prof. Dr. **Genário Sobreira Santiago** pela disponibilidade e valiosas sugestões apresentadas na avaliação final deste trabalho.

Às Professoras **Tereza Neuma Albuquerque Gomes Nogueira** e **Marília Taumaturgo Pinto** pela valiosa contribuição na avaliação dos achados histopatológicos apresentados neste trabalho.

Às Professoras Dra. **Maria Elisa Carneiro** e Dra. **Kelma Maria de Souza Bastos** pela disponibilidade e competência na orientação dos experimentos realizados no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos e cooperação permitindo acesso aos seus Laboratórios, assim como, pelo relacionamento amigável durante o tempo de realização desta Tese.

Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica: **Noélia Mendes**, **Edna Pereira**, **João Batista Santiago**, **Neilsa Campos**, pela amizade e companheirismo.



Aos bolsistas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial aqueles do Laboratório de Algas Marinhas: **Luana, Cristiane, Nauber e Rodrigo** pela amizade, companheirismo e apoio, presentes em todos os momentos de convivência.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela cooperação e amizade constantes.

Aos Colegas Professores do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, particularmente, **Josefa Lineuda da Costa Murta, Cláudio Cabral Campello e Maria Verônica Moraes Campello** pelo apoio e amizade.

Aos **meus pais, irmãos e Winnie** que me ajudaram a crescer em todas as etapas da minha vida, sempre presentes, carinhosos e amigos.

Ao **Célio**, meu esposo e companheiro, que colaborou em todas as etapas deste trabalho, com seu apoio, disponibilidade e compreensão.

A minha filha **Marília**, pelo seu amor, carinho e compreensão nos muitos momentos de ausência, no decorrer da realização deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

**Minha Maior Gratidão.**

O autor expressa ainda, reconhecimento às seguintes Instituições: **Universidade Federal do Ceará** através do **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, em cujas dependências foram desenvolvidos os experimentos necessários à realização deste trabalho.

À **Universidade Estadual do Ceará** pela valorização e estímulo à capacitação de Docentes.

A **Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa do Ceará – FUNCAP** pela concessão de bolsa de Pós-Graduação.

## SUMÁRIO

	Página
<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b>	XV
<b><u>LISTA DE TABELAS</u></b>	XVIII
<b><u>LISTA DE TABELAS EM ANEXO -A</u></b>	XIX
<b><u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u></b>	XXI
<b><u>RESUMO</u></b>	XXIII
<b><u>ABSTRACT</u></b>	XXIV
<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b>	1
1.1. <u>Algas Marinhas</u>	2
1.1.1. Considerações Gerais	2
1.1.2. Potencial Nutricional e Econômico	3
1.1.3. Propriedades Biológicas	7
1.2. <u>Proteínas Tóxicas e/ou Antinutricionais em Vegetais</u>	11
1.2.1. Lectinas	14
1.2. Proteínas Inativadas de Ribossomos (RIPs)	22

1.2.3. Inibidores de Proteases	24
1.2.4. Toxinas	26
1.2.5. Toxinas de Algas Marinhas	28
1.3. <u>Carrapatos</u> <i>Boophilus microplus</i>	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	33
2.1. <u>Geral</u>	34
2.2. <u>Específicos</u>	34
<b>3. MATERIAL</b>	35
3.1. <u>Alga Marinha</u>	36
3.2. <u>Células Sanguíneas</u>	36
3.3. <u>Animais Experimentais</u>	36
3.4. <u>Carrapatos</u>	38
3.5. <u>Reagentes</u>	38
<b>4. MÉTODOS</b>	39
4.1. <u>Tratamento da Alga Marinha</u>	40

4.2. <u>Composição Química Elementar da Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i></u>	40
4.2.1. Determinação da Umidade	40
4.2.2. Determinação de Cinza	41
4.2.3. Determinação de Nitrogênio Total	41
4.2.4. Determinação de Lipídios Totais	42
4.2.5. Determinação de Fibras	43
4.2.5.1. Determinação da Fibra em Detergente Neutro (FDN)	43
4.2.5.2. Determinação da Fibra em Detergente Ácido (FDA)	43
4.2.6. Determinação de Ferro	44
4.2.7. Determinação de Fósforo	44
4.2.8. Determinação de Cálcio	45
4.2.9. Determinação de Magnésio	46
4.2.10. Determinação de Vitamina C	47
4.2.11. Determinação do Valor Calórico	47
4.3. <u>Extração de Proteínas da Alga <i>Solieria filiformis</i></u>	48

4.3.1. Preparação do Extrato Total	48
4.3.2. Preparação da F0/70	48
4.4. <u>Determinação de Proteínas</u>	50
4.5. <u>Detecção e Quantificação dos Componentes Protéicos Bioativos</u>	50
4.5.1. Determinação da Atividade Hemaglutinante	50
4.5.2. Atividade Anti-Trípica	51
4.5.3. Avaliação da Atividade Tóxica	51
4.5.4. Efeito do pH sobre a Atividade Tóxica do Extrato Total	52
4.5.5. Efeito da Temperatura sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total	52
4.6. <u>Purificação das Proteínas, Toxina e Lectina, da Alga <i>S. filiformis</i></u>	53
4.6.1. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Manana-Sepharose 4B	53
4.6.2. Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100	54
4.7. <u>Caracterização Físico-Química e Estrutural da Proteína Tóxica da Alga <i>S. filiformis</i></u>	55
4.7.1. Determinação da Massa Molecular por Eleroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol	55

4.8. <u>Avaliação Histopatológica dos Efeitos Tóxicos da Lectina de <i>S. filiformis</i> em Camundongos</u>	56
4.9. <u>Avaliação da Atividade Tóxica dos Extratos Total e Aquoso, da Toxina e Lectina da Alga <i>S. filiformis</i> sobre o Ciclo Evolutivo do Carrapato Bovino <i>Boophilus microplus</i></u>	59
4.10. <u>Análise Estatística</u>	62
<b>5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	63
5.1. <u>Composição Química Elementar da Alga <i>S. filiformis</i></u>	64
5.2. <u>Detecção das Atividades Hemaglutinante, Tóxica e Anti-Tríplica no Extrato Total da Alga <i>S. filiformis</i></u>	66
5.3. <u>Efeito do pH sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total</u>	67
5.4. <u>Efeito da Temperatura sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total</u>	67
5.5. <u>Purificação das Proteínas, Toxina e Lectina, da Alga <i>S. filiformis</i></u>	69
5.5.1. <u>Cromatografia de Afinidade em Coluna de Manana-Sepharose 4B</u>	71
5.5.2. <u>Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100</u>	71
5.6. <u>Massa Molecular das Proteínas Toxina e Lectina por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS e <math>\beta</math>-mercaptoetanol</u>	74

5.7 <u>Avaliação Histopatológica da Ação da Lectina da Alga <i>S. filiformis</i></u>	79
5.8 <u>Avaliação da Atividade Tóxica dos Extratos Total e Aquoso, da Toxina e Lectina da Alga <i>S. filiformis</i> sobre o Ciclo Evolutivo do Carrapato Bovino <i>B. microplus</i></u>	86
6. <u>CONCLUSÕES</u>	99
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	101
8. <u>ANEXOS</u>	122



## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kutz) P. W. Gabrielson	37
2. Esquema de Purificação da Toxina e Lectina da Alga <i>S. filiformis</i>	49
3. Ensaio de Avaliação da Atividade Tóxica dos Extratos Total e Aquoso, Toxina e Lectina da Alga <i>S. filiformis</i> sobre o Ciclo Evolutivo do Carrapato Bovino <i>B. microplus</i>	61
4. Cromatografia de afinidade em coluna de manana-Sepharose-4B da F0/70	72
5. Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PI-manana	75
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e na ausência e presença de $\beta$ -mercaptoetanol	77
7. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol	78
8. Necrópsia de camundongos pós-morte por efeitos tóxicos da lectina e toxina da Alga <i>S. filiformis</i>	81
9. Fotomicrografia de corte histológico do fígado de camundongos submetidos a aplicação com lectina da alga <i>S. filiformis</i>	82

10. Fotomicrografia de corte histológico do pulmão de camundongos injetados com lectina tóxica da alga *S. filiformis* 83
11. Fotomicrografia de corte histológico do baço e estômago de camundongos quando aplicada a lectina tóxica da alga *S. filiformis* 84
12. Fotomicrografia de corte histológico do coração e rim de camundongos quando aplicada a lectina tóxica da alga *S. filiformis* 85
13. Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas, quenóginas e da massa total de ovos do *B. microplus* 88
14. Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas e períodos de incubação e eclosão dos ovos de *B. microplus* 89
15. Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos e das eficiências reprodutiva e nutricional do *B. microplus* 90
16. Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de sobrevivência e mortalidade das larvas do *B. microplus* 91
17. Efeitos da toxina e da lectina da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas, quenóginas e da massa total de ovos do *B. microplus* 94
18. Efeitos da toxina e da lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas e períodos de incubação e eclosão dos ovos de *B. microplus* 95

19. Efeitos da toxina e da lectina da alga <i>S. filiformis</i> sobre a percentagem de eclosão dos ovos e das eficiências reprodutiva e nutricional das teleóginas do <i>B. microplus</i>	96
20. Efeitos da toxina e da lectina da alga <i>S. filiformis</i> sobre os períodos de	
1. sobrevivência e mortalidade das larvas do <i>B. microplus</i>	97
2. Atividade anti- <i>B. microplus</i> das teleóginas e das larvas de <i>B. microplus</i>	98
3. Composição química e conteúdo de água de <i>S. filiformis</i>	99
4. Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total de <i>S. filiformis</i>	100
5. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total de <i>S. filiformis</i>	100
6. Purificação do extrato total de <i>S. filiformis</i> por técnicas de cromatografia	103
7. Purificação da toxina de <i>S. filiformis</i>	106
8. Comparação entre as atividades tóxicas dos extratos total e aquoso da alga <i>S. filiformis</i> e da lectina de <i>S. filiformis</i> sobre a percentagem de eclosão dos ovos de <i>B. microplus</i>	107
9. Comparação entre as atividades tóxicas dos extratos total e aquoso da alga <i>S. filiformis</i> e da lectina de <i>S. filiformis</i> sobre a percentagem de eclosão dos ovos de <i>B. microplus</i>	107

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Principais usos de colóides extraídos de algas marinhas	08
2. Algumas aplicações para algas marinhas e seus constituintes	09
3. Composição química elementar da alga <i>S. filiformis</i>	65
4. Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total da alga <i>S. filiformis</i>	68
5. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total da alga <i>S. filiformis</i>	70
6. Purificação da lectina com atividade tóxica da alga <i>S. filiformis</i>	73
7. Purificação da toxina da alga <i>S. filiformis</i>	76
8. Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga <i>S. filiformis</i> sobre o período de incubação e percentagem de eclosão dos ovos de <i>B. microplus</i>	92
9. Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da toxina e lectina da alga <i>S. filiformis</i> sobre algumas fases do ciclo vital do carrapato bovino <i>B. microplus</i>	98

## TABELAS EM ANEXO – A

TABELA A 1- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas (PT), quenóginas (PQ) e da massa total de ovos (PMTO) de *B. microplus*. 123

TABELA A 2- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre o período de postura das teleóginas (PPT) e períodos de incubação (PI) e eclosão dos ovos (PE) de *B. microplus*. 124

TABELA A 3- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos (%E) e das eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) de *B. microplus*. 125

TABELA A 4- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de sobrevivência (PS) e mortalidade (PM) das larvas de *B. microplus*. 126

TABELA A 5- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas (PT), quenóginas (PQ) e da massa total de ovos (PMTO) de *B. microplus*. 127

TABELA A 6- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas (PPT), de incubação (PI) e eclosão dos ovos (PE) de *B. microplus*. 128

TABELA A 7- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos (%E) e das eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) de *B. microplus*. 129

TABELA A 8- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura sobrevivência (PS) e mortalidade (PM) das larvas de *B. microplus*.

Parâmetro	Concentração	Valor médio	Desvio padrão	Significância
PS (horas)	0	120	10	NS
	10	115	12	
PM (%)	0	5	2	NS
	10	8	3	
N	0	10	1	NS
	10	10	1	
Pa	0	10	1	NS
	10	10	1	
U	0	10	1	NS
	10	10	1	
Go	0	10	1	NS
	10	10	1	
KL	0	10	1	NS
	10	10	1	

## **ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES**

BAPNA	$\alpha$ -N-Benzoil-L-Arginina- $\rho$ -Nitroanilida
BSA	Albumina Sérica Bovina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletileno de amina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
DL <sub>50</sub>	Dose mínima capaz de matar 50% dos animais testados
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes
UH/ml	Unidade de hemaglutinação por ml, definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%
GML	Procedimento do Programa SAS que tem por objetivo a criação e análise de um modelo linear geral (General Linear Model – GLM)
kDa	Quilodaltons (unidade de medição de massa molecular)

SAS	Statistical Analysis System
PT	Peso da teleógina
PQ	Peso da quenógina
PMTO	Peso da massa total dos ovos
PPT	Período de postura da teleógina
PI	Período de incubação dos ovos
PE	Período de eclosão dos ovos
%E	Percentagem de eclosão dos ovos
IER	Índice (em percentual) da eficiência reprodutiva da teleógina
IEN	Índice (em percentual) da eficiência nutricional da teleógina
PS	Período de sobrevivência larval
PM	Período de mortalidade larval



## RESUMO

As proteínas, lectina e toxina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foram avaliadas quanto aos seus efeitos tóxicos sobre camundongos e carrapatos bovinos *Boophilus microplus*. As análises das frações protéicas, extrato total e F0/70, obtidas por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio até 70% de saturação, mostraram que estas foram tóxicas para camundongos dentro de um período de 24 horas por injeção intraperitoneal (DL<sub>50</sub> 16,5 e 13,8 mg/kg de peso corpóreo do animal, respectivamente), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia, que precederam a morte do animal. O tratamento térmico do extrato total aboliu completamente a atividade tóxica (90 °C, 60 min). As proteínas, toxina e lectina, foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Manana-Sepharose 4B, seguida de filtração em gel de Sephadex G-100. A toxina (DL<sub>50</sub> 21,7 e 17,8 mg/kg de peso corpóreo por vias ip. e iv., respectivamente), mostrou-se distinta da lectina com atividade tóxica (DL<sub>50</sub> 1,7 e 1,5 mg/kg de peso corpóreo por vias ip. e iv, respectivamente). A lectina apresenta-se como uma proteína dimérica com massa molecular aparente de 29 kDa e a toxina como uma proteína monomérica com massa de 14 kDa, por PAGE-SDS em presença de β-mercaptoetanol. A análise histopatológica dos órgãos, após a morte dos camundongos por aplicação da lectina e toxina, revelou um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD), que confirma a toxicidade destas proteínas. As avaliações preliminares de atividade tóxica da lectina e toxina sobre o ciclo de vida do carrapato bovino *B. microplus* demonstraram que estas proteínas afetaram algumas fases do ciclo de vida desse ectoparasita, sendo mais acentuados os efeitos tóxicos (redução do peso total da massa de ovos; redução dos períodos de postura da teleógina e de mortalidade e do índice de eficiência do produto) produzidos pela lectina.

## **ABSTRACT**

The proteins, lectin and toxin of the red marine alga *Solieria filiformis* were analyzed as for their poisonous effects in mice and in the *Boophilus microplus*. The crude extract and precipitate F0/70 with sulfate of ammonium of that alga were shown poisonous for mice upon intraperitoneal injection (LD 50 16,5 and 13,8 mg/kg of body weight of the animal), respectively, producing dyspnea, tonic-clonic convulsions and paralysis that preceded the death of the animal. The thermal treatment of the crude extract abolished the poisonous activity (90°C, 60 min). The procedures of purification of the toxin and lectin were driven by precipitation of the crude extract with ammonium sulfate up to 70% of saturation (F0/70), followed by affinity chromatography in column of Manana-Sepharose 4B and gel filtration with Sephadex G-100. The toxin (LD 50 21,7 and 17,8 mg/kg of corporal weight for ip and iv. routes, respectively), was shown to be distinct from of the lectin (LD 50 1,7 and 1,5 mg/kg of corporal weight for ip. and iv. routes, respectively). The lectin was a dimeric protein with apparent molecular mass of 29kDa and the toxin, a monomeric proteic with mass of 13,99 kDa, for PAGE-SDS in the presence of  $\beta$ -mercaptoetanol. The hystopatologic analysis of the organs after death of the mice injected with the lectin and the toxin revealed a picture of disseminated intravascular coagulation (CIVD), that confirms the toxicity of these proteins. The preliminary evaluations of the lectin and toxin in the control on the tick *B. microplus* demonstrated that these proteins affected the evolutionary cycle of the ectoparasite inducing toxics effects (reduction of the total weight of the mass of eggs, reduction of the posture periods and mortality). The toxic effects of the lectin were shown to be more intense than those of the toxin.

1.1. Introdução

1.2. História

caros, a maioria dos quais são de origem estrangeira.

Sete milhões de hectares são destinados à produção de cana-de-açúcar.

organização da produção agrícola, com o uso de máquinas e equipamentos.

sexta-feira, 15 de março de 1978, às 14 horas, no auditório da Universidade Federal de Pernambuco.

(muito obrigado a todos os presentes e a quem se interessou em participar).

dimensão da produção agrícola, com o uso de máquinas e equipamentos.

(PA) - Plano Agrícola e Pecuário, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

botânica, a ciência que estuda a estrutura, a função e a evolução das plantas.

reprodução, a capacidade das plantas de gerar descendentes semelhantes a si mesmas.

Rhizophyta, grupo de plantas que inclui as algas vermelhas e as cianobactérias.

apresenta uma estrutura celular simples, com uma parede celular rígida.

difusão, processo pelo qual as substâncias se movem de uma área de maior concentração para uma de menor concentração.

não é capaz de produzir seu próprio alimento, dependendo da ingestão de matéria orgânica.

GLV, grupo de plantas que inclui as algas verdes e as cianobactérias.

infantis, grupo de plantas que inclui as algas verdes e as cianobactérias.

grupos, grupo de plantas que inclui as algas verdes e as cianobactérias.

apresenta uma estrutura celular simples, com uma parede celular rígida.

a partir de matéria orgânica, dependendo da ingestão de matéria orgânica.

apresenta uma estrutura celular simples, com uma parede celular rígida.

a partir de matéria orgânica, dependendo da ingestão de matéria orgânica.

1. INTRODUÇÃO  
1. INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### **1.1- Algas Marinhas**

#### 1.1.1- Considerações Gerais

As algas pertencem a vários grupos taxonômicos heterogêneos caracterizados por terem a sua capacidade de invadir ambientes susceptíveis de serem colonizados, sendo consideradas os maiores produtores de matéria orgânica das cadeias tróficas (PEREZ-LORENZO *et al.*, 1998). As algas são separadas pelo tamanho em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas), invisíveis a olho nu, e as algas macroscópicas (macroalgas), com dimensões que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997). As macroscópicas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (RAVEN *et al.*, 1996).

Com exceção de algumas clorofíceas, as algas são pluricelulares, não apresentam vasos condutores de seiva (o transporte de substâncias é feito por difusão) e o corpo é formado por um "talo", isto é, um conjunto de células onde não se distinguem tecidos ou órgãos típicos (raiz, caule, folhas etc) (LINHARES & GEWANDSZNAJDER, 1997).

Historicamente, as algas marinhas vêm sendo designadas de vegetais inferiores, devido a sua simplicidade de organização, quando comparadas a outros grupos de plantas, principalmente as vasculares (RAVEN *et al.*, 1996).

Segundo ROUND (1983), evolutivamente, as algas marinhas, por apresentarem um histórico fóssil muito extenso, são consideradas como um grupo a partir do qual todos os outros vegetais fotossintetizantes mais complexos,

Criptógamas e, mais recentemente, Fanerógamas, se originaram. Apesar da sua variedade nos aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos, seus mecanismos básicos e vias metabólicas parecem ser similares aos demais vegetais.

As algas são dotadas de clorofila e pigmentos acessórios, como carotenóides e ficobilinas, os quais, através da luz, assimilam gás carbônico dissolvido na água, desempenhando assim um importante papel ecológico como produtores primários dos ecossistemas onde vivem (RAVEN et al., 1996).

Em relação ao habitat, as algas são predominantemente aquáticas, sendo encontradas no mar, em águas estuárias, dulcícolas e superfícies úmidas. Portanto, sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas afins (RAVEN et al., 1996).

Reconhecidamente, as algas marinhas representam um dos maiores biorecursos, existindo aproximadamente 150.000 espécies, dentre as quais mais de 30.000 encontram-se taxonomicamente classificadas (HARVEY, 1988).

### 1.1.2- Potencial Nutricional e Econômico

Nos últimos anos, têm aumentado os questionamentos sobre a conveniência e suficiência das fontes alimentícias no mundo. Muitos alimentos que ocupam uma posição de destaque na cadeia alimentar têm sido apontados como ineficientes, por exemplo, com relação ao fornecimento de energia. Estudos têm sugerido a utilização alternativa de algumas fontes primárias de alimentos, isto é, itens que ocupem uma posição básica na cadeia alimentar. As algas marinhas, representantes primários desta cadeia alimentar, têm recebido uma considerável atenção (SCHÖNFELD-LIEBER, 1979).

É sabido que as algas marinhas têm sido consumidas por numerosas populações litorâneas desde a antiguidade, mais notadamente no noroeste da

Europa, Ásia oriental e na região do Pacífico (SCHÖNFELD-LIEBER, 1979; MABEAU *et al.*, 1992).

Na América do Sul, mais especificamente no Chile, as algas marinhas já são consumidas regularmente como alimento e algumas espécies são encontradas à venda em feiras e mercados. No Peru e em algumas ilhas do Caribe também já se registra algum uso das algas. A Argentina, México e Brasil mantêm, há várias décadas, atividades comerciais relacionadas com algas marinhas (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997).

Para a seleção de novas fontes de alimentos para uma larga utilização é necessária não apenas a obtenção de informações concernentes à sua composição química, mas também a análise do perfil de aminoácidos e a detecção de componentes tóxicos e/ou antinutricionais (BENEVIDES *et al.*, 1998a).

A composição química de algas marinhas, se comparadas com a das plantas terrestres, tem sido pouca investigada e muito das informações disponíveis são provenientes de estudos com algas marinhas japonesas. Entretanto, algumas características relevantes podem ser encontradas nas algas marinhas, que apresentam, particularmente, altos teores de minerais e elementos traços (MABEAU *et al.*, 1992).

As algas podem ser consideradas como uma fonte potencial de nutrientes, visto que elas usualmente contêm grandes quantidades de proteínas e carboidratos (MABEAU *et al.*, 1992; BENEVIDES *et al.*, 1998a; RAMOS *et al.*, 1998).

Algumas algas marinhas contêm quantidades significativas de vitaminas A, B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), C e, especialmente, B<sub>12</sub> (CHAPMAN, 1970; DARCY-VRYLLON, 1993; PEREIRA, 2000) e apresentam, na sua composição de aminoácidos, níveis elevados de arginina e grandes quantidades de aminoácidos não essenciais, tais como, aspártico, glutâmico, glicina e alanina (MABEAU *et al.*, 1992). Além disso, elas têm altos teores de iodo, justificando a baixa incidência de hipotireoidismo e bócio nas populações da costa asiática (ERICSON & LEWIS, 1953; YAMAGATA & YAMAGATA, 1972; ARASAKI & ARASAKI, 1983).

A composição química de algas marinhas do litoral de Hong Kong foi determinada e as análises indicaram que o valor nutricional das espécies estudadas (em termos do conteúdo de cinzas, lipídios e carboidratos) foi relacionado à sua posição sistemática e, que, de maneira geral, as algas pardas (Phaeophyta) apresentaram os maiores níveis de nutrientes, enquanto as algas verdes (Chlorophyta) e as coralináceas (Rhodophyta, Coralinaceae) foram de valor nutricional comparativamente menor (KAEHLER & KENNISH, 1996).

BENEVIDES *et al.* (1998a) verificaram que as algas marinhas vermelhas *Enantiocladia duperreyi*, *Amansia multifida*, *Hypnea musciformis*, *Solieria filiformis* e *Bryothamnion seaforthii* apresentaram níveis protéicos que variaram de 21,8% a 37,2%, mostrando que estas algas podem ser consideradas como fontes de proteínas comparáveis a várias sementes de leguminosas (SINGH & SINGH, 1992).

RAMOS *et al.*, (1998) estudaram 16 espécies de algas marinhas nativas da costa nordeste do Brasil e verificaram que embora possuam elevados níveis de umidade, estas algas apresentam grandes quantidades de proteínas. As espécies *Solieria filiformis* e *Caulerpa sertularioides* apresentaram um teor protéico acima de 20%. Por sua vez, a alga vermelha *Amansia multifida* mostrou-se rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobre em metionina e cisteína, enquanto a alga verde *Caulerpa sertularioides* apresentou alto conteúdo de leucina e de alanina, mas baixos níveis de aminoácidos sulfurados.

Ao estudarem o conteúdo de proteínas e seus aminoácidos constituintes em 14 espécies de algas marinhas do nordeste do Brasil, RAMOS *et al.*, (2000) observaram grande variação no teor protéico entre as espécies analisadas, variando de 2,3% (*Corallina officinalis*) a 25,6% (*Amansia multifida*). As espécies *Enantiocladia duperreyi*, *Solieria filiformis* e *Vidalia obtusiloba* apresentaram altos teores de aminoácidos ácidos e quantidades moderadas de aminoácidos essenciais, tendo a metionina como aminoácido limitante para a maioria das espécies. Todas as espécies analisadas mostraram-se ricas em fenilalanina, tirosina e treonina.

A análise de minerais da alga marinha vermelha *Amansia multifida*, revelou ser esta espécie uma importante fonte de fósforo e ferro, ao apresentá-los como seus principais constituintes (18% e 16% do total de cinzas, respectivamente). Por outro lado, também foi observada a presença de cálcio (0,8%) e magnésio (0,1%). O teor de vitamina C apresentado foi de 15,3 mg e o valor calórico total de 69,8 kcal para cada 100 g da amostra analisada (SILVEIRA, 2001).

