

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

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

**ESTUDOS PROTEÔMICOS DE UMA FRAÇÃO PROTÉICA DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX, ATRAVÉS DE
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL - 2DE**

**FORTALEZA
2011**

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

**ESTUDOS PROTEÔMICOS DE UMA FRAÇÃO PROTÉICA DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX, ATRAVÉS DE
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL - 2DE**

Trabalho Supervisionado (Modalidade A)
Monografia submetida ao Departamento de
Engenharia de Pesca da Universidade Federal
do Ceará como parte da exigência para
obtenção do título de Engenheiro de Pesca
Área de Concentração: Biotecnologia Marinha

Orientador: Prof. Alexandre Holanda Sampaio

**FORTALEZA
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N195e Nascimento, Fernando Edson Pessoa do.
Estudos proteômicos de uma fração protéica da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, através de eletroforese bidimensional - 2DE / Fernando Edson Pessoa do Nascimento. – 2011.
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Alga marinha. 2. Proteínas. 3. Proteômica. 4. 2DE. 5. Compostos bioativos. I. Título.

CDD 639.2

FERNANDO EDSON PESSOA DO NASCIMENTO

**ESTUDOS PROTEÔMICOS DE UMA FRAÇÃO PROTÉICA DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUREUX, ATRAVÉS DE
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL - 2DE**

Trabalho Supervisionado (Modalidade A) Monografia submetida ao Departamento do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como parte da exigência para obtenção do título de Engenheiro de Pesca, Área de Concentração: Biotecnologia Marinha.

Aprovada em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dr^a Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Prof^a Dr^a Silvana Saker Sampaio
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, irmã, familiares
namorada e amigos que me
incentivaram de muitas formas e tudo
fizeram para a realização desta
caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, confiança impulsão a vencer a jornada de cada ano envolvido na realização de toda minha graduação, desde a época de cursinho até a conclusão do meu curso, não deixando me abater com as dificuldades encontradas ao longo do caminho. E por ter me dado o dom da vida.

Em especial a minha família, minha mãe Maria Cleide Pessoa, minha irmã, Cleidiane Cristina Pessoa, e ao meu pai José Valderi do Nascimento que confiaram em mim e acreditaram que eu era capaz de vencer, mesmo conscientes dos difíceis obstáculos que a vida iria me proporcionar, fazendo o possível e impossível para a realização deste sonho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio por ter me aceito em seu grupo de trabalho e pela paciência e contribuições de ensinamentos nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por permitir a realização deste trabalho dando suporte estrutural e científico encontrado no ambiente de trabalho do BioMol-Lab.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Kyria Santiago do Nascimento que em especial me acompanhou e me ajudou com seus ensinamentos nesses anos de Biomol-Lab.

A Prof^a Dr^a Silvana Saker Sampaio por muitas vezes ter contribuído com ensinamentos acadêmicos e de vida que me repassou, quando das conversas que tive com ela.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano que me ajudou com ensinamentos no laboratório e na realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de Engenharia de Pesca que se esforçaram no ensinamento nas aulas e tiveram paciência para transmitir seu saber.

A minha namorada Giselle Cristina Silva por quem tenho muito amor e que sempre me apoiou e me deu forças, teve paciência comigo, e, acima de tudo, uma companheira, me escutando e entendendo as decepções e dificuldades que tive, sempre me

aconselhando e com carinho de maneira decisiva em meu crescimento pessoal, intelectual e como companheiro.

Aos amigos que fiz no laboratório Raniere, Jéssica, Soraya, Lia, Cláudia, Rafael, Helton, Alysson, Júnior, Alfa, Ito, Sâmia. João Garcia e aos demais que compõem esta família. Agradeço pelas contribuições e ensinamentos, e pelos momentos de descontração e risadas que foram dadas nesses anos.

Aos meus amigos que fiz durante o curso de Engenharia de Pesca, Arthur, Carol, Renata e Rômulo, agradeço vocês pelos momentos felizes, tristes e alguns desesperadores, e pelos ensinamentos durante o nosso curso.

Ao meu grande amigo Guilherme Lima, que enfrentou junto comigo todos os momentos de vida acadêmica durante o curso, e que sempre tinha uma nova ideia para conversarmos e analisarmos os problemas que apareciam a todo instante, que sempre terá a minha sincera amizade e gratidão.

Aos demais colegas que fiz durante o curso de Engenharia de Pesca, que de certa forma contribuíram para o enriquecimento do meu conhecimento e relacionamento pessoal.

Em especial a minha madrinha Cineide Freitas e ao seu marido José Edmar por terem me dado todo o apoio necessário para a realização deste sonho, que com certeza sem esse imenso apoio e carinho não poderia ter chegado até aqui.

A minha prima Cláudia e seu esposo Raimundinho que também contribuíram para esta realização.

Aos meus tios José Cleudes, João Batista, Manoel Rafael, Maria Creuza e Diassis Vasconcelos que por muitas vezes me incentivaram, compreenderam e ajudaram ao longo de toda a minha caminhada, sempre me dando apoio e conselhos para que eu escolhesse os melhores caminhos.