Na França, dez espécies de algas marinhas foram liberadas para o consumo como legumes ou condimentos. Isto permitiu a venda de diferentes tipos de algas em lojas de alimentos naturais, bem como seu uso na indústria de alimentos, integrando as formulações de vários produtos, como sopas, saladas compostas e biscoitos (MABEAU *et al.*, 1992).

Além de seu uso como alimento, as algas têm sido utilizadas como complemento de rações, adubos sólidos ou líquidos, e fontes de produtos químicos diversos, dentre os quais se destacam certas mucilagens conhecidas como ficocolóides, ou colóides de algas. Estas últimas substâncias são classificadas em três grupos básicos em função de sua estrutura química e propriedades reológicas: os ágaros (ágar-ágar) ou agaranas, as carragenanas e os alginatos (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997). Nas TABELAS 1 e 2 são apresentadas algumas das principais aplicações para algas marinhas e seus constituintes.

Os alginatos e as carragenanas são usados extensivamente como espessantes e emulsificantes nas indústrias química e de alimentos, respectivamente. Sem agar e agarose (a fração eletricamente neutra), as pesquisas biológicas e biotecnológicas seriam substancialmente dificultadas (HARVEY, 1988).

Devido à persistência e toxicidade ambiental da maioria dos pesticidas sintéticos, vem crescendo o emprego agroquímico de algas marinhas. As algas pardas, em particular, contêm citocininas (compostos "homônio-like"), que regulam o crescimento das plantas. Elas são também utilizadas para aumentar o rendimento da colheita, reduzir a perda de frutos armazenados, melhorar a



absorção dos nutrientes e tornar saudável a pastagem do gado através de sua aplicação no tratamento do solo (HARVEY, 1988).

### 1.1.3- Propriedades Biológicas

Os oceanos são um complexo ambiente, com uma série de interações ambientais, biológicas e físico-químicas, onde muitos organismos marinhos possuem substâncias que são extremamente diferentes daquelas encontradas em vegetais terrestres. Assim, os oceanos parecem ser uma rica fonte de substâncias químicas, muitas ainda desconhecidas, com novas estruturas e atividades (HARVEY, 1988).

Investigações biológicas e químicas de ecossistemas marinhos, ao longo da última década, têm beneficiado tanto a pesquisa básica quanto a aplicada envolvendo o uso de substâncias provenientes do ambiente marinho (KÖNIG & WRIGHT, 1996).

REN *et al.* (1994) estudaram 26 espécies de algas marinhas e 6 polissacarídeos com relação a suas atividades antihipertensiva e antihiperlipidêmica. Quase todas as algas analisadas apresentaram estas atividades, sendo algumas das espécies analisadas comumente utilizadas como alimento. Além disso, foi demonstrado um aumento de 46% dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no soro sanguíneo, devido à presença de algas pulverizadas nas dietas fornecidas aos animais testados.

Com o objetivo de encontrar novas fontes de agentes antivirais com diferentes mecanismos de ação, extratos de 49 espécies de algas foram testados com relação a suas atividades contra os vírus do herpes simples (HSV) e da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Destes, 25 espécies mostraram atividade anti-HSV e 8 espécies mostraram-se eficientes ao inibir a replicação do HIV (HAYASHI *et al.*, 1996).

SANTOS *et al.* (1999), ao estudarem a atividade antiviral dos extratos

TABELA 1 – Principais usos de colóides extraídos de algas marinhas

	Ágar	Carragenana	Alginatos
Microbiologia (meio de cultura)	X		
Indústria alimentícia (gelatina)	X	X	
Indústria têxtil (seda, voil, tule rayon)		X	X
Revestimento filamentosos (tungstênio)		X	
Indústria fotográfica		X	
Couros finos		X	X
Adesivos especiais	X	X	
Espessante de molhos e sopas		X	X
Estabilizante anti-preteçamento de alimentos	X		
Geléias	X	X	
Laxantes	X		
Suspensor (chocolate e antibióticos)		X	X
Emulsificantes		X	X
Cosmética (creme e sabão)		X	X
Cervejaria (clarificante, espuma)	X	X	
Vinho (clarificante)	X		
Inseticidas		X	X
Linóleo, couro e sedas artificiais		X	X
Polimento (suspensor)			X
Indústria de papéis	X	X	X
Sorvetes			X
Indústria de tintas			X
Encapsulação (biotecnologia e medicina)			X
Eletroforese (agarose)	X		
Indústria de laticínios		X	
Revestimento de eletrodos			X
Indústria de borracha			X
Medicina (sutura)			X

FONTE - Adaptada do Panorama da Aqüicultura (1997)

TABELA 2 – Algumas aplicações para algas marinhas e seus constituintes

Alga	Composto	Atividade
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Betainas	Pesticida para nematóides
<i>Bifurcaria galapagensis</i>	hidroquinona	Propriedades citotóxicas e antibacterianas; agente anticâncer
Bonnemaisoniaceae	brometo e/ou iodeto; halogênios contendo cetonas	Atividade antibiótica <i>in vitro</i>
<i>Chondrus dumontiaceae</i>	Polissacarídeo sulfatado	Agente contra <i>Herpes simplex</i>
Gelidium	agar; carragenana	Aditivo alimentar; meio de cultura
Gracilaria	agar; carragenana	Aditivo
Macrocystis	ácido algínico	Agente espessante industrial
Phaeophyta	citocininas	Regulador do crescimento de plantas
<i>Phaeocystis pouchetti</i>	ácido acrílico	Antimicrobiano
Porphyra	Nori	Alga comestível
<i>Spatoglossum schmittii</i>	"spatol"	Citotóxica para células cancerosas <i>in vitro</i>
<i>Styopodium zonale</i>	ortoquinona	Inibe divisão celular de células cancerosas <i>in vitro</i>
<i>Undaria pinnatifida</i>	não identificado	Estimula a atividade cardíaca, mas não a razão; combate o envenenamento por nicotina; antihipertensiva

FONTE - Adaptada de (HARVEY, 1988)

aquosos das algas marinhas *Ulva fasciata*, *Codium decorticatum*, *Padina gymnospora*, *Laminaria abyssalis*, *Sargassum vulgare*, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis* e *Vidalia obtusiloba*, coletadas na costa do Brasil, contra o HSV1, utilizando uma raça resistente ao acyclovir (análogo da guanosina que tem um notável sucesso no tratamento de infecções pelo vírus do herpes), observaram que todos os extratos foram capazes de inibir a propagação do vírus em células HEp-2, em concentrações não tóxicas, sendo o extrato de *Laminaria abyssalis* o mais potente inibidor.

O extrato aquoso da alga marinha vermelha *Polysiphonia desnudata*, coletada na costa da Bulgária, inibiu seletivamente a reprodução dos vírus do herpes tipos 1 e tipo 2 em culturas de células, mostrado pela redução do efeito citofágico induzido pelo vírus e da infectividade viral (SERKEDJIEVA, 2000).

WILLIAMS (1991) observou que o extrato metanólico da alga marinha vermelha *Liagora farinosa* exibiu ação acaricida sobre o gado parasitado por *Boophilus microphilus*, afetando a sobrevivência da fêmea, inibindo a oviposição e a embriogênese dos ácaros.

MAYER *et al.* (1993) realizaram estudos com algumas espécies de algas e verificaram que uma das acetogeninas (ácido 5-ino-7Z,9Z,12Z-octadeciltrienóico) presente no extrato da alga *L. farinosa* inibiu, *in vitro*, a ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) da peçonha de abelha (*Apis mellifera*).

MENDONÇA (1999) observou que o extrato da alga *L. farinosa* possui substâncias ativas capazes de inibir a inflamação tópica em orelha de camundongo.

Alguns estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo de algas marinhas, onipresentes no Japão, é um fator de proteção contra alguns tipos de câncer (CARPER, 1989).

Em estudos de citotoxicidade contra células leucêmicas de rata e células do fígado de macaco, BALLESTEIROS *et al.* (1992) testaram 36 espécies de algas vermelhas do Mediterrâneo. Oito exibiram citotoxicidade e 17 atividade antimetabólica, verificando-se os melhores resultados com as espécies *Polyssonnelia rosa marina* e *Polyssonnelia bornetti*.

Estudos com o extrato orgânico da alga marinha vermelha *Portieria homemannii* revelaram a presença de compostos citotóxicos, os quais foram capazes de inibir a proliferação de células tumorais humanas *in vitro* (FULLER *et al.*, 1992).

Em experimentos *in vitro* com a alga marinha vermelha *Marginisporum crassissimum*, HIROISHI *et al.* (2001) observaram que os extratos desta alga inibiram não somente o crescimento de várias linhagens de células tumorais, como as B16-BL6 (células de melanoma em camundongo), JYG-B (células de carcinoma mamário em camundongo) e JPL-1 (células de carcinoma mamário em humanos), e também inibiram a invasão de células B16-BL6 em um sistema de cultura. Em experimentos *in vivo*, a metástase no pulmão de células B16-BL6 inoculadas pela veia da cauda de camundongos B57BL/6J foi inibida pela administração intraperitoneal de extratos da alga. Uma substância, efetiva inibidora do crescimento de células B16-BL6 *in vitro*, foi parcialmente purificada por cromatografias em colunas de filtração em gel e de interação hidrofóbica e mostrou-se sensível ao tratamento térmico e à ação enzimática da tripsina. A massa molecular da substância foi determinada, sendo maior que 100,0 kDa.

O potencial biológico das substâncias presentes em algas marinhas é ainda pouco estudado, embora já se tenha idéia da enorme diversidade destes compostos e de sua comprovada aplicabilidade nas mais diferentes áreas da pesquisa científica.

## 1.2. Proteínas Tóxicas e/ou Antinutricionais em Vegetais

Os vegetais são conhecidos por conterem uma série de componentes tóxicos e/ou antinutricionais, com diferentes naturezas químicas, como as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), os inibidores de proteases, as lectinas, as toxinas, os alérgenos e ureases, todos de natureza protéica. Além destes, podem ocorrer também compostos de natureza não protéica, como os

taninos, os fitatos, os alcalóides, os glicosídeos cianogênicos, os oxalatos e os fatores de flatulência, dentre outros.

Até o final do século XIX, acreditava-se que o efeito tóxico de alguns vegetais era consequência da contaminação de sementes por toxinas bacterianas e, somente após inúmeras investigações, ficou estabelecida a distinção entre uma intoxicação de origem bacteriana daquela induzida por componentes tóxicos presentes nas sementes.

Estudos realizados por WARDEN & WADDEL (1884) demonstraram que a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* era devida a uma fração protéica obtida por precipitação do extrato aquoso com álcool, denominada abrina.

DIXSON (1887) obteve, a partir de sementes de *Ricinus comunis*, uma fração altamente tóxica, denominada ricina. Posteriormente, STILLMARK (1888) observou que os extratos tóxicos *Ricinus communis* aglutinavam eritrócitos. Outros estudos demonstraram que as toxinas de vegetais, crotina (STILLMARK, 1888), abrina (HELLIN, 1891) e robina (POWER & CAMBIER, 1890) também exibiam propriedades hemaglutinantes.

Inicialmente, pensava-se que o mecanismo de ação tóxica dessas proteínas fosse decorrente de propriedades hemaglutinantes de seus extratos protéicos. Mas, já está bem estabelecido que a atividade hemaglutinante está associada a lectina, enquanto a fração protéica tóxica apresenta fraca ou nenhuma atividade hemaglutinante (OLSNES *et al.*, 1974). Algumas toxinas protéicas vegetais (ricina e abrina) apresentam semelhanças estruturais com as lectinas, mesmo possuindo distintos mecanismos de ação. Ao contrário das lectinas, no entanto, as proteínas tóxicas contêm apenas um sítio de ligação para carboidratos, sendo por isso denominadas hemilectinas (CARLINI *et al.*, 1988; CARLINI & GUIMARÃES, 1991). Essas proteínas produzem apenas aglutinação indireta de células. Esse processo é mediado por anticorpos e, como as lectinas, pode ser inibido por excesso do açúcar específico.

Além da ricina e abrina, várias proteínas tóxicas de vegetais, são conhecidas como proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), em decorrência de sua atividade inibitória sobre a síntese protéica em células eucarióticas. Algumas

destas proteínas, podem ligar-se e penetrar nas células, comportando-se como uma das substâncias mais tóxicas conhecidas. Entretanto, a maioria delas é incapaz de penetrar em células sadias, sendo, portanto, fracamente citotóxicas (HARTLEY & CHADDOCK, 1996).

Os vegetais possuem também outros fatores protéicos, que são potentes inibidores de enzimas digestivas como a tripsina, quimiotripsina,  $\alpha$ -amilase ou lipase (LIENER, 1989; NORTON, 1991; WHITAKER, 1997). Se consumidos, esses inibidores de enzimas possuem o potencial para reduzir ou prevenir a digestão de nutrientes e, possivelmente, prejudicar o metabolismo do corpo, o crescimento e a saúde (LIENER, 1989; GRANT *et al.*, 1998).

É importante a distinção entre componentes tóxicos e antinutricionais, visto que os tóxicos agem de forma aguda, produzindo lesões nos órgãos e tecidos, bem como alterações fisiológicas que resultam em enfermidades, podendo, inclusive, causar a morte de pessoas ou animais que os ingerem. Já os componentes antinutricionais são aqueles que, embora não causem alterações teciduais e fisiológicas evidentes, atuam diminuindo a eficiência metabólica e interferindo com a utilização dos nutrientes (SGARBIERI, 1996).

Devido ao fato das proteínas serem nutrientes essenciais aos organismos animal e humano, deve-se levar em consideração, além de seu conteúdo e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, sua toxicidade e/ou propriedades antinutricionais (1990; SGARBIERI, 1996).

Um outro fator importante é que o potencial de aplicação destas proteínas que exibem atividade tóxica é grande e tem estimulado o crescimento das investigações a seu respeito. Os estudos bioquímicos e biológicos desses compostos contribuem para o melhoramento das espécies, bem como a utilização de tais constituintes nas mais diversas áreas, como agricultura, medicina, imunologia, toxicologia, entre outras (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

### 1.2.1. Lectinas

As lectinas são um grupo de proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imune, que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos, particularmente a estrutura glicídica de glicoconjugados, resultando em aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Posteriormente, as lectinas foram definidas como proteínas que possuem, pelo menos, um domínio não catalítico que liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Com o objetivo de obter uma melhor definição para estas proteínas, CUMMINGS (1997) afirmou que anticorpos ou proteínas com atividade enzimática voltada para carboidratos não podem ser considerados lectinas.

PEUMANS & VAN DAMME (1995) dividiram as lectinas em três grupos:

1. Merolectinas - são proteínas pequenas que possuem exclusivamente um único domínio ligante a carboidrato e, portanto, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um típico exemplo de merolectina já isolada pode ser observado na lectina quitina-ligante do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (VAN PARIJS *et al.*, 1991);
2. Hololectinas - são moléculas protéicas que consistem de, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar. As hololectinas são usualmente designadas como moléculas di ou multivalentes, capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados e, atualmente, representam um dos grupos mais estudados de lectinas;
3. Quimerolectinas - são proteínas descritas como moléculas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos, associado(s) a outro domínio distinto bem definido que possui atividade enzimática ou outra atividade biológica qualquer e sua ação independe do domínio ligante a carboidrato. Como exemplos desse grupo, podemos citar as quitinases pertencentes à classe I e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2.



Mais recentemente, VAN DAMME *et al.*, (1998) sugeriram a existência de mais uma classe de lectinas, as superlectinas, composta de proteínas de natureza quimérica que consistiriam de, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, estruturalmente diferentes e que reconhecem carboidratos distintos. Um exemplo da ocorrência de superlectina foi observado na lectina isolada de tulipa, TxLCI, que consiste de uma molécula que apresenta um domínio ligante a manose e um domínio ligante a N-acetilgalactosamina.

Do ponto de vista estrutural, as lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular, bem como na constituição de seus sítios de reconhecimento (SHARON & LIS, 1998). A grande variabilidade de associações quaternárias, resultante de pequenas alterações em sua estrutura terciária, é uma propriedade exibida pelas lectinas. As estratégias usadas pelas lectinas para gerar sua especificidade por carboidratos incluem a formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água, modificações pós-translacionais e oligomerizações (VIJAYAN & CHANDRA, 1999).

Atualmente, lectinas são o foco de muitos estudos, pelo fato de atribuir-se a elas, devido às suas propriedades de reconhecimento, ação determinante em diversos processos biológicos. Estes incluem a liberação de glicoproteínas do sistema circulatório, o controle do tráfego intracelular de glicoproteínas, a adesão de agentes infecciosos em células hospedeiras, o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios, bem como as interações celulares no sistema imune, em malignidades e metástases (SHARON & LIS, 2001).

Lectinas nativas, muitas delas comercialmente disponíveis, são usadas predominantemente em aplicações que se baseiam em reações de precipitação e aglutinação, ou para estimulação mitogênica de linfócitos. Lectinas acopladas a corantes fluorescentes, partículas de ouro ou enzimas são usadas como ferramentas histoquímicas em investigações de carboidratos marcadores de células cancerosas. Estas proteínas também têm sido usadas para demonstrar que receptores de membrana para hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores e toxinas são glicoconjugados (SHARON & LIS, 2001).

A lectina da soja é utilizada para a purificação da medula óssea humana para transplante pela aglutinação seletiva de células T maduras presentes na medula. Estas células são responsáveis pela histo-incompatibilidade que ocorre neste tipo de transplante (SHARON & LIS, 2001).

Algumas lectinas apresentam características diferenciadas das demais, como é o caso das lectinas de *Abrus precatorius*, abrina (HELLIN, 1991) e de *Ricinus communis*, ricina (STILLMARK, 1888), que exibem uma acentuada atividade tóxica, promovida pela inativação dos ribossomos.

A detecção de lectinas altamente tóxicas em tecidos e órgãos de plantas não relacionadas tem sido largamente relatada (OLSNES *et al.*, 1982; VASCONCELOS *et al.*, 1994; GIRBÉS *et al.*, 1996; SANTOS, 2001). A principal característica de lectinas tóxicas é a sua potente e altamente específica atividade enzimática sobre a subunidade 28S do RNA ribossômico eucariótico, bloqueando a síntese protéica e levando a célula à morte (ENDO & KUNIO, 1987; ENDO *et al.*, 1991).

RAMOS *et al.* (1997) isolaram e caracterizaram parcialmente, uma lectina altamente tóxica, presente nas sementes de *Abrus pulchellus*. A lectina tóxica, que aglutinou eritrócitos de coelho, apresentou uma forte atividade tóxica *in vivo* quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos ( $DL_{50} = 31 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo) e quando testada com o microcrustáceo *Artemia salina* ( $DL_{50} = 3,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo).

Uma lectina tóxica, obtida de folhas da salsa (*Ipomea asarifolia*), aglutinou eritrócitos de coelho e foi inibida pelas glicoproteínas fetuína e avidina e pelo ácido N-acetil-D-neuramínico. Essa lectina foi altamente tóxica para camundongos, por via intravenosa ( $DL_{50} = 0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, precedendo a morte dos animais, sendo essa atividade dependente de grupos sulfidríla livres (SANTOS, 2001).

As propriedades citotóxicas exibidas por estas lectinas fazem delas reagentes ideais para a seleção de clones de células animais mutantes com carboidratos de superfície alterados. Tais mutantes fornecem uma excelente

ferramenta para a investigação da genética, biossíntese e função de glicoconjugados (SHARON & LIS, 2001).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em muitos organismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais (SHARON & LIS, 2001).

O primeiro relato da ocorrência de lectinas em algas marinhas foi feito por BOYD *et al.* (1966), que estudaram 24 espécies de algas tropicais. O extrato de *Spyridia filamentosa* aglutinou especificamente células do grupo sanguíneo A, enquanto seis espécies de algas pardas (*Dictyota bartayresii*, *D. cervicomis*, *D. divarticata*, *D. delicatula*, *Sargassum rigidulum* e *Padina vickersiae*) e uma espécie de alga azul (*Lynbya majuscula*) aglutinaram eritrócitos dos grupos A e O. Extratos da alga verde *Codium isthmocladum* e das algas pardas *Turbinaria turbinata* e *Sargassum natans* foram inespecíficos, aglutinando eritrócitos de humanos do sistema A BO.

BLUNDEN & ROGERS (1975) investigaram 105 extratos salinos, preparadas com algas secas e pulverizadas, oriundas da costa da Inglaterra e pertencentes às classes Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae. Os autores observaram que 18 espécies continham aglutininas que reconheciam, de forma não específica, eritrócitos humanos do sistema ABO. Entretanto, a espécie *Ptilota plumosa* continha uma aglutinina com atividade anti-B.

HORI *et al.* (1981) verificaram a presença de lectinas em 14 extratos de algas marinhas, dentre as 53 espécies estudadas. Os autores utilizaram eritrócitos de coelho, cavalo, ovelha, pato, galinha e do sistema humano ABO.

Utilizando extratos de cinco algas pardas e duas vermelhas, coletadas no Norte da Suécia, ANDERSON *et al.* (1986) observaram a presença de lectinas em todas as espécies testadas, frente a eritrócitos do sistema humano ABO, de rato, de cavalo e de ovelha.

AINOUZ & SAMPAIO (1991), ao estudarem a ocorrência de lectinas em algas marinhas do Nordeste brasileiro, verificaram que os extratos salinos de dez espécies aglutinaram eritrócitos de coelho, enquanto sete, seis e quatro extratos aglutinaram eritrócitos de galinha, boi e carneiro, respectivamente. Uma

aglutinação não específica de hemácias humanas foi observada para os extratos de duas algas vermelhas (*Gracilaria ferox* e *Hypnea musciformis*) e de uma alga verde (*Caulerpa cupressoides*).

FREITAS *et al* (1997) estudaram a ocorrência de lectinas em 30 espécies de algas marinhas do litoral do Nordeste brasileiro, utilizando eritrócitos nativos e enzimaticamente tratados de coelho, galinha, carneiro e humanos. A maioria dos extratos aglutinou pelo menos um dos eritrócitos testados. Eritrócitos de carneiro e de coelho foram os mais satisfatórios para a detecção da presença de lectinas.

Ao analisar os dados publicados sobre a presença de lectinas em algas marinhas, SAMPAIO (1997) constatou que apenas 700 espécies haviam sido examinadas e que em cerca de 57% delas observou-se a presença de lectinas. Levando-se em consideração que na natureza existem muitos milhares de espécies de algas, este número representa apenas uma pequena parcela da contribuição das algas marinhas para os estudos de detecção e isolamento de lectinas.

Estudos de variação sazonal da atividade hemaglutinante frente a diferentes eritrócitos (coelho, galinha e humano do sistema ABO) presente nos extratos das algas marinhas vermelhas *Gracilaria domingensis* e *Gelidium pusillum* revelaram que a lectina de *G. domingensis* somente foi detectada no mês de junho, enquanto a lectina de *G. pusillum* foi observada durante o período de fevereiro até junho (BENEVIDES *et al.*, 1999).

O isolamento de lectinas de algas marinhas é geralmente iniciado pela extração de proteínas solúveis do material biológico com o uso de soluções salinas tamponantes. Após a obtenção destes extratos protéicos, essas proteínas passam por uma série de etapas que podem estender-se desde precipitações salinas das mesmas ao emprego de variados procedimentos cromatográficos, sejam eles de filtração, troca iônica ou afinidade.

Os procedimentos cromatográficos de troca iônica são de grande utilidade para o isolamento de lectinas de algas marinhas, sendo geralmente utilizada, isoladamente ou em combinação com outras cromatografias. As lectinas

das algas marinhas vermelhas *Plumaria elegans* e *Ptilota serrata* foram isoladas pela combinação dos procedimentos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sepharcel e exclusão molecular em Bio Gel P-100 (ROGERS et al., 1990).

AINOUZ et al. (1995) purificaram as lectinas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum* pela aplicação da fração protéica de ambas em colunas cromatográficas de DEAE-celulose.

BENEVIDES et al. (1996) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose, seguida de procedimento cromatográfico de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B.

KAKITA et al. (1997) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria verrucosa* pela combinação dos procedimentos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-toyopearl 650M e filtração em gel em coluna de G3000PWx1.

Com o advento dos procedimentos cromatográficos de afinidade, o isolamento de lectinas de algas marinhas tornou-se mais eficiente, devido a sua maior conveniência, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato destas apresentarem uma maior segurança na pureza do material obtido. SAMPAIO et al. (1999) relataram um novo processo de isolamento para a lectina da alga marinha vermelha *Ptilota serrata*, utilizando uma técnica de cromatografia de afinidade, através da galactose presente na goma de guar reticulada. COSTA et al. (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi isolada por cromatografia de afinidade em gel de  $\alpha$ -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100 (BENEVIDES et al., 2001). OLIVEIRA et al. (2002) purificaram a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* utilizando procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar.

Em geral, as lectinas de algas apresentam baixa massa molecular (4,2 a 25 kDa) e são de natureza glicoprotéica. Além disso, não reconhecem açúcares

simples, sendo mais específicas para oligossacarídeos complexos, em especial glicoproteínas. A maioria das lectinas de algas marinhas não requer cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (ROGERS & HORI 1993). Estas proteínas ocorrem geralmente na forma monomérica e têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos e sulfurados (Cys e/ou Met), com ponto isoelétrico entre quatro e seis (SHIOMI *et al.*, 1981, HORI *et al.*, 1990).

A lectina da alga marinha vermelha *Enantiocladia duperreyi* aglutinou preferencialmente eritrócitos humanos do grupo O e sua atividade hemaglutinante apresentou dependência por cátions divalentes. Essa atividade foi inibida pelos açúcares simples D-fucose, D-galactose e por alguns de seus derivados, e também pela glicoproteína mucina do estômago do porco. A lectina apresentou uma massa molecular aparente de 24,7 kDa por filtração em gel e de 16,07 kDa por PAGE-SDS (BENEVIDES *et al.*, 1998b).

A lectina da alga marinha verde *Ulva lactuca* aglutinou eritrócitos de vários animais e hemácias humanas. A sua atividade hemaglutinante foi inibida pelos açúcares L-fucose e fucoidan, e pelas glicoproteínas mucina do estômago do porco e mucina da glândula do submaxilar bovino. Essa proteína foi estável diante de variações de pH e temperatura e dependente de cátions divalentes para sua atividade biológica. Sua massa molecular, determinada por filtração em gel, foi de 8,4 kDa, enquanto PAGE-SDS mostrou uma única banda com uma massa molecular aparente de 17,1 kDa. A lectina mostrou-se rica em aminoácidos acídicos e hidroxilados, mas pobre em aminoácidos básicos (SAMPAIO *et al.*, 1998).

A lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* teve sua estrutura primária definida através de uma combinação dos métodos de degradação de Edman e espectrometria de massa. Sua estrutura é composta de 91 resíduos de aminoácidos e não se mostrou similar a nenhuma outra lectina de planta ou animal. Os resíduos de aminoácidos mais abundantes foram os de glicina e serina (CALVETE *et al.*, 2000).

Paralelamente, HORI *et al.* (2000) determinaram a estrutura primária de duas lectinas, denominadas hypninas A-1 e A-2, obtidas da alga marinha vermelha

*Hypnea japonica*. Ambas as aglutininas eram polipeptídeos de cadeia única, compostas de 90 resíduos de aminoácidos, incluindo quatro meias-cisteínas envolvidas em duas ligações dissulfeto intracadeias. A estrutura primária das lectinas diferia com relação à posição de três resíduos apenas: Pro<sup>19</sup>, Arg<sup>31</sup> e Phe<sup>52</sup> de hypnina A-1 e Leu<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup>, Tyr<sup>52</sup>.

Os estudos envolvendo lectinas de algas marinhas têm se intensificado ao longo dos últimos anos e padrões de características começam a aparecer. A maioria das lectinas de algas marinhas é de pequeno tamanho quando comparadas com aquelas derivadas de plantas terrestres e essa característica pode fazer dessas proteínas moléculas mais apropriadas para o uso como mísseis biológicos, pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica (ROGERS & HORI, 1993).

Em estudos conduzidos por BIRD *et al.* (1993), as lectinas das algas marinhas *Gracilaria tikvahiae*, *G. verrucosa* e *Ulva rigida* foram capazes de induzir a mitose em esplenócitos de camundongo e linfócitos do sangue periférico humano.

Algumas lectinas de algas marinhas mostraram-se mitogênicas frente a linfócitos, como por exemplo, as isoladas de *Carpopeltis flabellata* (HORI *et al.*, 1987), *Solieria robusta* (HORI *et al.*, 1988b), *Gracilaria bursa-pastoris* (OKAMOTO *et al.*, 1990) e *Amansia multifida* (LIMA *et al.*, 1998).

As lectinas das algas marinhas vermelhas *Amansia multifida*, *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum* e *Gracilaria caudata* induziram a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. O influxo máximo de neutrófilos foi determinado pela lectina de *B. triquetrum* em ratos e pela lectina de *A. multifida* em camundongos. Máxima quimiotaxia de neutrófilos humanos foi obtida com a lectina de *G. caudata*. O açúcar D-manose foi um forte inibidor, especialmente da atividade da lectina de *B. triquetrum in vivo* e *in vivo* (NEVES *et al.*, 2001).

VIANA *et al.* (2002) relataram uma atividade antinociceptiva presente nas frações protéicas extrato bruto, F0/60 (obtida por precipitação protéica com sulfato de amônio até 60% de saturação) e lectina, das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*. Os autores demonstraram que estas

frações inibiram contrações abdominais em ratos que haviam sido induzidas por aplicação prévia de ácido acético ou formalina por vias ip. e oral nestes animais. Os autores observaram ainda, que os efeitos inibitórios das lectinas testadas foram total ou parcialmente revertidos por aplicação do naloxone por via subcutânea. Foi demonstrado ainda, que experimentos conduzidos com as referidas lectinas na ausência e presença da glicoproteína avidina e do monossacarídeo D-manose por via ip., que a avidina não foi capaz de interferir com o efeito da lectina de *B. seaforthii*, mas foi eficiente em reverter parcialmente o efeito da lectina de *B. triquetrum*, enquanto, a D-manose reverteu completamente os efeitos de ambas as lectinas.

Estudos envolvendo o emprego biológico e clínico de lectinas de algas marinhas vem se intensificando, embora se saiba que muito conhecimento deverá ainda ser adquirido para que se possa aproveitar todo o potencial destas biomoléculas.

#### 1.2.2. Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)

As proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) de planta são um grupo de enzimas RNAr N-glicosidases, que inibem a síntese protéica por agir removendo, com especificidade, uma adenina universalmente conservada na posição A<sub>4324</sub> de ribossomo de ratos (STIRPE & BARBIERI, 1986). O mecanismo de ação destas proteínas consiste em sua ação N-glicosidásica, clivando a base de adenina situada na posição A<sub>4324</sub> do RNA ribossômico da subunidade 60S. Isto resulta na incapacidade do ribossomo de ligar-se ao fator de alongação-2 durante a síntese protéica, impedindo que esta se complete (STIRPE *et al.*, 1992).

As RIPs são amplamente distribuídas entre os vegetais superiores (MEHTA & BOSTON, 1998) e são, geralmente, classificadas em dois grupos: as RIPs tipo 1, que apresentam uma única cadeia polipeptídica e, as RIPs tipo 2, que são diméricas (STIRPE *et al.*, 1992).



As RIPs do tipo 1 são geralmente glicoproteínas, com massa molecular em torno de 30 kDa e pl freqüentemente básico (acima de 9,5). Elas possuem apenas uma subunidade catalítica e apresentam, portanto, uma citotoxicidade relativamente baixa (HARTLEY & CHADDOCK, 1996). A primeira RIP do tipo 1 purificada e parcialmente caracterizada foi a PAP ("pokeweed"), obtida de folhas de *Phytolacca americana*. Esta RIP possui propriedades antivirais, prevenindo a infecção causada pelo vírus do mosaico do tabaco (IRVIN, 1975). Algumas RIPs do tipo 1 têm sido mostradas como inibidoras do crescimento de fungos (ROBERTS & SELITRENNIKOFF, 1986). Igualmente, elas têm sido estudadas com relação a suas propriedades inseticidas contra coleópteros e lepidópteros (VERMA & KYMAR, 1979; GATEHOUSE *et al.*, 1990). As RIPs do tipo 1 isoladas das raízes de *Mirabilis expansa*, denominadas de ME1 e ME2, exibiram atividade antifúngica contra *Pythium irregulare*, *Fusarium oxysporum solani*, *Alternaria solani*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*. Uma atividade antibacteriana destas proteínas também foi observada contra *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, e outros (VIVANCO *et al.*, 1989). A saporina, uma RIP do tipo 1 isolada de *Saponaria officinalis*, é uma potente inibidora do vírus da AIDS e o seu mecanismo de ação parece ser exercido através da inibição da enzima HIV-1 integrase (AU *et al.*, 2000).

Nas RIPs do tipo 2, suas subunidades (cadeias A e B) são ligadas por ponte dissulfeto. Sua massa molecular é em torno de 60 kDa e seu pl varia entre 4,8 e 8,0. A cadeia A (efetômero) é responsável pela inativação enzimática dos ribossomos, enquanto a cadeia B (haptômero), cataliticamente inativa, possui a capacidade de ligar-se a glicídios (galactose) presentes na superfície celular e está envolvida no processo de internalização da molécula ativa na célula, de modo a atingir seu alvo (ENDO *et al.*, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995). As RIPs do tipo 2 são capazes de atuar em células intactas, sendo portanto bem mais citotóxicas que as RIPs do tipo 1. A ricina, uma RIP do tipo 2 presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis*), apresenta uma  $DL_{50} = 3,0 \mu\text{g/Kg}$  de peso de camundongo (LORD *et al.*, 1994).

As RIPs são compartimentalizadas em vacúolos e parede celular, e isso aparentemente permite que a atividade de inibição da síntese protéica permaneça isolada de seus ribossomos (KATAOKA *et al.*, 1991). Elas podem ser liberadas ou induzidas em resposta a infecções patogênicas ou injúrias. Essa aparente atividade de defesa é usualmente coordenada com outras proteínas de defesa, como as quitinase (LEAH *et al.*, 1991),  $\beta$ -1,3 glucanases (MAUCH *et al.*, 1988a) e taumatinas (HEJGAARD *et al.*, 1991).

Estudos com a tricosantina, que é uma RIP do tipo 1 isolada das raízes de *Trichosanthes kirilowii*, sugeriram que a expressão dessa RIP é coordenada (SAVARY & FLORES, 1994). Entretanto, a clara função de RIPs em vegetais tem ainda de ser elucidada (VIVANCO *et al.*, 1989).

Algumas RIPs têm sido usadas na construção de moléculas tóxicas ou imunotoxinas direcionadas a antígenos tumorais (KREITMAN & PASTAN, 1998). Uma imunotoxina preparada com a cadeia A da ricina foi capaz de destruir seletivamente células de melanoma provenientes do homem, associadas ao antígeno p197 (CASELAS *et al.*, 1982). O anticorpo OKT1 foi conjugado com a saporina e o complexo mostrou-se citotóxico para células alvo com uma  $CI_{50} = 60$  ng/ml (KREITMAN & PASTAN, 1998).

### 1.2.3. Inibidores de Proteases

A natureza e a concentração dos inibidores de enzimas presentes em vegetais variam significativamente com a espécie, estação do ano e estado fisiológico da planta. Esses inibidores geralmente estão presentes em altas concentrações na maioria dos vegetais, em particular em sementes de legumes, batatas e cereais (LE GUEN & BIRK, 1993; WHITAKER, 1997).

Proteínas inibidoras de tripsina e quimiotripsina estimulam a excreção de nitrogênio endógeno, prejudicam a utilização de nutrientes e reduzem a razão de crescimento quando ingeridas em grandes quantidades por animais jovens.

Entretanto, elas parecem ter um pequeno efeito sobre animais maiores, incluindo ruminantes. Inibidores de proteases induzem a liberação de colecitocininas e a secreção de enzimas pancreáticas em humanos. (GRANT, 1999).

Os inibidores de tripsina, também conhecidos como inibidores de proteases serínicas, são os mais bem conhecidos exemplos de inibidores de enzimas digestivas animais presentes em plantas. Em leguminosas, são divididos em dois tipos: Bowman-Birk e Kunitz. Os inibidores do tipo Bowman-Birk caracterizam-se por apresentarem pequena massa molecular (8 a 9 kDa) e elevado conteúdo de cisteína, formando sete pontes dissulfeto intracadeias. Estes inibidores são considerados de dupla-cabeça, por apresentarem capacidade de formar complexos estequiométricos com enzimas, inibindo diferentes proteinases, usualmente tripsina e quimiotripsina. Os inibidores da família Kunitz são de cadeia monomérica, com massa molecular em torno de 21 kDa, contendo quatro resíduos de cisteína, os quais formam duas pontes dissulfeto. Estes inibidores são considerados de cabeça única, sendo específicos para tripsina (NORTON, 1991).

Os inibidores de protease possuem múltiplas funções fisiológicas, entre as quais está a regulação de proteínas endógenas, reserva protéica e defesa. Algumas plantas contêm inibidores de proteases com função reguladora, por apresentarem proteínas que são insensíveis a inibidores endógenos. Os inibidores de proteases que atuam como reserva protéica, em sementes e raízes tuberosas, são mobilizados ao longo da germinação e do brotamento (D'MELO *et al.*, 1991).

O uso de genes que codificam inibidores de proteases para conferir resistência a plantas contra insetos tem sido bem documentado (JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998). A habilidade dos inibidores de protease em interferir com o crescimento e desenvolvimento de insetos tem sido atribuída à sua capacidade de se ligar e, assim, inibir a ação de proteases digestivas de insetos (JONGSMA & BOLTER, 1997).

Várias proteínas de plantas, capazes de inibir o crescimento de fungos *in vitro* têm sido isoladas e caracterizadas. Entre essas proteínas, genericamente chamadas de proteínas antifúngicas (PAFs), glucanases e quitinases (MAUCH *et al.*, 1995), proteínas "taumatin-like" (HEJGAARD *et al.*, 1991; VIGERS *et al.*, 1991;

WOLOSHUK et al., 1991), vários peptídeos básicos ricos em cisteína (BROEKAERT et al., 1996), proteínas ligantes a quitina (RAIKHEL et al., 1993), proteínas inativadoras de ribossomos (LEAH et al., 1991) inibidores de proteinase (TERRAS et al., 1993) são encontrados.

Uma proteína com massa molecular de 16 kDa, isolada das flores de girassol (*Helianthus annuus*), inibiu a germinação de esporos de fungos. Esta proteína, denominada SAP16, exibiu também uma inibição da enzima tripsina. A SAP16 causou uma completa inibição da germinação de *Sclerotinia sclerotiorum* a uma concentração de 5 µg/ml (0,31 µM) e também reduziu o crescimento dos micélios a baixas concentrações, indicando uma potente ação antifúngica contra este patógeno natural do girassol (GIUDICI et al., 2000).

ISHIHARA et al., (1968) reportaram a presença de inibidores de tripsina em duas espécies de algas marinhas japonesas, os quais foram estáveis a altas temperaturas e capazes de exercer sua atividade inibidora em um intervalo de pH entre 2 e 9.

PEREZ-LÓRENZO et al., (1998) ao estudarem a presença de lectinas, taninos e inibidores de protease em algas marinhas da costa venezuelana, observaram a presença de inibidores de tripsina nas algas marinhas *Padina gymnospora* (Phaeophyta) e *Acantophora spicifera* (Rhodophyta).

#### 1.2.4. Toxinas

Uma outra classe de proteínas tóxicas ainda pouco estudada é a das neurotoxinas, cuja ação é exercida sobre o sistema nervoso central (SNC). Algumas destas toxinas já foram estudadas, como é o caso da canatoxina (CARLINI & GUIMARÃES, 1981) e da soyatoxina (VASCONCELOS et al., 1994).

CARLINI & GUIMARÃES (1981) isolaram e caracterizaram parcialmente uma proteína tóxica convulsivante presente nas sementes de *Canavalia ensiformis*, diferente da concanavalina A (Con A). A semente desta

planta possui um princípio tóxico que, administrado em animais de experimentação por diversas vias, produz convulsão e morte, com uma  $DL_{50} = 2,0$  mg/kg de peso corpóreo do camundongo por via ip. A manifestação do fenômeno convulsivo é dependente da integridade da medula espinhal, provavelmente modulado por centros superiores do encéfalo e, precede, invariavelmente, a morte. A proteína tóxica, entretanto, não apresenta qualquer atividade sobre preparações farmacológicas em músculos isolados, mostrando que os efeitos tóxicos têm, provavelmente, origem central. Este agente tóxico apresenta propriedades de uma macromolécula, caracterizando-se como uma proteína termolábil, solúvel em água e soluções salinas diluídas, altamente instável sob diversas condições experimentais e com peso molecular variando entre 85 e 170 kDa, de acordo com o seu estado de agregação. A canatoxina apresentou, ainda, várias ações farmacológicas, como indução de hipertensão, bradicardia, hipotermia e redução dos níveis cerebrais dos neurotransmissores, noradrenalina e serotonina.

A proteína tóxica presente nas sementes de soja (*Glycine max* L.), soyatoxyna, foi purificada e caracterizada por VASCONCELOS *et al.*, (1994). O procedimento de purificação consistiu basicamente de fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografias de troca iônica e de afinidade em coluna de goma de guar e de Sepharose 4B-anidotripsina, sendo as últimas para a remoção da lectina e de inibidores de tripsina da soja, respectivamente. Esta toxina é uma proteína acídica de uma única cadeia, com  $pI$  entre 4,4 e 4,6, massa molecular em torno de 21 kDa e dependente de grupos sulfidríla livres para manter sua solubilidade e atividade biológica. A soyatoxina é uma metaloproteína que contém ferro, cálcio, zinco e magnésio, e sua estabilidade é influenciada pela temperatura de estocagem e pH do meio. Esta proteína é altamente tóxica para camundongos ( $DL_{50} = 7-8$  mg/kg de peso corpóreo) por via ip., mostrando-se também ativa pelas vias iv., im e sc, produzindo dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas que precedem a morte do animal. Esta toxina está imunologicamente relacionada à canatoxina e algumas propriedades biológicas, incluindo ensaios de toxicidade em camundongos, barbeiros, microcrustáceos (*Artemia* sp.) e bactérias, reação de

secreção em macrófagos, mitogenicidade, efeito inibitório sobre a síntese protéica em células de câncer de laringe, imunorreatividade "canatoxin-like", hemaglutinação, atividade inibitória de tripsina e indução da secreção e agregação plaquetária permitiram diferenciá-la da toxina e dos inibidores de tripsina da soja.

VASCONCELOS *et al.*, (1997) estudaram os efeitos tóxicos de cinco cultivares brasileiros (Bays, BR-10, Rio Balsas, Seridó e Tropical) e observaram que os extratos brutos das sementes de Bays, BR-10, Seridó e Tropical foram altamente tóxicos para camundongos entre 1 e 12 horas, dependendo da via de administração (ip., im. ou sc). Os efeitos agudos foram muito similares àqueles produzidos pela soyatoxina.

Uma proteína neurotóxica e também exibindo propriedades lectínicas foi isolada da folha da salsa (*Ipomoea asarifolia*) e estudada com relação aos seus aspectos bioquímicos e funcionais. Esta proteína foi altamente tóxica para camundongos por via iv. (DL<sub>50</sub> = 0,2 mg/kg de peso corpóreo), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida que precederam a morte dos animais, sendo esta atividade dependente de grupos sulfidrilas livres. A fração contendo esta toxina exibiu ação inseticida contra larvas de gorgulho (*Callosobruchus maculatus*), que ataca o feijão-de-corda ou caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), particularmente quando armazenado, sugerindo um possível papel fisiológico de defesa (SANTOS, 2001).

#### 1.2.5. Toxinas de Algas Marinhas

Estudos voltados para detecção, isolamento e caracterização de substâncias que exibem atividade tóxica para células e/ou animais, através de diferentes mecanismos, vêm sendo intensificados devido não só à sua possível presença em alimentos vegetais (frutas, legumes, cereais, algas etc.) e consequente interferência do ponto de vista antinutricional e/ou letal, mas também pela crescente utilização dessas proteínas acopladas a outras moléculas, de modo

a atuarem como mísseis biológicos específicos voltados para a destruição de células defeituosas.

As algas marinhas, assim como os vegetais, produzem metabólitos secundários (terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifenóis), diferindo somente na incorporação de halogênios em seus compostos e por produzirem alcalóides contendo nitrogênio. Esses metabólitos, freqüentemente, são espécie ou gênero-específicos, podendo ser utilizados como critérios quimitaxonômicos na separação de espécies morfológicamente semelhantes dentro de um mesmo habitat (HAY *et al.*, 1987; FENICAL, 1982; HAY & FENICAL, 1988).

VALLS *et al.*, (1994) isolaram da alga marinha verde *Caulerpa taxifolia*, um lipídeo neurotóxico denominado "caulerpenyne".

A presença de substâncias tóxicas em algas pode estar relacionada a uma função de proteção contra a ação destruidora de predadores naturais, os quais competem entre si por alimentos e por outros fatores de sobrevivência.

Pesquisas envolvendo a detecção e o isolamento de proteínas que exibem algum tipo de atividade tóxica em algas marinhas são recentes e foram iniciados por SILVA (1997), onde uma proteína tóxica para camundongos por via *ip.*, presente na alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba*, foi parcialmente purificada, mostrando-se distinta da lectina, apresentando uma banda protéica em torno de 40 kDa por PAGE-SDS.

Posteriormente, BENEVIDES *et al.*, (1998a), ao estudarem a ocorrência de proteínas tóxicas em algas do litoral do Nordeste brasileiro, analisaram dez espécies pertencentes às famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hipneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae. Os autores observaram que nove das dez espécies de algas vermelhas testadas tiveram seus extratos dialisados que se revelaram fortemente tóxicos para camundongos quando injetados por via intraperitonal, em um período de 8 a 20 horas. Por outro lado, todas as frações protéicas precipitadas até 60% de saturação com sulfato de amônio sólido (F 0/60) exibiram toxicidade para camundongos.

SILVEIRA (2001) observou que o extrato bruto da alga marinha vermelha *Amansia multifida* era altamente tóxico para camundongos dentro do período de 24 horas por via ip. ( $DL_{50} = 2,4$  mg/kg de peso corpóreo do animal). A toxina foi purificada por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio até 80% de saturação (F 0/80), seguida de cromatografia de afinidade em coluna de manana-Sepharose 4B e filtração em gel com Sephadex G-100. A toxina obtida é uma glicoproteína que apresenta 43,3% de açúcar em sua estrutura e mostrou-se distinta da lectina atóxica, exibiu uma estrutura monomérica com massa molecular aparente de 19 kDa por filtração em gel com Sephadex G-100. Esta proteína não mostrou dependência por grupos sulfidrilas livres para manter sua solubilidade e atividade biológica, mantendo-se estável durante o processo de liofilização. A toxina mostrou-se fortemente ativa para camundongos ( $DL_{50} = 2,4$  mg/kg de peso corpóreo do animal por via iv.), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, que precederam a morte do animal.

### 1.3. Carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* é a única espécie do gênero que ocorre no Brasil parasitando principalmente os bovinos, podendo ser encontrado também, em menor número nos caprinos, ovinos, cães e às vezes no coelho FLECHTMANN (1985). O parasitismo pelos carrapatos produz danos aos bovinos de três maneiras: 1- Dano direto causado pela picada que provoca irritação local e predispõe o animal ao ataque de moscas produtoras de miíases. A pele irritada degenera para inflamação local servindo de acesso a agentes infecciosos secundários (FREITAS *et al.*, 1978). O desconforto provocado pelos carrapatos não permite que os bovinos pastem normalmente, reduzindo o consumo de alimentos e sua conversão em carne e leite. A inoculação da saliva do carrapato desencadeia uma relação alérgica, com a liberação de grande quantidade de histamina, responsável principal pela irritação (TATCHELL, 1987). Cada fêmea



pode sugar de 0,5 a 2,0 ml de sangue durante sua vida parasitária. São comuns infestações de milhares de carrapatos, que espoliam enorme quantidade de sangue bovino (FREITAS *et al.*, 1978); 2- Bovinos parasitados por carrapatos mostraram uma elevada redução na taxa de colesterol, no hematócrito e na hemoglobina (O'KELLY, SEEBECK & SPRINGELL, 1971); 3- Durante a sucção os carrapatos injetam substâncias tóxicas prejudiciais à saúde dos bovinos, podendo produzir uma paralisia do tipo ascendente, que se inicia pelos membros locomotores, atingindo em poucos dias todos os órgãos (FREITAS *et al.*, 1978). O *B. microplus* é responsável pela transmissão das doenças parasitárias babesiose e anaplasmosse, causadas pelos agentes vetores *Babesia bigemina*, *B. argentina* e *Anaplasma marginale* podendo, ainda, transmitir as febres maculosa, Q e a brucelose.

O *B. microplus* é um carrapato que utiliza um único hospedeiro para a sua evolução, no qual realiza suas mudas. O macho é encontrado fixo sob a fêmea, que após fertilizada e ingurgitada (teleógina) desprende-se do hospedeiro e dá início a postura de aproximadamente 3.000 ovos, que permanecem aglutinados e, no final da postura a fêmea morre recebendo a denominação de quenógina (FORTES, 1987).

O carrapato *B. microplus* tem sido alvo de intensos estudos nas regiões de maior incidência do globo terrestre, em consequência dos prejuízos que acarreta à pecuária bovina. O seu combate vem sendo feito quase exclusivamente através do uso de substâncias químicas utilizadas em sua fase parasitária (LARANJA *et al.*, 1986). A resistência do carrapato *B. microplus* aos carrapaticidas é um fenômeno genético irreversível que se instala em populações submetidas a uma grande pressão carrapaticida (FARIAS *et al.*, 2000). Essa resistência, tem sido motivo de preocupação por parte dos produtores e pesquisadores, visto que não existem mais produtos capazes de controlar eficientemente as populações de carrapatos (GOMES *et al.*, 2000). Como uma alternativa de baixar o custo e reduzir a toxicidade para o controle do *B. microplus*, PIZZARRO investigou a ação carrapaticida do extrato de *Agave americana*, da família *Agavaceae*, observando

que este possui atividade carrapaticida, afetando a postura e a fertilidade dos ovos (<http://www.fameve.ufu.br/vetnot/vetnot4/res4-19>).

2

Art. 1º. O presente projeto de lei estabelece as diretrizes gerais para a criação de cursos de graduação em Engenharia de Software, a serem oferecidos em instituições de ensino superior, de acordo com o disposto no inciso III do art. 206 da Constituição Federal de 1988.

2. OBJETIVOS

- ♦ O curso de graduação em Engenharia de Software terá como objetivo principal a formação de profissionais capazes de projetar, desenvolver, testar, manter e atualizar sistemas de software, bem como de gerenciar o processo de desenvolvimento de software.
- ♦ O curso de graduação em Engenharia de Software será ministrado em instituições de ensino superior, de acordo com o disposto no inciso III do art. 206 da Constituição Federal de 1988.
- ♦ O curso de graduação em Engenharia de Software será oferecido em instituições de ensino superior, de acordo com o disposto no inciso III do art. 206 da Constituição Federal de 1988.
- ♦ O curso de graduação em Engenharia de Software será oferecido em instituições de ensino superior, de acordo com o disposto no inciso III do art. 206 da Constituição Federal de 1988.

## 2. OBJETIVOS

R 13827537

## OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Purificar as proteínas, lectina e toxina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* e, avaliar os efeitos tóxicos dessas proteínas sobre camundongo e o ciclo vital do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

### 2.2. Específicos

- ❖ Caracterizar os componentes químicos da alga através da determinação da composição centesimal.
- ❖ Purificar as proteínas, lectina e toxina .
- ❖ Avaliar histoquimicamente os efeitos das proteínas lectina e toxina em diferentes órgãos de camundongos pós-morte.
- ❖ Analisar os efeitos tóxicos dos extratos bruto e aquoso, da toxina e lectina sobre as diferentes fases do ciclo evolutivo do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

### 3.1.1. *Il libro della memoria*

Il libro della memoria è un'opera di Elisabetta Invernizzi, pubblicata da Garzanti nel 2014. Si tratta di un'opera di divulgazione scientifica che esplora il tema della memoria e del suo ruolo nella vita umana. L'autrice, che è anche una ricercatrice in psicologia, affronta il tema della memoria attraverso una serie di capitoli che esplorano i meccanismi della memoria, le sue funzioni e il suo ruolo nella vita umana. Il libro è scritto in un linguaggio chiaro e accessibile, con un'attenzione particolare alla spiegazione dei meccanismi della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è diviso in tre parti principali: la prima parte si occupa della memoria a breve termine, la seconda parte della memoria a lungo termine e la terza parte della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è una lettura interessante per chiunque sia interessato alla psicologia e alla memoria.

### 3.1.2. *Il libro della memoria*

Il libro della memoria è un'opera di Elisabetta Invernizzi, pubblicata da Garzanti nel 2014. Si tratta di un'opera di divulgazione scientifica che esplora il tema della memoria e del suo ruolo nella vita umana. L'autrice, che è anche una ricercatrice in psicologia, affronta il tema della memoria attraverso una serie di capitoli che esplorano i meccanismi della memoria, le sue funzioni e il suo ruolo nella vita umana. Il libro è scritto in un linguaggio chiaro e accessibile, con un'attenzione particolare alla spiegazione dei meccanismi della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è diviso in tre parti principali: la prima parte si occupa della memoria a breve termine, la seconda parte della memoria a lungo termine e la terza parte della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è una lettura interessante per chiunque sia interessato alla psicologia e alla memoria.

### 3.1.3. *Il libro della memoria*

Il libro della memoria è un'opera di Elisabetta Invernizzi, pubblicata da Garzanti nel 2014. Si tratta di un'opera di divulgazione scientifica che esplora il tema della memoria e del suo ruolo nella vita umana. L'autrice, che è anche una ricercatrice in psicologia, affronta il tema della memoria attraverso una serie di capitoli che esplorano i meccanismi della memoria, le sue funzioni e il suo ruolo nella vita umana. Il libro è scritto in un linguaggio chiaro e accessibile, con un'attenzione particolare alla spiegazione dei meccanismi della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è diviso in tre parti principali: la prima parte si occupa della memoria a breve termine, la seconda parte della memoria a lungo termine e la terza parte della memoria e del suo ruolo nella vita umana. Il libro è una lettura interessante per chiunque sia interessato alla psicologia e alla memoria.

3. MATERIAL  
3. MATERIAL

## MATERIAL

### 3.1. Alga Marinha

A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* utilizada na realização deste trabalho foi coletada em rochas do meso-litoral durante marés de sizígia, na praia do Pacheco, município de Caucaia, Estado do Ceará. Esta espécie foi classificada botanicamente como pertencendo a divisão Rhodophyta, ordem Gigartinales, família Solieriaceae, Gênero Solieria, espécie *Solieria filiformis* e nome científico *Solieria filiformis* (Kütz.) P.W. Gabrielson (FIGURA 1).

### 3.2. Células Sanguíneas

Eritrócitos de coelhos foram obtidos de animais adultos da linhagem Nova Zelândia, mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará

### 3.3. Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), fêmeas, pesando de 18 a 25 gramas.

**Divisão: Rhodophyta**

**Ordem: Gigartinalis**

**Família: Solieriaceae**

**Gênero: Solieria**

**Espécie: *Solieria filiformis***

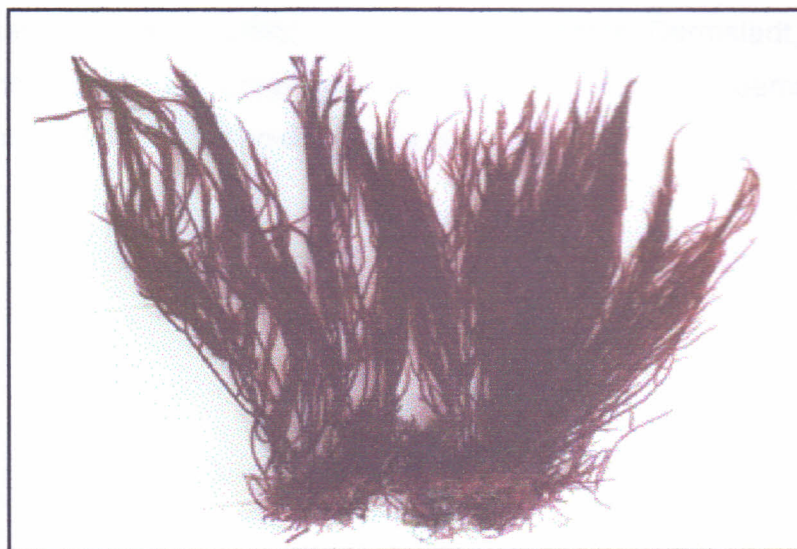


Figura 1 - Alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kutz.) P.W. Gabrielson

### 3.4. Carrapatos

Carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) - teleóginas retiradas de bovinos adultos, livres de resíduos de carrapaticidas, pertencentes ao rebanho da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

### 3.5. Reagentes

Acrilamida, N,N metileno bis-acrilamida, albumina sérica bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250, Sephadex G-100, Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio e manana foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA;  $\beta$ -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemanha); e tripsina (Pharmacia Fine Chemical, Inc. Upsala, Suécia). Os demais reagentes, obtidos comercialmente, foram de grau analítico.



### MÉTODOS

#### 4.1. Caracterização do estudo

Este estudo de caso foi desenvolvido no âmbito de um projeto de investigação científica, com o objetivo de avaliar o impacto ambiental de uma obra de infraestrutura. A metodologia utilizada foi a abordagem qualitativa, baseada em entrevistas semiestruturadas e análise documental. Os dados foram coletados durante o período de março a maio de 2023, em um local de estudo situado na região de São Paulo, Brasil. A amostra foi composta por cinco especialistas em avaliação de impacto ambiental, selecionados por conveniência. A coleta de dados foi realizada por meio de entrevistas individuais, com duração média de 45 minutos. Além disso, foram analisados documentos técnicos, como estudos de impacto ambiental e relatórios de licenciamento. A análise dos dados foi realizada de forma temática, buscando identificar padrões e relações entre as variáveis estudadas. Este estudo tem caráter exploratório e contribui para a compreensão dos impactos ambientais associados a obras de infraestrutura em contextos urbanos.

#### 4.2. Instrumentos de coleta de dados e procedimentos metodológicos

##### 4.2.1. Entrevistas semiestruturadas

As entrevistas semiestruturadas foram conduzidas com especialistas em avaliação de impacto ambiental, visando obter informações detalhadas sobre os impactos ambientais e as práticas adotadas durante o processo de licenciamento. Os temas abordados incluíam a identificação dos impactos ambientais, a metodologia utilizada para sua avaliação, os critérios de ponderação e a integração com outros estudos. As entrevistas foram gravadas e duraram aproximadamente 45 minutos cada. O roteiro de entrevista foi elaborado com base na literatura e no objetivo do estudo.

## 4. MÉTODOS

### 4. MÉTODOS

As entrevistas foram realizadas em um ambiente confortável e tranquilo, permitindo uma conversa aberta e detalhada. O entrevistador adotou uma postura neutra e não diretiva, incentivando os participantes a compartilhar suas experiências e conhecimentos.

## **MÉTODOS**

### **4.1. Tratamento da Alga Marinha**

A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi coletada e transportada em recipiente isotérmico para o Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Para retirada das epífitas a alga foi lavada em água corrente e água destilada. Após este procedimento a alga foi colocada para secagem sobre folhas de papel de filtro. Após a secagem esta foi cortada em pequenos pedaços e triturada em liquidificador juntamente com nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para obtenção de uma fina farinha que se manteve estocada em sacos plásticos a -20°C para utilização posterior.

### **4.2. Composição Química Elementar da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis***

#### **4.2.1. Determinação da Umidade**

Em pesa-filtros previamente tarados foi colocada 1g amostra para secar em estufa na temperatura de 105 °C durante 12 horas. Quando retirada da estufa foi colocada no dessecador e pesada. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até a obtenção do peso constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este expresso em percentagem (A. O. A. C., 1975).

#### 4.2.2. Determinação de Cinzas

Foram pesados aproximadamente 2,0g da alga seca em cadinhos de porcelana previamente tarados e, submetidos à incineração em murfla a 550 °C por 6 horas. As amostras foram deixadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas. O procedimento de aquecimento e resfriamento foi repetido até a obtenção do peso constante das amostras incineradas. O teor de cinzas foi calculado por diferença entre os pesos inicial e residual sendo expresso em percentagem. Às cinzas obtidas foram adicionados 3,0ml de uma solução de ácido clorídrico 6 M, filtradas em papel de filtro (filtração média) e transferidas para um balão volumétrico, completando o volume para 100 ml com água destilada. A solução clorídrica foi reservada para as determinações posteriores de cálcio, magnésio, fósforo e ferro (A. O. A. C., 1975).

#### 4.2.3. Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total presente na alga marinha vermelha *S. filiformis* foi determinado pelo métodos de Kjeldahl (HILLER et al. 1948).

Para mineralização foi pesado 1,5g da amostra previamente seca, à qual foram adicionados 30 ml de ácido sulfúrico concentrado e 10 g da mistura catalítica (0,5 g de sulfato de cobre e 9,5 g de sulfato de sódio). Após a mineralização, a amostra foi diluída com água destilada para um volume de 200 ml.

A amostra mineralizada e diluída foi destilada após a adição de 100 ml de NaOH 40% e 1,0 g de zinco em pó. A amônia liberada no decorrer da destilação foi coletada em 50 ml de ácido sulfúrico 0,1 M contendo três gotas do indicador vermelho de metila. O excesso de ácido sulfúrico 0,1 M foi titulado com uma solução de NaOH 0,1 M.

Os cálculos para determinação do teor de proteína bruta (PB) foram realizados utilizando-se a fórmula:

$$\%PB = \frac{V \cdot 0,14 \cdot 6,25}{PA}$$

Onde,

V= volume de NaOH 0,1 M gasto na titulação

PA= peso da amostra usada na digestão

#### 4.2.4. Determinação de Lipídios Totais

O teor de lipídios totais da alga marinha foi determinado conforme a metodologia descrita por TRIEBOLD (1946), sendo a n-hexana usada como solvente. Cartucho de papel de filtro contendo 1g de alga foram colocados em extratores de Soxhlet, acoplados em balões de 250 ml, previamente desengordurados, secos e tarados. A extração dos lipídios se deu pelo contato da n-hexana com a amostra por 8h. Em seguida o solvente foi eliminado por evaporação e os balões com a gordura foram colocados em estufa a 105°C por 1h, para evaporação total do solvente, sendo posteriormente resfriados em dessecadores até atingir a temperatura ambiente e, pesados. Os procedimentos de aquecimento e resfriamento foram repetidos até a obtenção do peso constante. O teor de lipídios totais foi calculado pela relação entre o peso dos lipídios extraídos e o peso inicial da amostra expresso em percentagem.

#### 4.2.5. Determinação de Fibras

##### 4.2.5.1. Determinação da Fibra em Detergente Neutro (FDN)

O método usado na determinação da fibra em detergente neutro (FDN) ou constituintes da parede celular foi proposto por VAN SOEST (1963). Foi pesado 1,0 g de farinha de alga seca e colocado em copos de 600 ml do aparelho digestor, em seguida, pela ordem, foram adicionados: 2,0 ml de decaidronaftaleno (antiespumante); 0,5 ml de sulfito de sódio levando a mistura ao aquecimento até a fervura por cerca de 10 min, permanecendo em digestão por mais 60 min, após o início da fervura. Ao final desse tempo, com as amostras ainda quentes foi feita a filtragem por sucção a vácuo em cadinhos filtrantes de vidro, previamente pesados. O material contido nos cadinhos foi lavado duas vezes com água quente (90 a 100°C), seguido de duas lavagens com acetona (30 a 40 ml) para remover todo complexo gelatinoso formado, principalmente, de proteína e amido. Terminadas as lavagens, os cadinhos filtrantes foram levados para secagem em estufa a 105°C, durante 8h. Depois de resfriados em dessecador, os cadinhos foram pesados. O teor de FDN foi calculado através da relação entre o peso da FDN extraída e o peso inicial da amostra, sendo expresso em percentagem.

##### 4.2.5.2. Determinação da Fibra em Detergente Ácido (FDA)

Na determinação da fibra em detergente ácida (FDA) ou lignocelulose foi empregado o método proposto por VAN SOEST (1963). Amostras de 1,0 g de farinha de alga seca foram colocadas em copos do aparelho digestor e em seguida adicionados 100 ml de solução detergente ácida (20 g de brometo-cetil-trimetilamônio; 1 litro de ácido sulfúrico 1 N) e 2,0 ml de decaidronaftaleno

(antiespumante). As amostras foram aquecidas durante 5 a 10 min, até a ebulição, seguida da digestão, durante 60 minutos. Após a digestão, as amostras foram submetidas à filtração por sucção à vácuo, em cadinhos filtrantes de vidro, previamente pesados. O material digerido foi lavado duas vezes com água quente (90 a 100°C). Seguido de duas lavagens com acetona (30 a 40 ml). Ao fim das lavagens as amostras foram colocadas na estufa a 105°C, durante 8 horas. Decorrido esse tempo os cadinhos de vidro foram levados para esfriar em dessecador e feitas as pesagens. O teor de fibra em detergente ácido (FDA) foi calculado através da relação entre o peso da FDA extraída e o peso inicial da amostra sendo expresso em percentagem.

#### 4.2.6. Determinação de Ferro

O método foi segundo A.O.A.C. (1975). A determinação foi feita tomando-se 10 ml da solução clorídrica (descrita no item 4.2.2.) para um balão volumétrico de 50 ml, sendo adicionados 1,0 ml de HCl concentrado, 1,0 ml de cloridrato de hidroxilamina 10%, 5,0 ml de acetato de amônio 3 M e 2,0 ml da solução de fenantrolina 0,1%. O volume foi completado com água destilada para 50 ml e a leitura de absorbância feita em espectro fotômetro a 510 nm, sendo o resultado comparado a uma curva padrão obtida a partir da solução padrão de ferro.

#### 4.2.7. Determinação de Fósforo

A metodologia utilizada foi segundo A.O.A.C. (1975), consistindo da transferência para um balão volumétrico ( 50 ml ) de 5,0 ml ou mais (dependendo da amostra) da solução clorídrica (descrita no item 4.2.2.). À esta solução foram adicionados 1,0 ml de hidróxido de amônio (1:1, p/v), 2,0 ml de ácido nítrico (1:2) e

20,0 ml de solução de molibdato de vanadato de amônio (molibdato de amônio 2% e vanadato de amônio 0,1%). Para solução de referência foram adicionados os reagentes mencionados acima, com exceção da amostra. A leitura foi feita após 30 minutos em espectro fotômetro a 470 nm e, os resultados comparados a uma curva padrão obtida a partir de soluções padrões de ferro.

#### 4.2.8. Determinação de Cálcio

Para determinação de cálcio (A.O.A.C. 1975), foram pipetados 25 ml da solução clorídrica (descrita no item 4.2.2.) em um erlenmeyer e a esta foram adicionados 20 ml da solução de molibdato de amônio 6% e 5,0 ml de ácido clorídrico 10%. Em seguida, a mistura foi levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do fósforo, deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado recolhido no erlenmeyer adicionaram-se 20 ml de solução tampão pH 10 para elevar o pH da solução que passou de uma coloração levemente amarela para incolor. Acrescentaram-se 20 ml de NaOH 4 M, 5,0 ml de KCN 0,1 M e 5,0 ml de trietanolamina 20%. O volume da solução foi elevado até 300 ml com água destilada e, em seguida, foi adicionada pequena porção de indicador Calcon, sendo a titulação realizada com EDTA 0,02M até a passagem da cor vermelha para azul intenso. Cálculo para a determinação em equivalentes grama do cálcio foi realizado usando-se a fórmula:

$$\% \text{ Ca} = \frac{\text{V. F. M. } 40 \cdot 100}{\text{P.100}}$$

Onde:

V = volume de EDTA gasto na titulação

F = fator da solução EDTA

P = peso referente à alíquota

M = 0,02

#### 4.2.9. Determinação de Magnésio

Para determinação de magnésio (A. O. A. C., 1975), foram pipetados 20 ml da solução clorídrica (descrita no item 4.2.2.) e, a esta adicionados 20 ml da solução de molibdato de amônio 6%, 5,0 ml de ácido clorídrico 10%, sendo a mistura levada para uma placa aquecedora a 60<sup>o</sup>.C para completa precipitação do fósforo. Em seguida a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado foram adicionados 20 ml de uma solução tampão constituída de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 11,4 M e cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) 1,2 M, pH10, para elevar o pH da solução cuja coloração passou de levemente amarela para incolor. Foram então, adicionados 5,0 ml de KCN 0,1 M, 5,0 ml de trietanolamina 20% e 5 gotas de eriocromo negro T como indicador. A titulação foi realizada com EDTA 0,02 M até a viragem da cor vermelha para azul.

$$\% \text{ Mg} = \frac{(V' - V) \cdot F \cdot M \cdot 24 \cdot 100}{P \cdot 100}$$

$$P \cdot 100$$

Onde:

V' = volume de EDTA gasto na titulação

V = volume de EDTA gasto na titulação do cálcio

P = peso referente a alíquota

M = 0,02



#### 4.2.10. Determinação de Vitamina C

Na determinação de vitamina C foi empregado o método de RIBEAU-GAYON & PEYNAUD (1971). o procedimento foi feito tomando-se uma quantidade conhecida da amostra, a qual foram adicionados 2,0 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 2 M, 1,0 ml de iodeto de potássio (KI) 10%, 1,0 ml de amido 1% e 50 ml de água destilada. A titulação foi feita com iodato de potássio ( $KIO_3$ ) 0,1M. Os cálculos para determinação da vitamina C na amostra foram feitos utilizando-se a fórmula:

$$\text{Vit. C (mg/100)} = \frac{V \cdot 8,8 \cdot 100}{PA}$$

Onde:

V = volume de  $KIO_3$  0,1 M gasto na titulação

PA = peso de amostra utilizada na determinação

8,8 = mg de ácido ascórbico que reage com 1,0 ml de  $KIO_3$  0,1 M

#### 4.2.11. Determinação do Valor Calórico Total

Na determinação do valor calórico total foram utilizados aqueles obtidos para carboidratos (C), proteínas (P) e lipídios (L), empregando-se a fórmula (FAE, 1985).

$$\text{Valor calórico total} = (C \times 4) + (P \times 4) + (L \times 9)$$

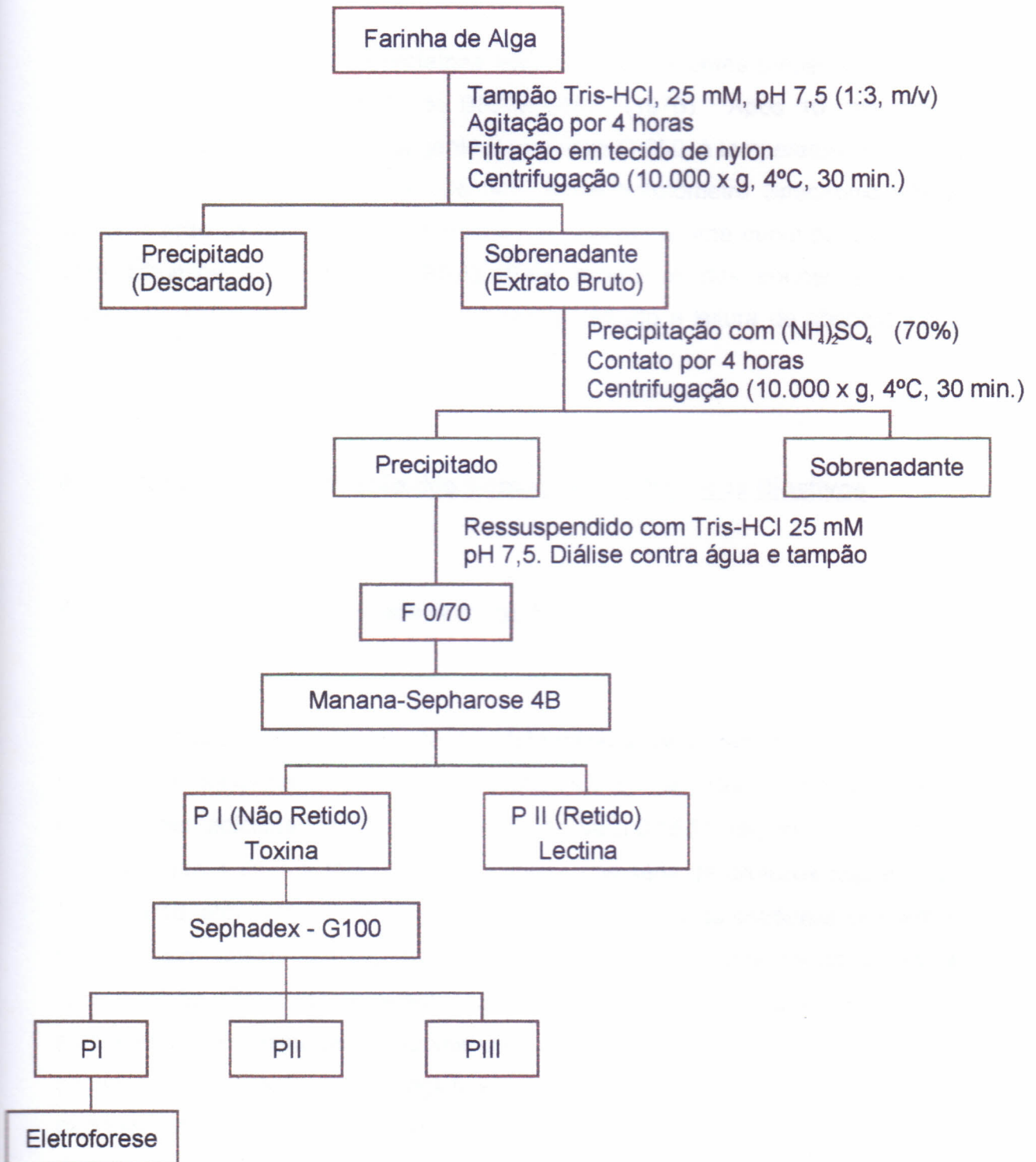
### **4.3. Extração de Proteínas da Alga Marinha**

#### **4.3.1. Preparação do Extrato Total**

Na preparação do extrato total, a farinha de alga *S. filiformis*, obtida por maceração com nitrogênio líquido, foi deixada em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, na proporção 1:3 (p/v), sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon e, em seguida centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de extrato total, submetido aos ensaios das atividades hemaglutinante e tóxica, dosagem de proteínas, efeitos da temperatura e do pH sobre a sua estabilidade tóxica e precipitação com sulfato de amônio.

#### **4.3.2. Preparação da F0/70**

O extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de amônio até 70% de saturação durante quatro horas a temperatura ambiente. Após esse período foi feita uma centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, dialisado exaustivamente contra o tampão de extração, sob agitação constante. A fração protéica assim obtida (F0/70) foi avaliada quanto ao teor de proteína, atividades hemaglutinante e tóxica, para dar prosseguimento à purificação da proteína. O esquema geral de purificação está representado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - Esquema de purificação da toxina e lectina da alga *Solieria filiformis*

#### **4.4. Determinação de Proteína**

A dosagem de proteínas solúveis nas diferentes preparações foram realizadas segundo o método de BRADFORD (1976). Após 10 minutos de contato das amostras com o reagente Coomassie G-250, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm (espectrofotômetro Spectronic 20). A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA). Para estimativa das concentrações de proteínas nos eluatos das cromatografias foi utilizado a leitura de absorbância a 280 nm.

#### **4.5. Detecção e Quantificação dos Componentes Protéicos Bioativos**

##### **4.5.1. Determinação da Atividade Hemaglutinante**

A atividade hemaglutinante foi determinada pelo método das diluições seriadas em tubos de ensaio segundo BENEVIDES et al., 1996. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 100 $\mu$ l de solução de NaCl 0,15 M, seguindo-se a adição de igual volume da amostra fazendo-se então uma série de diluições duplas (1/2; 1/4; 1/8; 1/16, etc). Um volume de 100  $\mu$ l de suspensão 2% de eritrócitos de coelho, tratados com tripsina (0,1 mg/10 ml da suspensão de eritrócitos) foi adicionado à cada diluição. Os tubos de ensaio foram deixados em repouso a temperatura ambiente por 60 minutos, e submetidos à centrifugação a 2.000 x g por 30 segundos, e a reação de hemaglutinação observada a olho nu, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/ml), ou seja, o inverso da maior diluição de uma dada concentração de proteína capaz de provocar aglutinação visível.

#### 4.5.2. Atividade Anti-tríptica

Para avaliação do inibidor de tripsina presente na alga em estudo foi utilizada a técnica descrita por KAKADE, com algumas modificações (HAMERSTRAND et al., 1981). Em amostras de 0,02 g de fina farinha de alga foi adicionado 1 ml de solução NaOH 0,01 N, e deixadas sob agitação constante por 3 horas à temperatura ambiente, seguidos de repouso por 30 minutos nas mesmas condições de temperatura. Decorrido este tempo, alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes foram retiradas e misturadas a 0,05 ml de solução de NaOH 0,01N. As misturas obtidas foram centrifugadas a 14.000 x g/5minutos. Depois da centrifugação foram tomadas alíquotas de 0,1 ml das misturas e incubadas à 37 °C, num meio de reação que continha 1,6 ml de Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo CaCl 20 mM, 0,1 ml de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 ml de HCl 0,01 N) e o substrato BAPNA. Na dissolução de 10 mg de BAPNA foi utilizado 0,5 ml de dimetilsulfóxido, tendo sido submetido a vigorosa agitação em vortex até a dissolução completa do substrato. Ao final, o volume foi completado para 1ml com água milli-Q, submetido outra vez à agitação, e usado imediatamente. A interrupção da reação ocorreu quando 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v) foram adicionados, e seguida a leitura a 410 nm. A curva padrão obtida com SBTI foi empregada para o cálculo dos resultados, os quais foram expressos como a quantidade em miligrama (mg) de tripsina inibida (UI/g) de farinha de alga.

#### 4.5.3. Avaliação da Atividade Tóxica

A avaliação da toxicidade de diferentes frações do processo de purificação da proteína da alga estudada foi feita em camundongos fêmeas, pelas vias intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv). Foram usados grupos de 4 animais por dose,

as quais eram estimadas tomando como base 10 g de peso vivo de cada animal (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949), as doses encerravam teores de proteína tóxica que causavam a mortalidade de 0 – 100% dos animais, em intervalo de 24 horas para as aplicações ip. ou até 1 hora para as injeções intravenosas das doses testadas. Segundo VASCONCELOS et al., (1994) uma unidade de DL<sub>50</sub> foi definida como a quantidade de proteína (g/kg de peso corpóreo) capaz de causar convulsões e morte em 50% dos animais testados.

#### 4.5.4. Efeito do pH Sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total

Na avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total concentrado foram usadas alíquotas de 10 ml ajustadas nos valores de pH em 1, 3, 5, 7,5 e 10, sendo em seguida mantidas à temperatura ambiente durante 60 minutos, centrifugadas e reajustadas ao valor do pH inicial com HCl ou NaOH. Os sobrenadantes foram levados ao mesmo volume inicial e dialisados contra tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Foram feitas determinações de proteína e avaliada a atividade tóxica usando para isso 4 (quatro) camundongos (fêmeas) pesando entre 19 e 25 g, para cada valor de pH, e o índice de atividade tóxica expresso como percentagem de mortalidade em cada grupo.

#### 4.5.5. Efeito da Temperatura Sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total

A termoestabilidade da atividade tóxica do extrato total concentrado por liofilização e equilibrado com tampão Tris-HCl 25 mM foi determinada pelo aquecimento de alíquotas de 2,5 ml em banho-maria nas temperaturas de 50, 70, 80 e 90°C, em intervalos de 10, 20, 30 e 60 minutos. As alíquotas foram resfriadas

em banho de gelo e centrifugadas por 5 minutos. Os sobrenadantes foram testados em grupos de 4 camundongos fêmeas para cada temperatura. O índice de atividade tóxica foi expresso com percentagem de mortalidade em cada grupo.

#### **4.6. Purificação das Proteínas, Toxina e Lectina, da Alga *S. filiformis***

##### **4.6.1. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Manana-Sepharose 4B**

A preparação do gel de Manana-Sepharose 4B empregado na cromatografia de afinidade, com o objetivo de purificar a proteína presente na F0/70 obtida da precipitação com sulfato de amônio, proveniente do extrato total da alga marinha vermelha *S. filiformis*, foi realizada considerando a interação da proteína com o polissacarídeo manana de levedura. O acoplamento da manana à Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr) foi feito mantendo-se a proporção 2:1 (mg de manana /g de Sepharose 4B ativada).

Inicialmente, 2,0 g de Sepharose foram suspensos em solução de HCl 1 mM (aproximadamente 200 ml de solução de HCl /g de Sepharose 4B ativada) deixando-se em contato por 15 minutos, para preservar a atividade dos grupos reativos que hidrolisam a pH alto. Na etapa seguinte o gel foi filtrado em funil de placa sinterizada, e lavado sucessivas vezes com a mesma solução. Posteriormente, o gel foi submetido a outra lavagem com tampão de acoplamento bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 0,1 M, pH 8,3 contendo NaCl 0,5 M, por aproximadamente três vezes (5,0 ml de tampão/g de Sepharose 4B ativada na forma de gel seco) e, transferido imediatamente para a solução do ligante preparada previamente com o tampão de acoplamento, deixando-se 16 horas no misturador à 4 °C. Passado período de contato o material foi filtrado, e os grupos ativos remanescentes presente no gel foram bloqueados pela adição do tampão bloqueador (tampão glicina 0,2 M, pH 8,0) por 2,0 horas à temperatura ambiente.

O excesso de ligante não acoplado foi retirado pela lavagem do gel com tampão acetato 0,1 M, pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M (pH baixo), e depois com tampão de acoplamento bicarbonato de sódio (pH alto). Este ciclo foi repetido por quatro a cinco vezes, concluindo o processo com tampão de acoplamento.

Alíquota de 5 ml da F0/70 centrifugada foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Manana-Sepharose 4B previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, utilizando coletor de frações operando em fluxo constante de 36 ml/hora. O material não retido (pico I) foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto a fração protéica ligada à matriz (pico II) referente a lectina, foi eluída com uma solução de uréia 4 M. Os dois picos eluídos na cromatografia foram coletados em frações de 3 ml/tubo e suas absorbâncias lidas à 280 nm em espectrofotômetro LKB-Ultraspec III. O pico I foi concentrado por liofilização, equilibrado contra o tampão de eluição, submetido à dosagem de proteína, e testadas suas atividade hemaglutinante e tóxica. A fração protéica eluída com uréia 4 M (pico II) foi dialisada exaustivamente contra a água, concentrada por liofilização e equilibrada com tampão de extração. Após a diálise, a fração protéica obtida foi usada para detecção das atividades hemaglutinante e tóxica, e dosagem de proteínas solúveis.

#### 4.6.2. Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100

O pico I da manana contendo uma fraca atividade hemaglutinante foi submetido à cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G100 acoplada em coletor Pharmacia LKB Frac-100. A coluna medindo 90 x 1,5 cm foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 sendo coletadas frações de 3 ml/tubo. A eluição dos picos protéicos foi obtida com o mesmo tampão de equilíbrio, e a leitura de suas absorbâncias feita em comprimento de ondas de 280 nm. Os picos obtidos foram concentrados por liofilização, equilibrados contra o tampão de eluição e submetidos à dosagem de proteína, e



determinação das atividades hemaglutinante e tóxica. A massa molecular da proteína tóxica na forma nativa (Pico I com atividade obtido deste procedimento) foi calculada usando-se a mesma coluna de Sephadex G-100 descrita neste item, relacionando-se os volumes de eluição com aqueles dos marcadores. Os cálculos foram determinados por regressão linear. Na calibração prévia da coluna foram utilizadas as seguintes proteínas: BSA (66,0 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa) e citocromo c (12,4 kDa).

#### **4.7. Caracterização Físico-Química e Estrutural da Proteína Tóxica da Alga *S. filiformis***

##### **4.7.1. Determinação da Massa Molecular por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e $\beta$ -Mercaptoetanol**

A amostra da toxina da alga *S. filiformis* obtida através da cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100 foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol segundo o método de LAEMMLI (1970), adaptado para o uso de placas (10,2 x 8,4). As placas de eletroforese foram montadas com gel de concentração contendo 3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1% e com um gel de separação contendo 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3,0 M e pH 8,8. O tampão dos eletrodos era composto de Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,2 M e SDS 0,1%.

As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol, SDS e/ou  $\beta$ -mercaptoetanol e submetidas ao aquecimento a 100°C por 5 minutos. Às amostras foi adicionado o azul de bromofenol 0,1% para controle das corridas eletroforéticas, que foram realizadas a uma corrente

constante de 20 mA durante 2 horas, utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua.

A coloração das proteínas foi realizado com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,25% em etanol, ácido acético e água (4:0,7:5,3, v/v/v) por um período de 18 horas. O descoramento foi feito com uma solução de etanol, ácido acético e água (3,5:1:8,0, v/v/v). Os marcadores de migração eletroforética empregados foram: albumina sérica bovina (66 KDa), ovalbumina (43 KDa), gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (36 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), tripsinogênio (24 KDa), inibidor de tripsina (21 KDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 KDa). As massas moleculares aparentes foram estimadas à partir das curvas construídas com os Rfs dos marcadores usados na corrida eletroforética.

#### **4.8. Avaliação Histopatológica dos Efeitos Tóxicos da Lectina de *S. filiformis* em Camundongos**

A avaliação histopatológica dos efeitos da lectina, quando injetada por via iv. em camundongos foi realizada segundo a metodologia de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, (1983) cujas etapas são descritas a seguir:

##### **1ª Etapa – Fixação**

Os órgãos (peças): coração, pulmões, pâncreas, rins, fígado, estômago e intestinos (grosso e delgado) imediatamente após morte do camundongo foram removidos e fixados em formol a 10%, para preservar a morfologia e composição dos tecidos e, assim conservados até a obtenção dos preparados histopatológicos permanentes (lâminas).

##### **2ª Etapa – Desidratação**

As peças passaram por banhos de etanol em concentrações crescentes (70 e 90%), e por mais três banhos consecutivos com álcool absoluto, cada um com duração de 1 hora.

### 3ª Etapa – Diafanização

Para eliminação do etanol e clareamento dos tecidos dos órgãos (peças), estes foram submetidos a três banhos consecutivos de xilol especial para histologia, cada um com duração de 1 hora.

### 4ª Etapa – Parafinização

Para ocupar os espaços vazios nos tecidos dos órgãos, formados pela evaporação do xilol, as peças foram mergulhadas três vezes consecutivas em parafina pura (fundida a 50 °C), cada uma com duração de 1 hora.

### 5ª Etapa – Inclusão

Nesta etapa as peças foram colocadas em uma mistura contendo parafina fundida, cêra de abelha e cêra de camaúba (1,0 Kg de parafina:15,0 g de cêra de abelha: 15,0 g de cêra de camaúba) em formas retangulares de papel e, deixadas solidificar à temperatura ambiente, sendo portanto denominadas de blocos de parafina.

### 6ª Etapa – Microtomia

Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo, em cortes de 3 a 8 µm, em seguida submetidos ao estiramento em banho-maria a 50 °C e posteriormente colocados sobre lâminas de vidro. Estas, foram levadas à estufa à

50 °C para eliminar a parafina contida no corte e, lavadas com xilol desparafinador por 30 min.

#### 7ª Etapa – Hidratação

Os tecidos nas lâminas foram hidratados por banhos consecutivos em álcool etílico absoluto a 90 e 70%, respectivamente, cada com duração de 1 min, seguido de uma lavagem rápida com água destilada.

#### 8ª Etapa – Coloração

Os tecidos foram corados (coloração dupla) com hematoxilina e eosina (HE), onde cada corante permaneceu em contato por 3 min. O primeiro (Hematoxilina) dá uma coloração azul aos núcleos das células e o segundo (Eosina), uma coloração rósea aos citoplasmas.

#### 9ª Etapa – Desidratação

Para a desidratação e remoção do excesso dos corantes, os tecidos foram submetidos a três banhos com álcool absoluto, cada com duração de 1 min.

#### 10ª Etapa – Clareamento

A eliminação do etanol e clareamento dos componentes dos tecidos não corados por HE, foi realizada com três banhos consecutivos de xilol, cada por 1 min. Em seguida, as lâminas (triplicatas) foram analisadas em microscópio óptico utilizando objetiva 100X.

#### **4.9. Avaliação da Atividade Tóxica dos Extratos Total e Aquoso, da Toxina e Lectina da Alga *S. filiformis* sobre o ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus***

Os ensaios foram conduzidos sob condições controladas de temperatura e umidade (28 °C e 80%, respectivamente) em estufa BOD, utilizando-se fêmeas ingurgitadas, de bovinos leiteiros infestados naturalmente conforme demonstrado na FIGURA 3. As teleóginas foram pesadas e reunidas em grupos homogêneos de 15 indivíduos (n=15). Em seguida, foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente. O grupo controle foi imerso em água destilada, enquanto os demais foram submetidos a imersão nas frações protéicas (extrato total e aquoso), PI-Manana (toxina) e PII-Manana (lectina) durante 5 min.

Posteriormente, as teleóginas foram fixadas com fita dupla face em placas de petri, permanecendo com o dorso voltado para cima e mantidas na estufa BOD nas condições já descritas. Iniciada a oviposição (postura), os ovos foram coletados diariamente de cada teleógina, pesados e transferidos para seringas descartáveis de 5 mL, sendo estas então, seladas com algodão e mantidas na estufa BOD. Ao término da oviposição (ca. 3.000 ovos/teleógina), o peso das quenóginas, fêmeas após postura (PQ), e o peso da massa total dos ovos (PMTO) foram utilizados para os cálculos dos índices das eficiências reprodutiva (IER), nutricional (IEN) e do produto (EP).

A eclosão dos ovos e a mortalidade das larvas foram acompanhadas com o auxílio de lupa, sendo os dados obtidos em percentual (1, 5, 10, 20, 30, 60 % etc.) de ovos e de larvas, utilizados para a avaliação dos períodos de postura das teleóginas (PPT), incubação (PI) e eclosão (PE) dos ovos, seguidos da percentagem de eclosão (%E) e dos períodos de sobrevivência (PS) e mortalidade (PM).

Nos cálculos das eficiências reprodutiva, nutricional e do produto foram empregadas as fórmulas de DRUMMOND et al. (1973), conforme descritas a seguir:

$$ER = \frac{PMOT \times \%E \times 20.000}{PQ}$$

$$EN = \frac{PMOT}{PI - PQ}$$

Onde:

PI = peso inicial da teleógina

PQ = peso da quenógina

$$EP = \frac{(ER_C - ER_E)}{ER_C} \times 100$$

Onde:

EP = eficiência do produto

ER<sub>C</sub> = eficiência reprodutiva do grupo controle

ER<sub>E</sub> = eficiência reprodutiva do grupo experimental

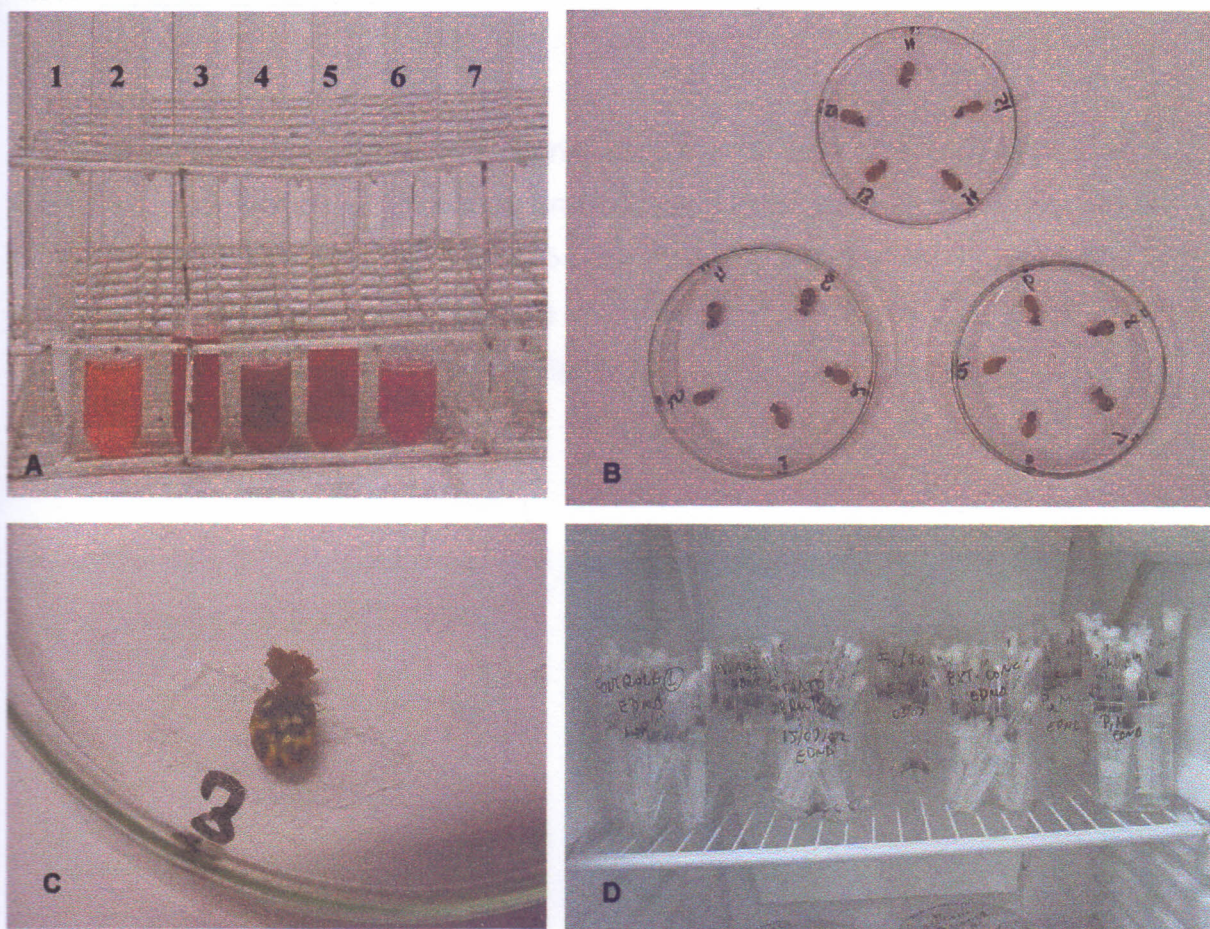


FIGURA 3 – Ensaio de avaliação da atividade tóxica dos extratos total e aquoso, toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre o ciclo evolutivo do carrapato bovino *B. microplus*. A - Imersão das teleóginas: 1 - Água (controle), 2 e 3 - Extrato Total, 4 e 5 - Extrato Aquoso, 6 - Toxina e 7 - Lectina; B e C - Oviposição e D - Eclosão até morte das larvas.

#### 4.10. Análise Estatística

Nas análises estatísticas de variância e significância dos resultados obtidos com os experimentos utilizou-se o procedimento GLM do sistema SAS, versão 6.11. O teste de DUNNET foi utilizado para comparar as médias obtidas com os tratamentos em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e o teste de TUKEY para comparação entre as médias dos tratamentos ( $p < 0,05$ ).





## Resultados e Discussão

### 5.1. Composição Química Elementar da Alga *S. filiformis*

Os resultados da análise da composição química elementar da alga *S. filiformis* (TABELA 3) mostram que esta apresentou teores elevados de umidade(94,7%), proteína (25,8%), fibra em detergente neutro (30,9%) e carboidratos (35,2%). Teores menores foram encontrados para cinzas (13%), fibra em detergente ácido (7,84%) e lipídios (0,3%). Para os minerais analisados a partir das cinzas, o cálcio e o magnésio apresentaram-se em maiores proporções, (45,1 e 74,4 mg/100g, respectivamente), tendo os minerais ferro e fósforo se apresentado valores menores (3,2 e 4,6 mg/100g, respectivamente). O teor de vitamina C encontrado foi de 8,3 mg/100g da amostra analisada, sendo o valor calórico total obtido de 246,7 kcal/100g.

Os percentuais de proteína encontrados para esta mesma alga por SILVA, (1997) e RAMOS et al., (1998) foram inferiores ao determinado neste trabalho (23,8% e 21,2%, respectivamente). GUEDES et al., (1988) avaliando a variação sazonal na composição química de algumas espécies de algas bentônicas, entre elas a espécie do mesmo gênero, *Solieria tenera*, mostraram que esta apresentou baixos percentuais de proteína bruta que variaram de 7,2 a 12,3%, dependendo do período e do ano de coleta. Onde podemos sugerir que a pequena variação no percentual protéico encontrado para a alga *S. filiformis* esteja também relacionada com a variação sazonal. De acordo com THIVY (1960), o conteúdo protéico de algumas algas marinhas é semelhante ao obtido para diversas sementes de algumas planta superiores, tais como, arroz, trigo e algumas leguminosas.

Tabela 3 - Composição química elementar da alga *Solieria filiformis*

<b>Constituinte</b>	<b>Teor na amostra (%)</b>
Umidade	94,70
<b>Base Seca</b>	
Cinzas	13,0
*Proteína Total	25,8
Lipídio Total	0,3
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	30,9
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	7,8
**Carboidrato Total	22,2
<b>Minerais (mg/100 g)</b>	
Cálcio	45,1
Magnésio	74,4
Fósforo	4,6
Ferro	3,2
Vitamina C (mg/100g de amostra)	8,3
Valor Calórico total (Kcal/100g)	194,7

\* Nitrogênio total x 6,25.

\*\* Obtido por diferença.

Com relação aos minerais analisados a partir das cinzas da alga *S. filiformis* (ferro, fósforo, cálcio e magnésio), os percentuais obtidos (3,2, 4,6, 45,1 e 74,4, respectivamente) comportaram-se de forma contrária ao obtido para a alga vermelha *Amansia multifida* por SILVEIRA (2001), que encontrou teores mais elevados para o fósforo e ferro (18 e 16 mg/100g da amostra, respectivamente) e teores mais baixos para o cálcio e magnésio ( 0,8 e 0,1mg/1100g da amostra, respectivamente).

Algumas algas marinhas são consideradas fontes ricas em vitaminas e minerais (ARAZAKI & ARAZAKI, 1983), no entanto, o teor de vitamina C encontrado para a alga *S. filiformis*, é considerado baixo quando comparado aos teores obtidos para alga *Amansia multifida* (15,3 mg/100 g) por SILVEIRA (2001) e para a alga verde *Ulva fasciata* (165,8 mg/100 g) por PEREIRA (2000).

Ainda, segundo GUEDES et al., (1988) as variações nos percentuais dos constituintes químicos das algas podem ser justificadas pelos seguintes motivos: 1 - as localidades das pesquisas são fitogeograficamente diferentes; 2 - dentro do ambiente marinho há uma grande diversidade de locais, contribuindo para esta variação; 3 - devido à variação das espécies, algumas vezes as comparações das suas composições químicas são realizadas a nível de gênero.

## 5.2. Detecção das Atividades Hemaglutinante, Tóxica e Anti-tríplica no Extrato Total da Alga *S. filiformis*

O extrato total de *S. filiformis*, rico em atividade hemaglutinante contra eritrócitos (2%) de coelho tratados enzimaticamente com tripsina, como previamente demonstrado por BENEVIDES et al., (1996) foi concentrado por liofilização parcial, dialisado com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 mostrou-se tóxico para camundongos quando injetado por via ip.. Os sintomas observados após a aplicação desse extrato foram: piloereção, xeroftalmia, aceleração do ritmo respiratório (dispnéia), ataxia locomotora, convulsões tônico-clônicas, seguidos da

morte dos animais. A  $DL_{50}$  encontrada foi de 16,5 mg de proteína/Kg de peso corpóreo, que pode ser considerada baixa quando comparada com a encontrada por SILVEIRA, (2001) ao avaliar a atividade tóxica do extrato total concentrado de *Amansia multifida*, para o qual a  $DL_{50}$  calculada foi de 2,4 mg de proteína/Kg de peso corpóreo.

Na análise da ação anti-tríptica no extrato total alcalino de *S. filiformis* foi demonstrada ausência de atividade, confirmando que a toxicidade intraperitoneal para camundongos não está associada ao inibidor de tripsina. SILVA (1998), ao analisar a atividade inibitória para tripsina dos extratos totais de dez espécies de algas marinhas vermelhas, entre elas a espécie em estudo *S. filiformis*, mostrou que estes apresentaram-se isentos desta atividade. O mesmo foi observado por SILVEIRA, (2001) quando avaliou a atividade anti-tríptica do extrato alcalino da alga *Amansia multifida*.

### 5.3. Efeito do pH sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total

O efeito do pH ( faixa de pH 1-10) sobre a estabilidade tóxica do extrato total concentrado da alga *S. filiformis* mostrou que a atividade tóxica para camundongo por via ip. permaneceu estável a uma variação de pH de 3 a 7,5. Entretanto, em pH 10 (alcalino) a atividade tóxica foi reduzida a 25%, sendo completamente inativada em pH 1 (Tabela 4)

### 5.4. Efeito da Temperatura sobre a Estabilidade da Atividade Tóxica do Extrato Total

A estabilidade térmica da atividade tóxica do extrato total foi também avaliada. Quando alíquotas deste extrato foram submetidas ao aquecimento a 60 °C por 10 min, a atividade tóxica permaneceu estável. No entanto, na mesma temperatura durante 60 min a atividade tóxica foi reduzida em 75%, tornando-se totalmente inativa a 90 °C por 60 minutos (TABELA 5).

Tabela 4 - Efeito do pH sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total da alga *S. filiformis*

FRAÇÃO	PH				
	1,0	3,0	5,0	7,5	10,0
Extrato total	----	++++	++++	++++	+++ -

(+) Atividade tóxica expressa em percentagem de animais mortos após injeção por via ip. do extrato total ((0,42 mg de proteína/10 g de animal capaz de matar 100% dos animais testados), capaz de matar 100% dos animais testados). 100% (++++), 75% (+++)

Com relação à estabilidade térmica da atividade hemaglutinante presente no extrato total, esta já havia sido demonstrada por BENEVIDES et al., (1996). Portanto, conforme relatado pelos autores, a atividade hemaglutinante residual foi reduzida a 75% quando do tratamento a 60°C por 30min de aquecimento, sendo inativada a 90 °C no mesmo intervalo de tempo de aquecimento.

#### 5.5. Purificação das Proteínas, Toxina e Lectina, da Alga *S. filiformis*

Tendo em vista a toxicidade do extrato total e sua estabilidade em uma ampla faixa de pH, deu-se prosseguimento a este estudo concentrando as proteínas presentes nesse extrato por precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação (F0/70). Esta fração (DL<sub>50</sub> 13,8 mg/Kg do peso do animal, por via ip. em camundongos) foi utilizada para dar prosseguimento à purificação das proteínas com atividade tóxica (toxina e lectina). Vale ressaltar, que o pH mantido em todas as etapas de purificação foi 7,5 e que as atividades hemaglutinante e tóxica foram avaliadas em todas as etapas do procedimento de purificação.

Vale salientar ainda, que o procedimento de separação e purificação das proteínas contendo as atividades hemaglutinante e tóxica presentes nesta (F0/70) foi o mesmo utilizado na purificação da lectina desta alga por BENEVIDES et al. (1996), com exceção da etapa de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose que precede ao procedimento de cromatografia de afinidade em coluna de Manana-Sepharose 4B, visto que os referidos autores utilizaram este procedimento apenas com a finalidade de reter parte dos pigmentos nesta matriz cromatográfica e além disso, o uso desta etapa ocasionaria um rendimento protéico mais baixo.

TABELA 5 - Efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade tóxica do extrato total da alga *S. filiformis*

Tempo (min)	Temperatura (° C)		
	50	60	90
10	++++	++++	+---
20	++++	+++ -	+---
30	++++	++--	+---
60	++++	+---	----

Atividade tóxica expressa em percentagem (%) de animais mortos após injeção ip do extrato total (0,42 mg de proteína/10 g de animal capaz de matar 100% dos animais testados). 100%(++++); 75% (+++); 50% (++) e 25%(+)



### 5.5.1. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Manana-Sepharose 4B

O perfil cromatográfico obtido por aplicação da F0/70 na coluna de Manana-Sepharose 4B (FIGURA 4) mostrou a presença de dois picos, sendo o primeiro (PI), eluído com o tampão Tris-HCl 25 mM , pH 7,5, apresentando uma fraca atividade hemaglutinante e mostrando-se tóxico quando aplicado intraperitonealmente em camundongos e, o segundo pico (PII), eluído com uréia 4 M, despigmentado, contendo uma forte atividade hemaglutinante e apresentando atividade tóxica quando aplicado em camundongos por vias ip. e iv., com DL<sub>50</sub> 1,7 e DL<sub>50</sub> 1,5, mg/Kg de peso corpóreo do animal, respectivamente (TABELA 6).

Tendo em vista o PI ainda ter apresentado atividade hemaglutinante, este foi novamente aplicado em coluna de Manana-Sepharose 4B até permanecer isento desta atividade e, após este procedimento foi obtida uma DL<sub>50</sub> 21,7 mg/Kg do peso do animal por via ip. em camundongos, mostrando-se portanto ser menos tóxica do que as obtidas nas frações protéicas, extrato total e F0/70, levando-nos a sugerir a existência de um outro componente menos tóxico que a lectina, na alga *S. filiformis* (TABELA 7).

### 5.5.2. Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100.

Assim, como o procedimento em coluna de Manana-Sepharose 4B não foi decisivo para isentar totalmente o PI-manana da atividade hemaglutinante, em virtude da concentração aplicada em relação a proteína lectina, ultrapassar a capacidade de ligação dos sítios ligantes (manana) da matriz a esta proteína e, como este pico (PI) ainda mostrou-se altamente pigmentado, optou-se em dar prosseguimento a purificação do componente tóxico presente no PI, utilizando-se a cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100.

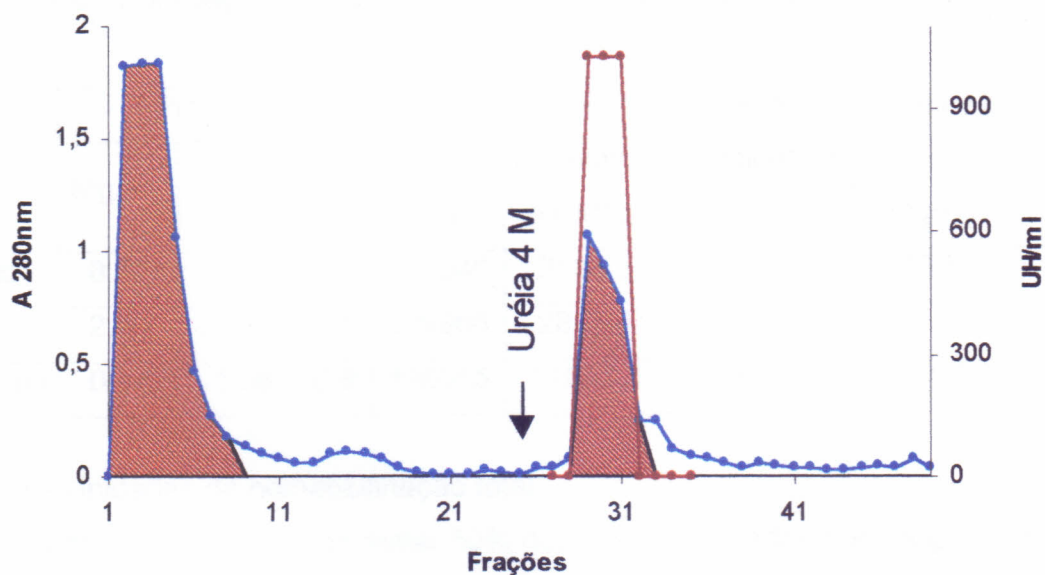


FIGURA 4 - Cromatografia de afinidade em coluna de Manana-Sepharose 4B da F0/70 equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH7,5. O primeiro pico (PI) foi eluído com tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII) eluído com Uréia 4 M. Coluna: 5,0 x 0,5cm, fluxo:36 mL/h e frações: 3,0 mL/tubo . (●—●) A 280 nm. (●—●)UH/ mL. ▨ Atividade tóxica

TABELA 6 - Purificação da lectina com atividade tóxica da alga *S. filiformis*

Frações	Proteína			Atividade Hemaglutinante			Atividade Tóxica	
	Mg/mL	Total (mg)	%	UH Total*	Específica (UH/mg)	Purificação (x)	DL <sub>50</sub> ** (mg/Kg)	Purificação (x)
Extrato	0,12	190,8	100	407040	2133,3	1,0	16,5 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
F0/70	2,90	120,4	63	339968	2823,7	1,3	13,8 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>
PII-Manana	0,14	1,58	0,8	128055	81047,5	38,0	1,7 <sup>a</sup> e 1,5 <sup>b</sup>	9,7 <sup>a</sup>

\*U.H. Total – Unidades de hemaglutinação total

\*\*Miligramas de proteína capaz de matar 50% dos animais testados por via ip. ou iv

<sup>a</sup> por via ip.

<sup>b</sup> por via iv.

Portanto, esta fração protéica (PI-Manana) quando aplicado em coluna de Sephadex G-100, apresentou um perfil cromatográfico contendo três picos protéicos. O primeiro pico obtido (PI), apresentou-se ainda pigmentado, mas livre de atividade hemaglutinante e encerrando atividade tóxica com  $DL_{50}$  17,8 mg/Kg de peso do animal, o segundo pico (PII), apresentou-se despigmentado, contendo atividade hemaglutinante e o terceiro pico (PIII) mostrou-se isento das atividades hemaglutinante e tóxica (FIGURA 5 e TABELA 7).

A primeira lectina purificada de algas marinhas a apresentar atividade tóxica para camundongos foi obtida recentemente da alga *Gracilaria ornata* por Leite (2003), onde a dose letal verificada foi de 50 mg/Kg de peso do animal por aplicação por via iv. em camundongos, sendo portanto considerada menos tóxica do que a lectina obtida da alga *S. filiformis*.

#### 5.6.1. Massa Molecular das Proteínas, Toxina e Lectina, por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

A massa molecular da lectina (PII-manana) da alga *S. filiformis* determinada em condições desnaturantes em presença de SDS mostrou um perfil eletroforético constituído de duas bandas protéicas com massas de 58,6 e 29,3 kDa. Entretanto, quando a lectina foi submetida ao tratamento com o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, a subunidade de maior massa (58,6 kDa) foi reduzida passando, portanto, a coincidir com a subunidade de 29,3 kDa. Esse resultado nos mostrou que a lectina da alga *S. filiformis* é uma proteína dimérica e não monomérica conforme descrito por BENEVIDES *et al.*, (1996) que haviam determinado a massa molecular desta proteína somente em presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (FIGURA 6).

A FIGURA 7 mostra o perfil eletroforético dos picos, PI-manana, PII-manana (lectina) e PI-Sephadex (toxina), obtidos por PAGE-SDS na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. O perfil eletroforético do PI-manana mostrou uma banda protéica de massa molecular aparente de 14 kDa e, ainda, a presença de duas

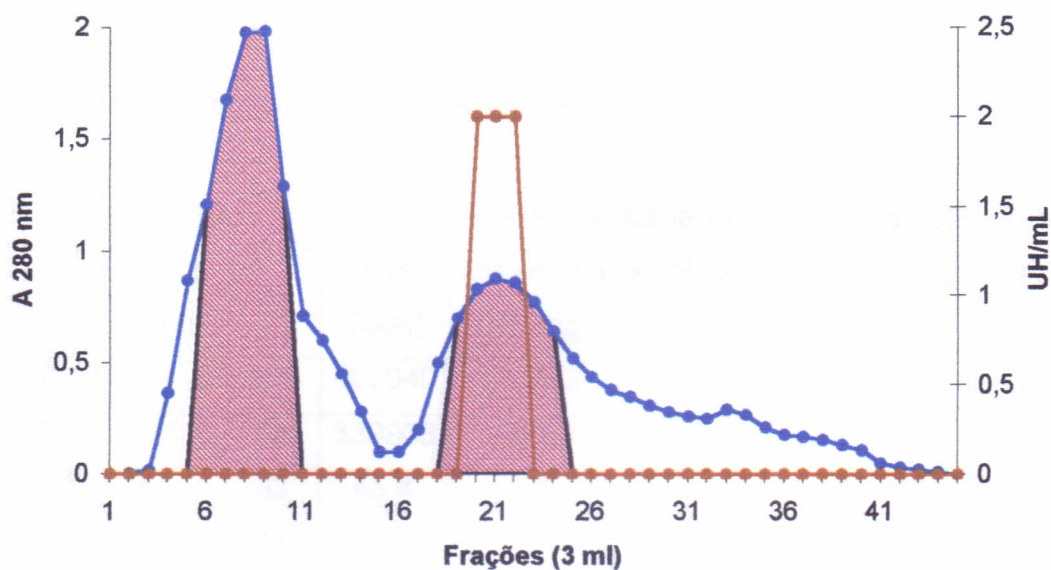



FIGURA 5 - Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 do PI-manana. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. (●—●) A 280 nm; (●—●) UH/ml;  Atividade tóxica.

TABELA 7 - Purificação da toxina da alga *S. filiformis*

Frações	Proteína			Atividade Hemaglutinante			Atividade Tóxica	
	mg/ mL	Total (mg)	%	UH Total*	Específica (UH/mg)	Purificação (x)	DL <sub>50</sub> ** (mg/Kg)	Purificação (x)
Extrato	0,12	190,8	100	407040	2133,3	1,0	16,5 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
F0/70	2,90	120,4	63	339968	2823,7	1,3	13,8 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>
PI-Manana	2,82	64,0	33	45,4	0,7	-	21,7 <sup>a</sup>	
PI-Sephadex	1,12	21,0	11	-	-	-	17,8 <sup>b</sup>	-

\*U.H. Total – Unidades de hemaglutinação total

\*\*Miligramas de proteína capaz de matar 50% dos animais testados por via ip. ou iv.

<sup>a</sup> por via ip.

<sup>b</sup> por via iv.

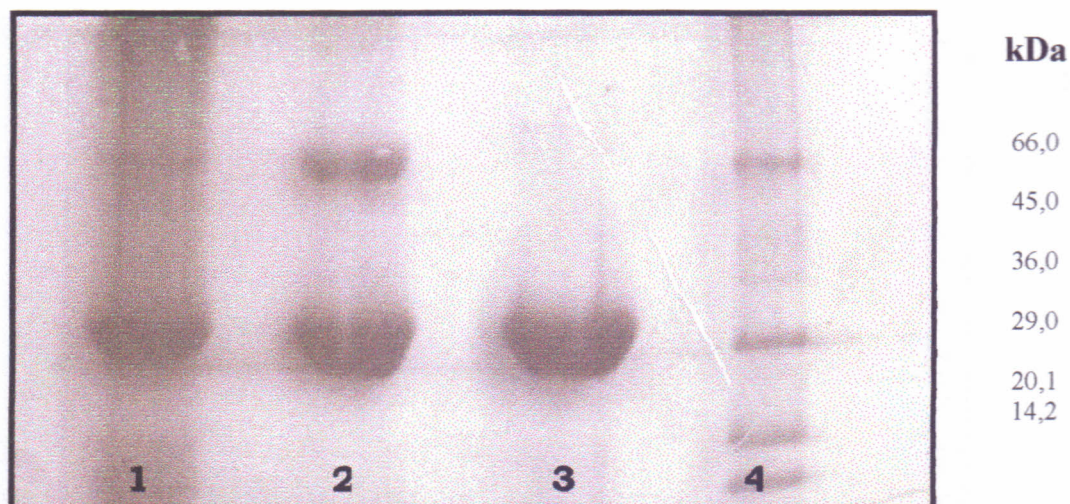


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e na ausência e presença de  $\beta$ -mercaptoetanol

1. PI-Manana somente com SDS
2. PII-Manana somente com SDS
3. PII-Manana com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol
4. Marcadores:  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa); Anidrase Carbônica (29,0 kDa); Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (36,0 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa) e Albumina sérica bovina (66,0 kDa).

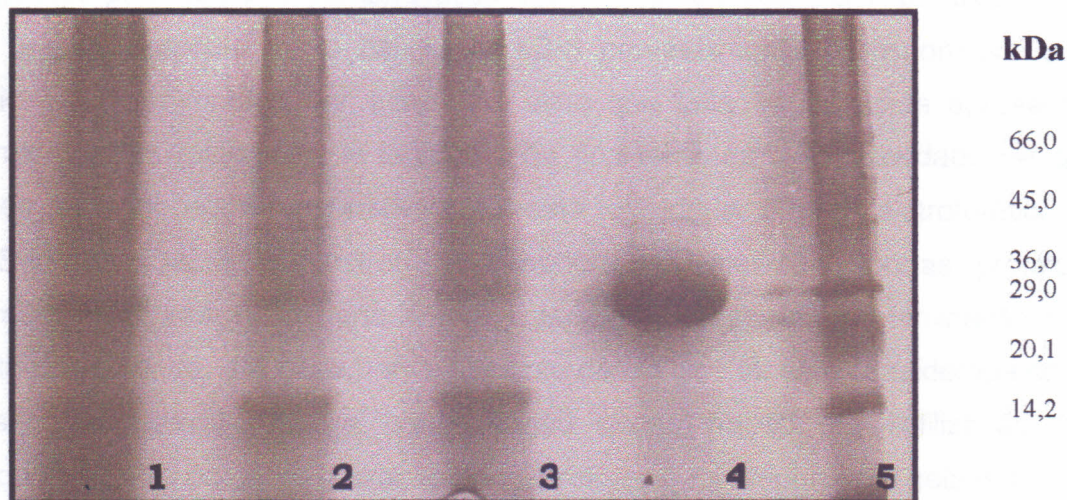


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol

1. PI-Manana
2. e 3. PI-Sephadex
3. PII-Manana
4. Marcadores:  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa); Anidrase Carbônica (29,0 kDa); Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (36,0 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa) e Albumina sérica bovina (66,0 kDa).



bandas protéicas de massas moleculares correspondendo às obtidas para as duas subunidades da lectina quando determinadas na ausência de  $\beta$ -Mercaptoetanol sugerindo portanto, uma contaminação desta fração pela lectina. A banda protéica de massa molecular mais baixa (14 kDa) provavelmente é responsável pela toxicidade apresentada por este pico, visto que esta fração ainda apresentou contaminantes (pigmentos e lectina), não fica excluída a possibilidade de que estes também sejam responsáveis por esta toxicidade. O perfil eletroforético do PI-Sephadex também mostrou a presença das mesmas bandas protéicas apresentadas pelo PI-manana, ou seja, também apresentou contaminação pela lectina, apesar da atividade hemaglutinante desse pico ter sido considerada como ausente. Provavelmente, a concentração dessa fração por liofilização (PI-Sephadex) para posterior utilização por eletroforese, foi responsável pela detecção da lectina, o que não ocorreu no ensaio de hemaglutinação, que foi avaliado quando esta se encontrava em baixas concentrações.

#### 5.7 . Avaliação Histopatológica da Ação da Lectina da Alga *S. filiformis*

Na avaliação histopatológica por aplicação das frações protéicas, PI-manana e PII-manana, em camundongos por via iv., estas induziram contrações abdominais acentuadas com sangramento transvaginal nos momentos que antecederam à morte dos animais. Imediatamente após a morte, estes foram necropsiados onde foi observado que a cavidade intra -abdominal apresentava-se hemorrágica para todas as frações protéicas avaliadas, sendo com menor intensidade para o PI-manana (FIGURA 8).

O exame histopatológico dos órgãos pulmões, coração, fígado e rins (FIGURAS 9 a 14) mostrou: 1 - no fígado: congestão acentuada em sinusóides e espaço porta-biliar com discreto infiltrado mononuclear; 2 - nos pulmões: acentuada congestão interlobular e septal, enfisema pan-acinar, bronquectasia e edema intra-alveolar focal; 3 - no baço: moderada congestão esplênica; 4 - no

estômago: moderada congestão e edema na parede; 5 - no coração: moderada congestão e hemorragia recente focal no miocárdio e 6 - nos rins: acentuada congestão na cortical e medular com áreas focais de hemorragia recente.

Nesta avaliação histopatológica ficou evidenciada a congestão plurivisceral com focos de hemorragia recente, focos esparsos de necrose nos parênquimas hepático e renal e microtrombos em alças capilares dos glomérulos renais, ocasionada pelos efeitos tóxicos da lectina (PII-manana) e toxina (PI-manana), tendo estes efeitos se mostrado mais evidentes para a lectina. Estas alterações, sugerem o quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD). Esses resultados confirmam portanto, a toxicidade dos componentes protéicos (lectina e toxina) presentes na alga *S. filiformis*. Congestão generalizada, mas de forma moderada, também foi observada recentemente para a lectina da alga *Gracilaria ornata* quando aplicada em camundongos por via iv. (DL<sub>50</sub> 50 mg/Kg de peso do animal) por LEITE (2003), mostrando portanto, ser a lectina desta alga de mais baixa toxicidade. Pesquisas relacionadas à detecção e isolamento de proteínas com atividade tóxica em algas marinhas só foram iniciadas por SILVA (1997), que encontrou um componente tóxico para camundongos por via ip., distinto da lectina, na alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba*. Posteriormente, BENEVIDES *et al.* (1998a), estudando dez espécies de algas marinhas das famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hipneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae, observaram que nove das dez espécies avaliadas tiveram seus extratos fortemente tóxicos para camundongos quando injetados por via ip.. SILVEIRA (2001) purificou uma toxina, distinta da lectina, da alga marinha vermelha *Amansia multifida* que se mostrou altamente tóxica para camundongos por via iv. (DL<sub>50</sub> 0,21 mg/kg de peso do animal). SANTOS (2001) purificou uma lectina de folha de salsa (LTS), que foi altamente tóxica para camundongos por via iv. (DL<sub>50</sub> 0,22 mg /kg de peso do animal).

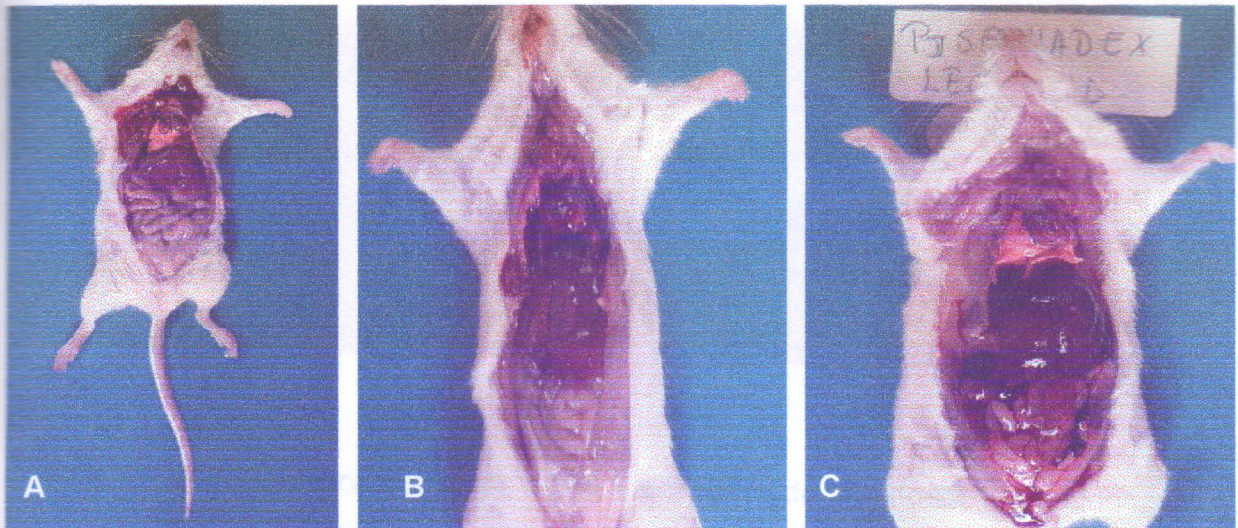


FIGURA 8 - Necropsia de camundongos pós-morte por efeitos tóxicos da lectina e toxina da alga *S. filiformis*. A - controle; B - Toxina e C - Lectina.

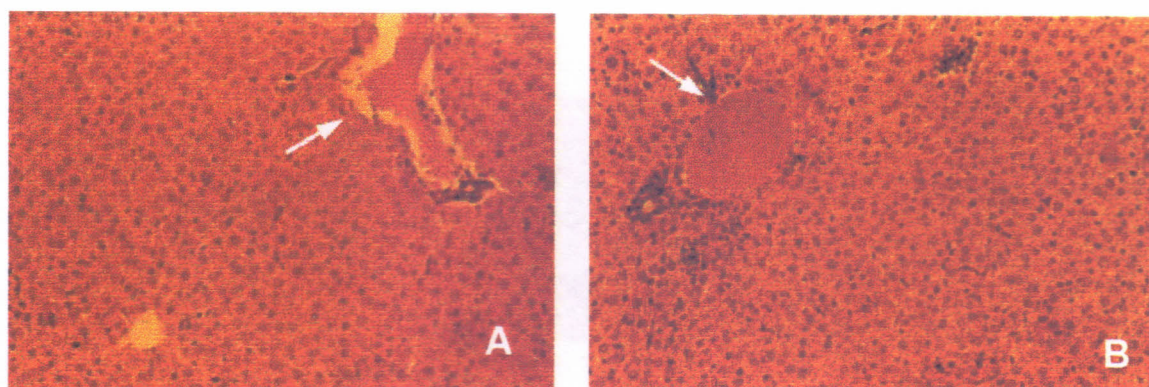


FIGURA 9 - Fotomicrografia de corte histológico do fígado de camundongos submetidos a aplicação com a lectina da alga *S. filiformis*. A - Congestão acentuada em sinusóides e espaço porta-biliar e B - Congestão acentuada em sinusóides e espaço porta-biliar e discreto infiltrado mononuclear (Corante: HE; Objetiva: 100 X).

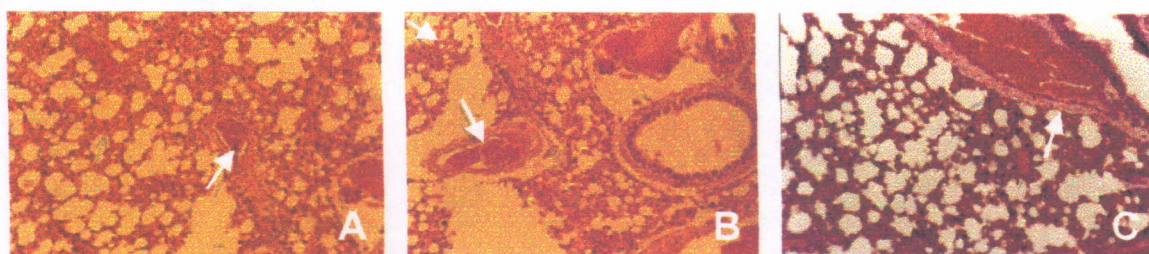


FIGURA 10 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão de camundongos injetados com lectina tóxica da alga *S. filiformis*. A - acentuada congestão interlobular e septal, enfisema pan-acinar, bronquectasia; B - Acentuada congestão interlobular e septal e enfisema pan-acinar e C - Congestão acentuada interlobular e septal e enfisema intra -alveolar focal (Corante: HE; Objetiva:100 X).

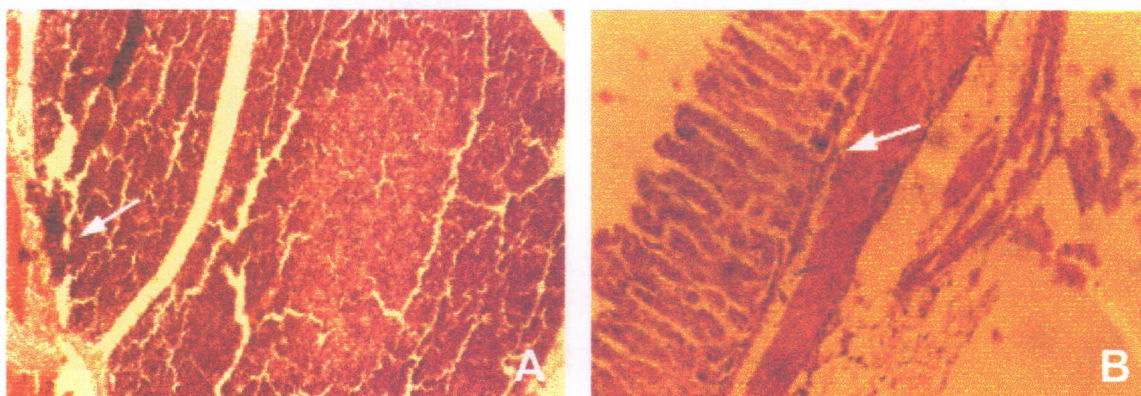


FIGURA 11 - Fotomicrografia de corte histológico de camundongos quando aplicado lectina tóxica da alga *S. filiformis*. A – Baço: Moderada congestão esplênica; B – Estômago: Moderada congestão e edema na parede do estômago (Corante: HE; Objetiva: 100 X).

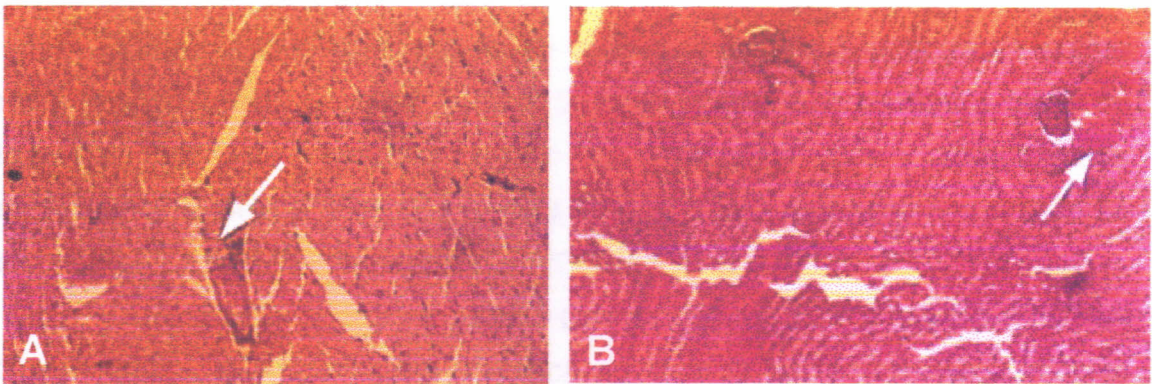


FIGURA 12 - Fotomicrografia de corte histológico de camundongos quando aplicado a lectina tóxica da alga *S. filiformis*. A – Coração: Moderada congestão e hemorragia recente focal no miocárdio; B – Rins: Acentuada congestão na cortical e medular com áreas focais de hemorragia recente (Corante: HE; Objetiva:100 X).

### 5.8 Avaliação da Atividade Tóxica dos Extratos Total e Aquoso, da Toxina e Lectina da alga *S. filiformis* sobre o Ciclo Evolutivo do Carrapato Bovino *B. microplus*

Os resultados da avaliação de toxicidade das frações protéicas extrato total e aquoso, toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre as diferentes fases do ciclo de vida do carrapato bovino *B. microplus* foram comprovados estatisticamente pela análise das médias obtidas dessa avaliação em relação ao controle (água) e estão mostrados nas FIGURAS 13 a 20.

A avaliação dos dados obtidos com os extratos total e aquoso (FIGURA 13) demonstrou que houve uma diferença significativa nos pesos das teleóginas (PT) e da massa total dos ovos (PMTO) que foi reduzida em 22% e 17%, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa nos pesos das quenóginas (PQ).

Na análise da influência dessas mesmas frações sobre os períodos de postura das teleóginas (PPT), de incubação dos ovos (PI) e de eclosão (PE), mostrada na FIGURA 14, foi observada um efeito tóxico de redução do PPT (10% e 12%, respectivamente) levando a um aumento no PI (32% e 29%, respectivamente), seguidos de um menor período de eclosão (PE) (27% e 36%, respectivamente).

A variável percentagem de eclosão (%E) foi reduzida em 28% somente para o extrato total em relação ao controle. Entretanto, não foi observado diferença significativa para os índices de eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) para os dois tratamentos (FIGURA 15).

Com relação ao período de sobrevivência das larvas (PS), este foi reduzido em 22% e 23%, respectivamente, para os dois tratamentos mostrando a ação tóxica dessas frações sobre o desenvolvimento das larvas de *B. microplus*. Entretanto, não foi observada diferença significativa para o período de mortalidade para os dois tratamentos (FIGURA 16).



Na análise de comparação das médias dos efeitos tóxicos entre esses dois tratamentos (extratos total e aquoso) mostrada na TABELA 8, ficou evidenciado que o efeito tóxico do extrato total foi maior do que o observado com o extrato aquoso, visto que este levou a um aumento do período de incubação dos ovos, o qual ocasionou uma redução na percentagem de ovos eclodidos.

Esses resultados sugerem a presença de componente(s) com atividade tóxica na alga *S. filiformis* sobre a maioria das fases do ciclo de vida do *B. microplus* avaliadas e, descarta a possibilidade dos efeitos tóxicos produzidos terem sido ocasionados pelo tampão de extração do extrato total (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5), visto que os dois tratamentos mostraram resultados semelhantes para a maioria das variáveis analisadas em relação ao controle.

Dando continuidade a este estudo de atividade tóxica, as frações toxina e lectina, também foram avaliadas estatisticamente em relação ao controle.

Nesta análise foram observadas diferenças significativas para as variáveis PQ e PMTO (FIGURA17) para os dois tratamentos, sendo o efeito tóxico mais acentuado para a lectina. Provavelmente, a diferença significativa obtida em relação ao PMTO (redução) foi ocasionada pela retenção dos ovos nas quenóginas que apresentaram um aumento de peso em relação ao controle em consequência da toxicidade destas frações protéicas.

Na FIGURA 18 observa-se que houve um efeito tóxico mais evidente para os dois tratamentos em relação a redução dos PPT e PE quando comparados ao controle. Nesta análise, a lectina mostrou-se mais tóxica, ocasionando uma redução desses períodos de 54% e 45%, respectivamente. Enquanto a toxina exerceu efeito tóxico somente sobre o período de eclosão dos ovos (PE).

Ainda na avaliação da influência das mesmas frações sobre as variáveis %E, PS e PM (FIGURAS 19 e 20) foram obtidos resultados com efeitos tóxicos de redução considerados significativos para os dois tratamentos, onde reduções maiores também foram obtidas para o tratamento com a lectina.

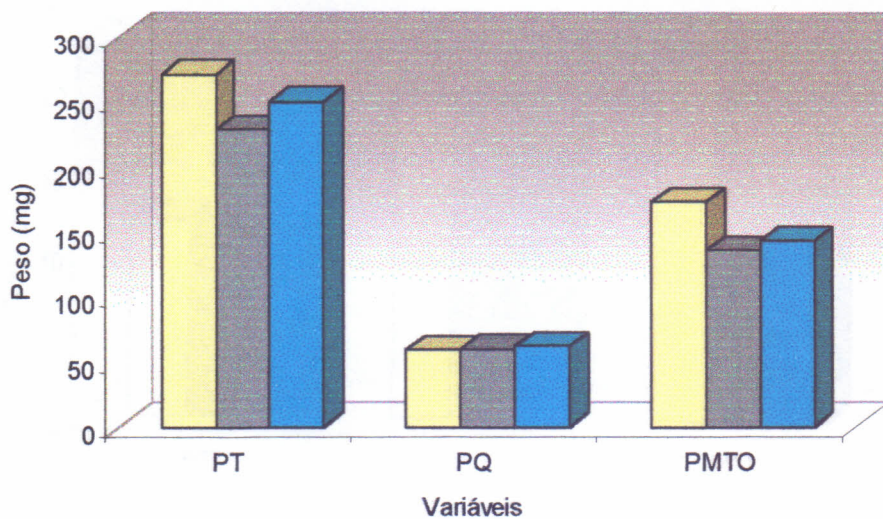


FIGURA 13 - Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas, quenóginas e da massa total de ovos de *B. microplus*.

● Controle; ● Extrato Total; ● Extrato Aquoso

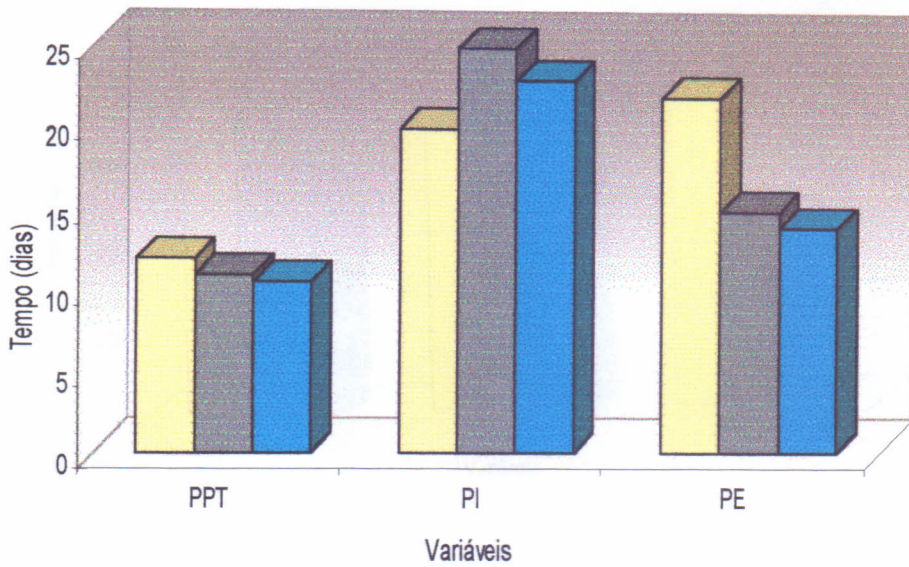


FIGURA 14 - Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas e períodos de incubação e eclosão dos ovos de *B. microplus*. ● Controle; ● Extrato Total; ● Extrato Aquoso

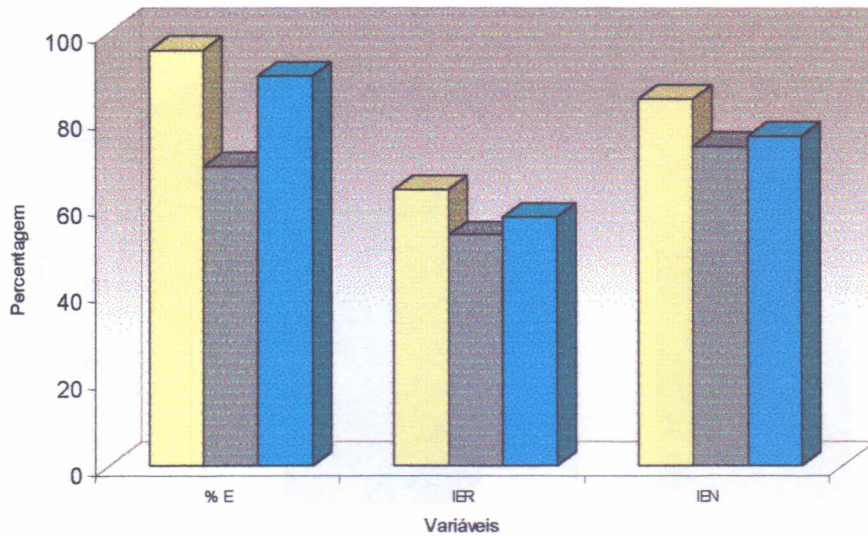


FIGURA 15 - Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos e das eficiências reprodutiva e nutricional do *B. microplus*. ● Controle; ● Extrato Total; ● Extrato Aquoso

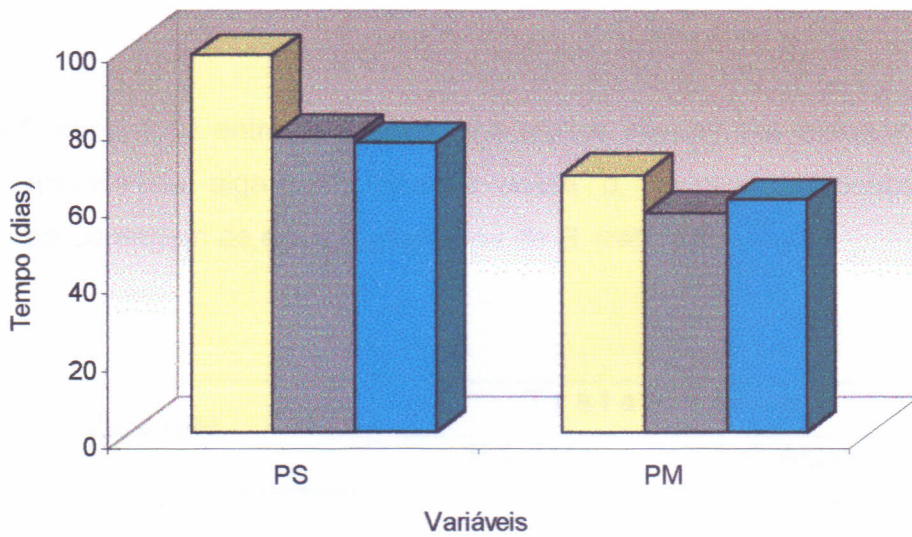


FIGURA 16 - Efeitos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de sobrevivência e mortalidade das larvas de *B. microplus*.

● Controle; ● Extrato Total; ● Extrato Aquoso

Tabela 8 - Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre o período de incubação e percentagem de eclosão dos ovos de *B. microplus*.

Variáveis	Tratamentos	
	Ext. Total	Ext. Aquoso
PI	36,8 <sup>A</sup>	23,2 <sup>B</sup>
% E	74,4 <sup>A</sup>	90,2 <sup>B</sup>

Médias no sentido das linhas seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0,05$ ). PI: Período de incubação; %E: Percentagem de eclosão.

A TABELA 9 mostra a comparação entre as médias dos tratamentos lectina e toxina, onde foi verificada uma variação significativa para as variáveis PMTO, PPT, PM e EP. A lectina mostrou - se mais tóxica que a toxina, visto que, ocasionou uma redução mais acentuada para o período de postura da teleógina levando a uma maior redução de oviposição (massa de ovos) e da mortalidade das larvas, comprovando desta maneira sua maior eficiência (EP).

Portanto, esses resultados preliminares de atividade tóxica para a lectina da alga *S. filiformis*, sugerem que ela poderá ser empregada como uma ferramenta importante nos estudos das diferentes fases do ciclo de vida do carrapato bovino *Boophilus microplus*, assim como, contribuir com dados para estudos posteriores de utilização de lectinas de algas marinhas no controle de ectoparasitas.

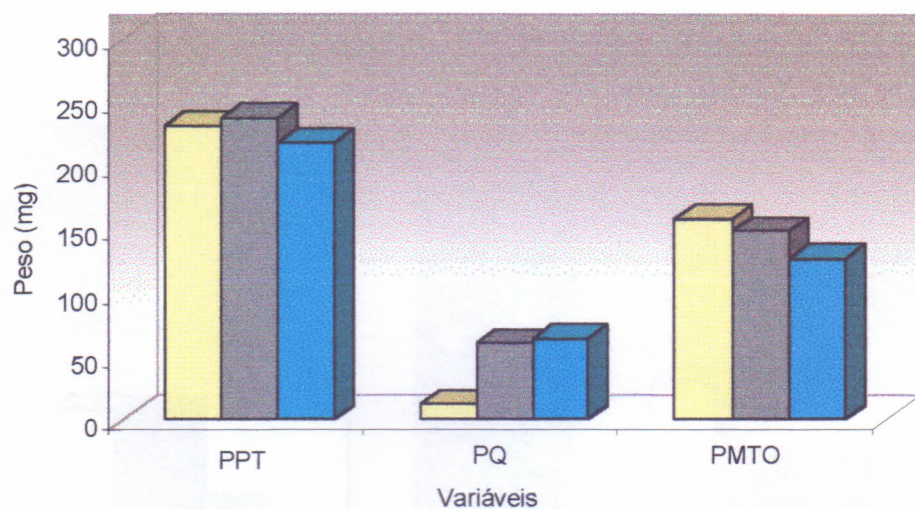


FIGURA 17 - Efeitos da Toxina e Lectina da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas, quenóginas e da massa total de ovos de *B. microplus*.

● Controle; ● Toxina; ● Lectina



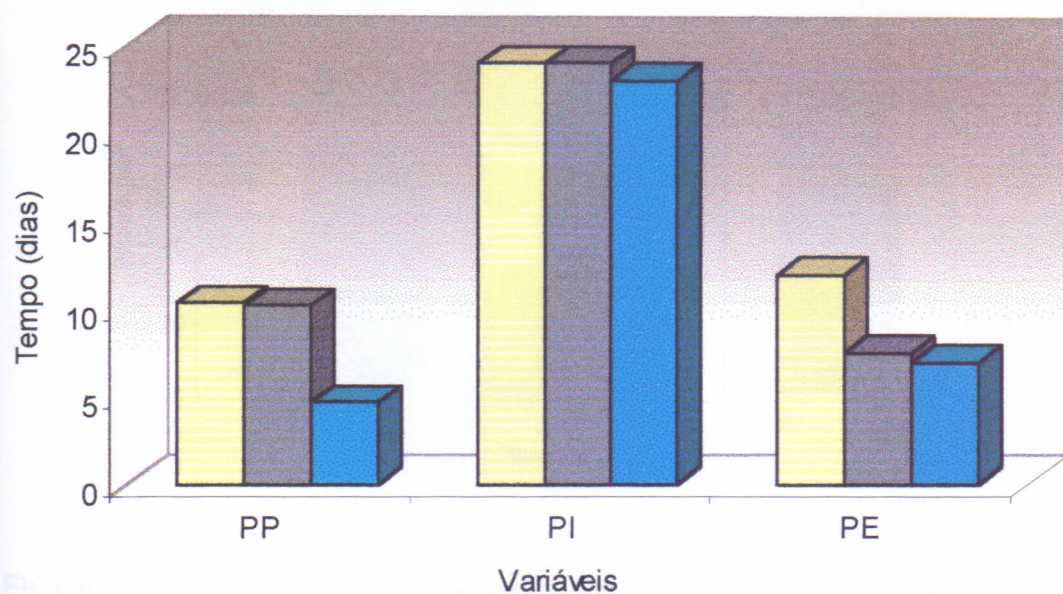


FIGURA 18 - Efeitos da Toxina e Lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas e períodos de incubação e eclosão dos ovos de *B. microplus*. ● Controle; ● Toxina; ● Lectina

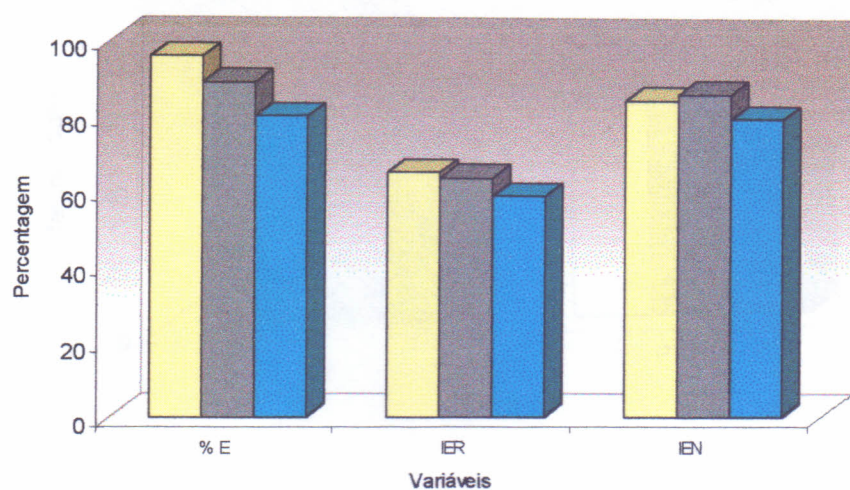


FIGURA 19 - Efeitos da Toxina e Lectina da alga *S. filiformis* sobre a porcentagem de eclosão os ovos e das eficiências reprodutiva e nutricional do *B. microplus*. ● Controle; ● Toxina; ● Lectina

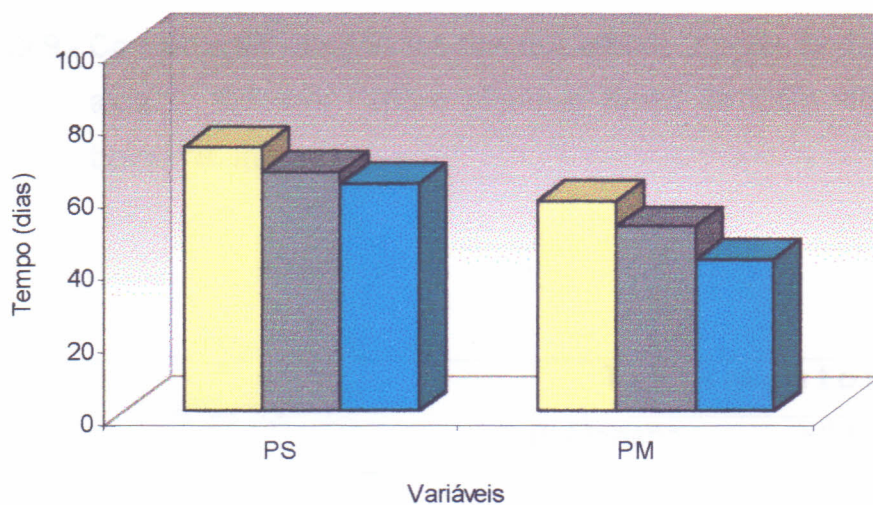


FIGURA 20 - Efeitos da Toxina e Lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de sobrevivência e mortalidade das larvas do *B. microplus*. ● Controle; ● Toxina; ● Lectina

Tabela 9 - Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre algumas fases do ciclo vital do carrapato bovino *B. microplus*.

Variáveis	Tratamentos	
	PI Manana	PII Manana
PMTO	151,32 <sup>A</sup>	127,44 <sup>B</sup>
PP	10,20 <sup>A</sup>	4,73 <sup>B</sup>
PM	51,0 <sup>A</sup>	42,27 <sup>B</sup>
EP	5,97 <sup>A</sup>	19,57 <sup>B</sup>

Médias no sentido da linha seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0,05$ ). PMOT: Peso da massa total de ovos, PP: Período de postura, PM: Período de mortalidade, EP: Eficiência do produto.

### CONCLUSÃO

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

## 6. CONCLUSÕES

### 6. CONCLUSÕES

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...  
... não ...

### CONCLUSÕES

A toxina de massa molecular de 14 (kDa) presente na alga *S. filiformis*, não é a única responsável pela toxicidade apresentada no pico I, obtido no procedimento cromatográfico de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100, uma vez que, este pico ainda apresentou-se levemente pigmentado, não fica excluída a possibilidade de que os pigmentos ou outro(s) componente(s) sejam também responsáveis por esta toxicidade.

A lectina tóxica (DL<sub>50</sub> 1,7 e 1,5 mg/Kg de peso corpóreo por vias ip. e iv., respectivamente, e a toxina (DL<sub>50</sub> 21,7 e 17,8 mg/Kg de peso corpóreo por vias ip. e iv., respectivamente) presentes na alga *S. filiformis*, ocasionaram alterações dos órgãos (fígado, pulmões, rins, coração e estômago) de camundongos "swiss" evidenciando, congestão e focos hemorrágicos das vísceras, necrose dos parênquimas hepático e renal e microtrombos nas alças capilares dos glomérulos renais, caracterizando o quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD), que confirma a toxicidade destas proteínas.

A lectina e a toxina da alga *S. filiformis* mostraram-se tóxicas ao ciclo evolutivo do ectoparasita *Boophilus microplus*, sendo mais intensos os efeitos tóxicos sobre as fases de redução do peso total da massa dos ovos; redução dos períodos de postura da teleógina e de mortalidade e, o maior índice de eficiência do produto, induzidos pela lectina.

Os ensaios preliminares de atividade tóxica para a lectina da alga *S. filiformis*, nas diferentes fases do ciclo de vida do carrapato *B. microplus*, indicam que ela poderá contribuir com dados para estudos posteriores de utilização de lectinas de algas marinhas no controle do *B. microplus*.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H. Screening of brasilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marinha**, v. 34, p. 211 - 214, 1991.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H., FREITAS, A. L. P., BENEVIDES, N. M. B. & MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryotamnion seaforthii* and *Bryotamnion triquetrum*, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n.1, p. 15 - 19, 1995.

ANDERSON, L., LIDGREN, G., BOHLIN, L, PISA, P., WIGZELL, H. & KIESSLING, R. Studies on Swedish marine organisms. V.A screening for lectin like activity. **Acta Pharmaceutica Suecica**, p. 91 - 100, 1986.

A.O.A.C – Association of official Agriculture Chemists. Official Methods of Analysis. **Washington D.C.** 12<sup>th</sup> Ed, p. 1094, 1975.

ARASAKI, S. & ARASAKI, T. **Low calorie, high nutrition vegetables from the sea**. Zurich, Japan Publication, Inc & Tóquio Boserbooks Inc. Limmastrasse III, p. 86 - 173, 1983.

AU, T. K. Chick, W, S. H. Leug, P. C. Initial kinetics of the inativacion of calmodulin by the toxin Ophiobolin **A. Main group met. Chem.** v.,23, n. 5, p. 291 - 297, 2000.

BALLESTEIROS, E., MARTIN, D. & URIZ, J. Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. **Botanica Marina**, v.35, p. 481 - 485, 1992.



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, n. 2, p. 117-122, 1996.

BENEVIDES, N. M. B., SILVA, M. S. S., MAGALHÃES, S. R. MELO, F. R., FREITAS, A. L. P., VASCONCELOS, I. M. Proximate analyses, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n.1, p. 31 - 36, 1998a.

BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P., SAMPAIO, A. H. Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Enantiocladia duperrevi* (C. Agardh) Falkenberg, **Botanica Marina**, v.41, p. 521 - 525, 1998b.

BENEVIDES, N. M. B., OLIVEIRA, S. R. M., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P., SAMPAIO, A. H. Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red marine algae *Gracilaria domigensis* and *Gelidium pusillum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 2, p. 91 - 95, 1999.

BENEVIDES, N. M. B., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., MONTEIRO, A. C. O. & FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v. 44, p.12 - 22, 2001.

BIRD, K. T., CHILES, T. C., LONGLEY, R. E., KENDRICK, A. F. & KINKEMA, M. D. Agglutinins from marine macroalgae of the southeastern United states. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 213 - 218, 1993.

BLUNDEN, G. & ROGERS, D. J. Survey of british seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**, v. 38, n. 2, p.162 - 168, 1975.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 722, p. 248 - 254, 1976.

BROEKAERT, W. F., CAMMUE, B. P. A., DE BOLLE, M. F. C., THEVISSSEN, K., DE SAMBLANX, G. W. & OSBORN, R. W. Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews Plant Science**, v.16, p. 297 - 323, 1996.

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

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, p. 667 - 676, 1981.

CARLINI, C. R., BARCELOS, G. B. S., BAETA-NEVES, A D. V., GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin among proteins of leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 25 - 30, 1988.

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon**, v. 29, n. 7, p. 791 - 806, 1991.

CASELLAS, P., BROWN, J. P., GROS, O., GROS, P., HELLSTROM, I., JANSEN, F. K., PONCELET, P., RONCUCCI, R., VIDAL, H., HELLSTROM, K. E. Human melanoma cells can be killed *in vitro* by an immunotoxin specific for melanoma-associated antigen p 97. **International Journal of Cancer**, v. 30, p. 437 - 443, 1982.

CARPER, J. **Seaweed or Kelp**. The Food Pharmacy, Bantam Books, New York, p. 264 - 268, 1989.

CHAPMAN, V. J. **Seaweeds and their uses**. London, Chapman and Hall, 135p. 1970.

CUMMINGS, R. D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. *In*: H. J. Gabius & S. Gabius, eds. **Glyco-science, status and perspectives**. Chapter 10. Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany, p. 191 -199, 1997.

COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S. A., ROCHA, M. L. A., BENEVIDES, N. M. B. & FREITAS, A. L. P. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v.5, p. 53 - 61, 1999.

DARCY-VRYLLON. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. **Journal of the Food Science and Nutrition**, v. 44, n.1, p. 523 - 535, 1993.

DIXSON, T. (1887) **Australas. Med. Gaz.**, v. 6, n. 137, citado por KOCOUREK, 1986.

D'MELLO, J. P. F., DUFFUS, C. M. , DUFFUS, J. H. Toxic substances in crop plants. **Ed. The Royal Society of Chemistry**, cap. 4, p.104, 1991.

DUBOIS, M., GILLERS, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.

DRUMMOND, R. O., ERNST, S. E., TEVINO, J. L., GLADNEY, W. J., GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* an *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.**, v. 66, n. 1, p. 130 - 133, 1973.

ENDO, Y., GLUCK, A., WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for Ricin A-chain recognition and catalysis. **Journal Molecular Biology**, v. 221, p. 193 - 207, 1991.

ENDO, Y.; MITSUI L.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxin lectins on eukaryotic ribosomes, **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 5908 -5912, 1987.

ERICSON, L. E. & LEWIS, L. On the vitamin B12 factors in marine algae. **Arkiv for Kemi**.v. 6, p. 427 - 442, 1953.

FARIAS, N. A. R.; BELLAN, S. E.; SOUZA, R. B.; LUCAS, A. S. ; BERNE, M. E. A.; RUSA, J. L. Resistência do Carrapato *Boophilus microplus* a acaricidas no Sul do RS e a relação com práticas de manejo. **Anais XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2001.

FENICAL, W. Natural products chemistry in the marine environment. **Science**, v. 215, n. 4535, p. 923 - 928, 1982.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. 3 ed. Nobel. São Paulo, 1985.

- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Porto Alegre, Editora Sulina, 453 pp, 1987.
- FREITAS, M. G.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O.; ILDE, P. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária**. 4 ed. Belo Horizonte, 1978.
- FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D.I. A, COSTA, F. H. F., FARIAS, W. R. L., LOBATO, A S. C., SAMPAIO, A H., BENEVIDES, N.M. B. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. **J. Appl. Phycol.** V. 9, p. 495 - 501, 1997.
- FULLER, R. W., CARDELLINA II, J. H., KATO, Y., BRINEN, L. S., CLARDY, J., SNADER, K. M. & BOYD, M. R. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria homemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. **J. Med. Chem.**, v. 35, p. 3007 - 3011, 1992.
- GATEHOUSE, A. M. R., BARBIERI, L., STIRPE, F., CROY, R. R. D. Effects of ribosome-inactivating proteins on insect development – Differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 54, p. 43 - 51, 1990.
- GIRBÉS, T., FERRERAS, J. M., IGLESIAS, R., CITORES, L., DE TORRES, C., CARBAJALES, M. L., JIMENEZ, P., DE BENITO, F. M., MUNOZ, R. **Cell. Mol. Biol.**, v. 42, p. 461 - 471, 1996.
- GIUDICI, A. M., REGENTE, M. C. & LA CANAL, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 38, p. 881 - 888, 2000.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGUES, R. C, MONSIGNY, M, OSAVAT, SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOMES, A.; KOLLER, W. W.; FURLONG, J. Diagnóstico da resistência a carrapaticidas do *Boophilus microplus* em bovinos de corte e leite no Estado de Mato Grosso do Sul. **Anais. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2001.

GRANT, G., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., MURRAY, S., ATKINSON, T., FARNINGHAN, A. H., PUSZTAI, A. Secretion of pancreatic digestive enzymes induced in rats by first-time oral exposure to kidney bean E2L2 lectin is mediated only in part by cholecystokinin (CCK). **Pancreas**, v. 19, p. 382 - 398, 1999.

GRANT, G.; MURRAY, S.; GRAVELLS, E.; DUGUID, T. J.; BARDOCZ, S. & PUSZTAI, A. In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseede*, p. 233 - 237. Edited by Jansman, A. J. M.; HILL, G. D.; Huisman, J. & van der Poel, A. F. B. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers, 1998.

GUEDES, E. A. C., MACEDO, S. J., PEREIRA, S. M. B. Avaliação sazonal na composição química de algumas espécies de algas bentônicas da praia de Jaguaribe (Itamaracá-Pe). **Boletim de Estudos de Ciências do Mar**. Publicação do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal de Alagoas. Mar. N. 7, p. 45, 1988.

HAMERSTRAND, G. E., BLACK L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standart analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 42 - 45, 1981.

HAY, M. E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. **Ecology**, v. 68, n. 6, p. 1581 - 1591, 1987.

HAY, M. E., FENICAL, W. Marine plant-herbivore interaction. The ecology of chemical defense. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 19, p. 11 - 45, 1988.

HAYASHI, K., HAMADA, J. & HAYASHI, T. A screening strategy for selection of anti-HSV-1 and anti-HIV extracts from algae. **Phytotherapy Research**, v. 10, n.3 p. 233 -237, 1996.

HARTLEY, M. R., CHADDOCK, J. A. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 8, p. 254 - 260, 1996.

HARVEY, W. Cracking open marine algae. **Biological Treasure Chest. Bio/Technology**, v. 6, n. 5, p. 487 - 492, 1988.

HEJGAARD, J. JACOBSEN, S. and SVENDSEN, I. Two antifungal thaumatin-like protein from barley grain. **FEBS**. v. 291, n. 1, p. 127 – 131, 1991.

HELLIN, H. Thesis University of Dopart, Dopart (Tartu). Quoted according to: KOCOUREK, J. (1891). Historical background, In: (LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. eds.), The lectins, properties, functions and applications in biology and medicine. **Academic Press Inc.**, New York, p 1 - 32, 1986.

HIVY, F. Seaweed utilization in India. New Delli, ICAR. **Proceedings**. Symposium Algology. p. 345 - 365, 1960.

HORI, K., MATSUDA, H., MIYAZAWA, K., ITO, K. A mitogenic agglutinin from red alga *Carpopeltis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1335 - 1338, 1987.

HORI, K., IKEGAMI, S., MIYAZAWA, K., ITO, K. Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2063 - 2067, 1988.

HORI, K., MIYAZAWA, K., ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiology**, v. 204-205, p. 561 - 566, 1990.

HORI, K., MATSUBARA, K. & MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1474, p. 226 - 236, 2000.

IRVIN, J. D. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukariotic protein synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 169, p. 522 - 528, 1975.

ISHIHARA, T.; YASUDA, M. Y.; SUCHIMOTO, T. Protease inhibitors contained in algae (1): Trypsin inhibitors in Purple Laver. **J. Jap. Soc. Food and Nutr.**, v. 21, p. 45 - 48, 1968.

JONGSMA, M. A. & BOLTER, C. The adaptation to plant protease inhibitors, **JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY**, v. 43, n.10, p. 885 - 895, 1997.

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G. & GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, n.1, p. 1 - 11, 1998.

JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo. Livraria Editora Santos, 1983.

KAEHLER, S. and KENNISH, R. Summer and Winter Comparisons in the Nutritional Value of Marine Macroalgae from Hong Kong. **Botanica Marina**, v. 39, p. 11 - 17, 1996.

KAKITA, H., FUKUOKA, S., OBIKA, H., LI, Z.F. & KAMISHIMA, H. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Botanica Marina**, v. 40, p. 241 - 247, 1997.



KATAOKA, J.; HABUKA, N.; MIYANOM,; TAKANANI,Y.; KOOIWAI, A. DNA sequence of Mirabilis antiviral protein (MAP), a ribosome inactivating protein with antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L. and its expression in *E. coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 8426 - 8430, 1991.

KONIG, G. M. & WRIGHT, A. D. Marine natural products research: current directions and future potencial. **Planta Medica**, v. 62, p. 193 - 211, 1996.

KREEITMAN, R. J.; PASTAN, I. Immunotoxins from targeted cancer theraty. I. **Advanced Drug Delivery Reveiws**. v. 31, p. 53 - 88, 1998.

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

LARANJA, R. J.; SERESÉ, V. H.; MARTINS, J. R. DE S.; CASTAGNA, M.; FERREIRA, F.; EVANS, D. E. Potencial de Produção do *Boophilus microplus* na Região de Campo de Cima da Serra, Vacaria, RS. **Bol. IPVDF**, Guaíba, p. 1 - 122, 1996.

LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I., MUNDY, J. Biochemincal and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1564 - 1573, 1991.

LE GUEN, M. P. & BIRK, Y. In: HUISMAN, J. & SAINI, H. S. **Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds**. Edited by van der Poel, A. F. B.; Wageningen, the Netherlands: Wageningen Pers, p. 157 – 171, 1993.

LEITE, Y. F. M. M. Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Gracilaria ornata* (SCHNETER) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará. **Tese de Doutorado**, 2003.

LIENER, I. E.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, Academic Press, New York, 600 pp, 1986.

LIENER, I. E. In: Food uses of whole oil and protein seeds, p. 334 - 357. Edited by Lucas, E. W., Erickson, D. R. and Nip, w. Illinois, USA: American Oil Chemistry Society, 1989.

LIMA, H. L., COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A. H., NEVES, S. A., BENEVIDES, N. M. B., TEIXEIRA, D. I. A., ROGERS, D., FREITAS, A L. P. Induction and inhibition of lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phicology**, v. 10, p. 153 - 162, 1998.

LINHARES, S. & GEWANDSZNADJER, F. **Biologia Hoje**, Ed. Ática, 406pp, 1997.

LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, F. A simplified method for evaluation of dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99 - 104, 1949.

LORD, J. M., ROBERTS, L. M., ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **FASEB Journal**, v. 8, p. 201 - 208, 1994.

MABEAU, S., CAVALOC, E., FLEURENCE, J., LA HAYE, M. New seaweed based ingredients for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, p. 38 - 44, 1992.

MAYER, A. M. S., PAUL, V. J., FENICAI, W., MORRIS, J. N., CARVALHO, M. S. & JACOBS, R. S. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from marine algae. **Hydrobiology**, v. 260, n. 261, p. 521 - 529, 1991.

MAUCH, F.; HADWIGER, L. A.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3 glicanases differentially regulated during developments in response to fungal infection. **Plant Physiol.**, v. 87, p. 325 - 333, 1988a.

MAUCH, F.; MAUCH-MANY, B. & BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of  $\beta$ -1,3 glucanase. **Plant Physiology**, v. 88. p. 936 - 942, 1988.

MEHTA, A. D. & BOSTON, R. S. Ribosome-inactivating proteins. In: J. Bailey-Serres, D. R. Gallie, eds, **A Look Beyond Transcription: Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, M. D., p. 145 - 152, 1998.

MENDONÇA, P. **Propriedades farmacológicas do extrato da alga Liagora farinose (Rhodophyta, Nemaliales)**. São Paulo, SP, 101pp. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 1999.

MIZUKOSHI, S., MATSUOKA, H. & KATO, F. Effect of seaweed preparations on murine immunocytes. **J. Appl. Phycol.**, p. 629 - 637, 1993.

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

NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELO, J. P. F., DUFFUS, C. M. (ed.) **Toxic Substances in Crop Plants**. Edinburg: The Scottish Agricultural College, cap. 4, p. 69 - 106, 1991.

OLIVEIRA, S. R. M., NASCIMENTO, A. E., LIMA, M. E. P., LEITE, Y. F. M. M. & BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red

marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 397 - 403, 2002.

OLSNES, S., REFSNES, K., PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. **Nature**, v. 249, p. 627-631, 1974.

OLSNES, S.; STIRPE, F.; SANDVIGS, K.; PHIL, A. Isolation and characterization of viscumin a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). **Journal Biology Chemistry**, v. 257, p. 13263 - 13270, 1982.

OLSNES, S. and PIHL, A. **Toxic lectins and related proteins**. In: Cohen, P. and Van Heyningen, S., eds., *Molecular action of toxins and viruses*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 51 - 105, 1982.

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

O'KELLY, SEEBECK & SPRINGELL. 1971, Citado por FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. 3 ed. Nobel. São Paulo, 1985.

DE OLIVEIRA, E. C. Macroalgas marinhas de valor comercial técnicas de cultivo. **Panorama da Aqüicultura**, v. 7, n. 42, p. 42 - 45, 1997.

PEREZ-LORENZO, S., LEVY-BENSHIMOL, A., GOMEZ-ACEVEDO, S., Presencia de lectinas, taninos e inibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. **Acta Científica Venezolana**, v. 49, p. 141-151, 1998.

PEREIRA, M. G. Isolamento e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha verde *Ulva fasciata*. (Delile). **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 107 pp, 2000.

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

PIZARRO, A. P. B. Utilização do extrato de *Agave americana* Linnaeus no controle de *Boophilus microplus*. Resumo de tese. <http://www.famev.ufu.br/vetnot/vetnot4/res4-19.htm> consultado em fev. 2003.

RAIKHEL, N.V.; LEE, H. I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, V. 44, p. 591 - 615, 1993.

RAMOS, M. V., MONTEIRO, A. C. O., MOREIRA, R. A., CARVALHO, A. F. F. U. Amino acid composition of some Brazilian seaweed species. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 33 - 39, 2000.

RAMOS, W. V., FREITAS, A. L. P., MELO, V. M. M., & CARVALHO, F. F. U. Protein Content and amino acid composition in some Brazilian Marine Algae Species. **Physiol Mol. Biol. Plants**, v. 4, p. 165 - 169, 1998.

RAMOS, M. V., MOTA, D. M., TAVARES, R. O Plant Lectins as Biological Agents. *RECCS*, v. 9, p. 40 - 45, 1997.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHOM, S. E. **Biology of plants**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 735 pp., 1996.

REN, J. The N-glycosidase mechanism of ribosome-inactivating proteins implied by crystal structure of  $\alpha$ -mamorcharin, **Structure**, v. 2, p. 7-16, 1994.

RIBEAU-GAYON, J., PEYNAUD. E. **Traite d'ampelologie, sciences et techniques de la vigne** / J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud. Paris: Dunod., 719 pp., 1971.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Isolation and characterization of two antifungal proteins from barley. **Biochim. Biophys Acta**, v. 880, p. 161 - 170, 1986.

ROGERS, D. J., FISH, B. & BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In: **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** (J. Kocourek & D.L.J. Freud eds). Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, v. 7, p. 49 - 52. 1990.

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

ROUND, F. E. **Biologia das Algas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, S.A., 262 pp., 1983.

SAMPAIO, A. H. **Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species**. PhD Thesis. University of Portsmouth. 191pp, 1997.

SAMPAIO, A. H., ROGERS D. J. & 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., SAKER-SAMPAIO, S., COSTA, F. H. F. & RAMOS, M. V. A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 539 - 546, 1999.

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

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

SANTOS, L. F. L. Toxina da salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.): Aspectos Bioquímicos, Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico. 142pp. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Universidade Federal do Ceará, 2001.

SANTOS, M. G. M., LAGROTA, M. H. C., MIRANDA, Y. YONESHIGUE-VALENTIN and WIGGS, M. D. A Screening for the Antiviral Effect of Extracts from Brazilian Marine Algae against Acyclovir Resistant Herpes Simplex Virus Type 1. **Botanica Marina**, v. 42, p. 42, 1999.

SAVARY, B. J. & FLORES, H. E. Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Var. *japonicum* (Kitam.). **Plant Physiology**, v.106, p. 1195 -1204, 1994.

SCHONFELD-LEBER, B. Marine algae as human food in Hawaii, with notes on other Polynesian islands. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 8, p. 47-59, 1979.

SCHULER, T. H.; POPPY, G.M. ;KERRY, B.R.; DENHOL, M. I. Insect resistant transgenic plants. **Biotech.**, v.16, p. 68 - 175, 1998.

SERKEDJIEVA, J. Antiherpes virus effect of the red marine alga *Polysiphonia desnudata*. **Zeitschrift Fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences**, v. 55 (9 - 10), p. 830 - 835, 2000.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. (ed.). **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradação e Modificações**. São Paulo: Livraria Varela Ltda., cap. 2, p. 139-257, 1996.

- SHARON, N. & LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1 - 9, 2001.
- SHARON, N., LIS, H. **Lectins**. Chapman and Hall. London. New York, 126 pp, 1989.
- SHIOMI, K., YAMANAKA, H., KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA -1) in red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v. 47, p. 1079 - 1084, 1981.
- SILVA, D. J. **Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. Universidade Federal de Viçosa, Imp. Univ. Viçosa- Minas Gerais. 166pp, 1981.
- SILVA, S. M. S. Composição química e detecção de toxicidade em algas marinhas vermelhas, purificação e caracterização parcial de uma toxina presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Mertens ex. C. Agardh) J. Agardh. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. 75pp, 1997.
- SILVEIRA, V. C. Toxina da Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* (Lamouroux). Purificação e Caracterização. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 78pp, 2001.
- SINGH, U. & SINGH, B. Tropical brain legume as important human foods. **Economic Botany**, v. 46, p. 310 - 321, 1992.
- SOUSA, M. F. Efeitos da salinidade na expressão gênica de plântulas de feijão - de-corda 9 *vigna unguiculata* (L) Walp.). **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, 1999.



STILLMARK, H. Uber ricin, ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus communis L., und einige anderen Euphorbiaceen. Inaugural Dissertation Dorpart, Tartu, 1888.

STIRPE, F., BARBIERI, L., Ribosome-Inactivating proteins up to date. **FEBS. Letters**, v. 195, p.1 - 8, 1986.

TAYLOR, W. R. Marine algae of the Eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. **University of the Michigan Studies Scientific Series**, v. XXI, 869 pp. 1960.

TATCHELL, R.J. Interactions between ticks and their hosts. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.17, n.2, p. 597 - 605, 1987.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; THEVISSSEN, K; OSBORN, R. W.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P. A. & BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiol.**, v.103, p.1311, 1993.

TRIEBOLD, H. O. **Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products**, D. Van Nostrand Co., New York, 331 pp, 1946.

VALLS, R., ARTAUD, J. AMADE, P., VINCEBTE, N. & PIOVETTI, L. Determination of caulerpenyne, a toxin from the green alga *Caulerpa taxifolia* (Caulerpaceae). **Journal of Chromatography A**. v. 663, p. 114 - 118, 1994.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. **Handbook of Plant Lectin: Properties and Biochemical Applications**. John Wiley & Son, Chichester, UK, 452pp, 1998.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree( *Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258 - 262, 1991.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v. 46, n. 5, p. 829 - 835, 1963.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans *Glycine max*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, n. 2, 1994.

VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, A. F., CAMPELO, G. J. A., OLIVEIRA, J. T. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glicine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419 - 426, 1997.

VERMA, H. N.; KYMAR, V. Prevention of potato planta from viruses and insect vectors. **J. Indian Potato Assoc.**, v. 6, p. 157 - 161, 1979.

VIANA, G. S.; A. L. P. FREITAS; M. M. LIMA; L. A. VIEIRA; M. C. ANDRADE & N. M. B. BENEVIDES. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii*(turner) Kutz. And *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 35, n.6, p. 713 - 722, 2002.

VIJAYAN, M & CHANDRA, N. Current opinion in structural biology. **Lectins**, v. 9, p. 707 -714, 1999.

VIRGERS A.; ROBERTS, W. K. & SELITRENNIKOFF, C. P. A new family of plant antifungal proteins. **Mol. Plant. Micrbs.**, Int. v.4, n.4, p. 315 – 323, 1991.

VIVANCO, J. M. E.; SAVARY, B.J. & HECTOR, E. F. Characterization of two novel type I Ribosome-Inactivating Proteins from the storage rotos of the andean crop mirabian *expansa*. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1447 - 1456, 1998.

WARDEN, C. J. H., WADDEL, L. A. In "The nature of abrus poison with observations on its chemical and physiological properties". **Bengal Secretaria Press**, (1884) Calcuta, citado por KOCOUREK, 1986.

WHITAKER JR. Protease and alpha-amilase inhibitors of higher plants. Antinutrients and Phytochemicals. In: Food ACS Symposium Series .v. 662, p. 10 - 30, 1997.

WILLIAMS, L. A. D. Acaricidal activity of five marine algae extracts on female *Boophilus microphilus*. **Florida Entomology**, v. 74, p. 404 - 408, 1991.

WOLOSHUK, C. P., MEULENHOF, J. S., SELA-BUURLAGE, M., VAN DEN ELZEN, P. J. M & CORNELISSEN, B. J. C. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. **Plant Cell**, v. 3, p. 619 - 628, 1991.

YAMAGATA, N., YAMAGATA. Iodine content of thyroid glands of normal japonese. **J. Radiant Res.**, v.13, p. 81 - 90, 1972.

Tratamento

8. ANEXOS

# 8. ANEXOS

TABELA A 1- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas (PT), quenóginas (PQ) e da massa total de ovos (PMTO) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e i s		
	PT	PQ	PMTO
Controle	271,6 <sup>a</sup>	59,4 <sup>a</sup>	173,5 <sup>a</sup>
Extrato Total	228,5 <sup>ab</sup>	60,0 <sup>ab</sup>	135,9 <sup>b</sup>
Extrato Aquoso	250,7 <sup>ab</sup>	62,5 <sup>ab</sup>	143,7 <sup>b</sup>

TABELA A 2- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre o período de postura das teleóginas (PPT) e períodos de incubação (PI) e eclosão dos ovos (PE) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e l s		
	PPT	PI	PE
Controle	12 <sup>a</sup>	19,6 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>
Extrato Total	10,7 <sup>b</sup>	36,8 <sup>b</sup>	14,8 <sup>b</sup>
Extrato Aquoso	10,6 <sup>b</sup>	23,2 <sup>b</sup>	14,0 <sup>b</sup>

TABELA A 3- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos (%E) e das eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEM) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e l s		
	%E	IER	IEM
Controle	96,3 <sup>a</sup>	63,7 <sup>a</sup>	81,7 <sup>a</sup>
Extrato Total	74,4 <sup>b</sup>	53,2 <sup>ab</sup>	73,6 <sup>ab</sup>
Extrato Aquoso	90,2 <sup>ab</sup>	57,3 <sup>ab</sup>	76,0 <sup>ab</sup>

TABELA A 4- Comparação

TABELA A 4- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos dos extratos total e aquoso da alga *S. filiformis* sobre os períodos de sobrevivência (PS) e mortalidade (PM) das larvas de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e i s	
	PS	PM
Controle	98,3 <sup>a</sup>	66,7 <sup>a</sup>
Extrato Total	76,9 <sup>b</sup>	64,1 <sup>ab</sup>
Extrato Aquoso	75,3 <sup>b</sup>	60,4 <sup>ab</sup>



TABELA A 5- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos da toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os pesos das teleóginas (PT), quenóginas (PQ) e da massa total de ovos (PMTO) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e l s		
	PT	PQ	PMTO
Controle	231,2 <sup>a</sup>	27,3 <sup>a</sup>	169,2 <sup>a</sup>
Toxina	237,6 <sup>ab</sup>	60,1 <sup>ab</sup>	151,32 <sup>ab</sup>
Lectina	217,4 <sup>ab</sup>	64,3 <sup>ab</sup>	127,44 <sup>b</sup>

TABELA A 6- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura das teleóginas (PPT), de incubação (PI) e eclosão dos ovos (PE) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e i s		
	PPT	PI	PE
Controle	8 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
Toxina	10,2 <sup>ab</sup>	23,6 <sup>ab</sup>	7,5 <sup>b</sup>
Lectina	4,73 <sup>b</sup>	23,6 <sup>ab</sup>	6,8 <sup>b</sup>

TABELA A 7- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre a percentagem de eclosão dos ovos (%E) e das eficiências reprodutiva (IER) e nutricional (IEN)) de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e l s		
	%E	IER	IEN
Controle	95 <sup>a</sup>	65,2 <sup>a</sup>	84,5 <sup>a</sup>
Toxina	89,2 <sup>ab</sup>	63,8 <sup>ab</sup>	86,2 <sup>ab</sup>
Lectina	80,4 <sup>b</sup>	58,9 <sup>ab</sup>	78,6 <sup>ab</sup>

TABELA A 8- Comparação entre as médias dos efeitos tóxicos de toxina e lectina da alga *S. filiformis* sobre os períodos de postura sobrevivência (PS) e mortalidade (PM) das larvas de *B. microplus*.

Tratamento	V a r i á v e i s	
	PS	PM
Controle	73 <sup>a</sup>	58,3 <sup>a</sup>
Toxina	65,8 <sup>ab</sup>	51,0 <sup>ab</sup>
Lectina	63,0 <sup>b</sup>	42,2 <sup>b</sup>