Em especial a minha tia Celeste Freitas (“in memoriam”), que estará presente comigo, para toda a eternidade e que neste momento deve estar bastante orgulhosa a quem

gostaria muito de estar aqui neste momento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Universidade Federal do Ceará pelo financiamento da bolsa de iniciação científica e pela infraestrutura de pesquisa presente no BioMol-Lab.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

A ficologia é o ramo da Botânica que estuda as algas, organismos autotróficos e fotossintéticos que produzem oxigênio e vivem em ambientes aquáticos, em assembleias heterogêneas de organismos podendo ser unicelulares ou multicelulares representando respectivamente microalgas e macroalgas. Atualmente, a crescente demanda por produtos cosmecêuticos, substâncias que têm propriedades cosméticas e farmacêuticas, e nutracêuticos, substâncias consideradas como alimento ou parte de alimento que fornecem algum benefício alimentar, médico ou de saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças, tem despertado grande interesse em identificar e estudar novas biomoléculas. Neste contexto, existem vários organismos que se mostram com um enorme potencial biotecnológico, dentre os quais se destacam os organismos aquáticos, como microalgas de e as macroalgas marinhas. A macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* é um exemplo deste tipo de organismos e, portanto é a espécie foco deste trabalho, pois apresenta uma variedade de composto biologicamente ativos que devem ainda ser estudados com maior profundidade, e que apresentam diferentes atividades biológicas. A Biotecnologia é uma ciência que envolve a aplicação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e genética sendo amplamente utilizada na identificação e caracterização de novas moléculas, como por exemplo, as proteínas, cujo estudo é denominado de proteômica. Estas proteínas foram analisadas em bancos de dados protéicos através de dois parâmetros importantes: pI (ponto isoelétrico) e MM (massa molecular). Este estudo demonstrou que esta espécie algal possui proteínas correspondentes em organismos de diferentes táxons e que possuem diferentes atividades biológicas.

Palavras-chaves: Alga marinha. Proteínas. Proteômica. 2DE. Compostos bioativos. *Hypnea musciformis*.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1 Equipamento Image Scanner III utilizado na digitalização dos géis da fração da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 35 |
| Figura 2 Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das frações protéicas da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 38 |
| Figura 3 Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> sem processamento computacional..... | 39 |
| Figura 4 Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> com processamento computacional..... | 40 |
| Figura 5 Comparação entre os géis de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 41 |
| Figura 6 Diagrama de dispersão dos pontos protéicos identificados nos géis de referência e comparação da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 41 |
| Figura 7 Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> mostrando a área 1 e 2 contendo os pontos protéicos mais intensos..... | 42 |
| Figura 8 Imagem 3D da área 1 da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> , contendo os pontos protéicos mais intensos localizadas no gel 2DE..... | 43 |
| Figura 9 Imagem 3D da área 2 da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> , contendo os pontos protéicos mais intensos localizadas no gel 2DE..... | 43 |
| Figura 10 Percentual de pontos protéicos da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> com relação às classes de valores de ponto isoelétrico (pI)..... | 45 |
| Figura 11 Percentual de pontos protéicos da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> com relação às classes de valores de massa molecular (MM)..... | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 Características dos parâmetros de focalização da fração protéica da macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> | 33 |
| Tabela 2 Parâmetros do ponto isoelétrico (PI) e massa molecular (MM) correspondentes aos pontos protéicos detectados no gel de referência com e sem “matching”..... | 44 |
| Tabela 3 Valores de ponto isoelétrico (pI) e quantidade de pontos protéicos correspondente ao intervalo de classe..... | 45 |
| Tabela 4 Valores de peso molecular (MM) e quantidade de pontos protéicos correspondente ao intervalo de classe..... | 46 |
| Tabela 5 Os 24 pontos protéicos identificados pela ferramenta TagIdent, com parâmetros correlacionados com os ponto obtidos pelo programa Image Master 7.0..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CHAPS | 3-Dimetil[3-(4-{5,9, 16-trihidroxi- 2,15 dimetiltetracilo})] |
| DTT | Ditiotreitol |
| EBI | Instituto Europeu de Bioinformática |
| EDTA | Ácido etilenoamino tetra-acético |
| EBI | Instituto Europeu de Bioinformática |
| ESI | Ionização por Eletrospray |
| MALDI | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz) |
| TOF | <i>Time Of Flight</i> |
| IAA | Iodoacetamida |
| MS | Espectrometria de Massa |
| MS/MS | Espectrometria de Massa Sequencial |
| PBS | Tampão Fosfato de Sódio com Cloreto de Sódio |
| PIR | Recursos de Informação Protéicas |
| pH | Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio |
| pI | Ponto isoelétrico |
| PMF | Identidade da massa peptídica |
| P/V | Relação peso-volume |
| PUFAs | Ácidos graxos poli-insaturados |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SIB | Instituto Suíço de Bioinformática |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio |
| U.H. | Unidade hemaglutinante |
| V/V | Relação volume-volume |
| 2DE | Eletroforese bidimensional |
| TEMED | N,N,N', N' -Tetrametiletilenodiamina |
| IEF | Focalização isoelétrica |
| kDa | Quilo Daltons |
| PMF | <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> |
| mA | Micro ampère |
| V | Volts |
| W | Watts |

SÚMARIO

| | Página | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Algas marinhas | 14 |
| 1.2 | Algas marinhas vermelhas | 16 |
| 1.3 | Importância dos compostos bioativos de algas marinhas | 18 |
| 1.3.1 | Importância dos compostos bioativos de algas marinhas | 18 |
| 1.3.2 | Carotenóides | 19 |
| 1.3.3 | Ficocolóides ou galactanas | 20 |
| 1.3.4 | Proteínas | 21 |
| 2 | PROTEÔMICA | 22 |
| 2.1 | Ferramentas utilizadas em análise proteômica | 22 |
| 2.1.1 | Eletroforese bidimensional | 23 |
| 2.1.2 | Espectrometria de Massas | 25 |
| 2.1.3 | Bioinformática | 26 |
| 2.2 | Estudos de Proteômica em Algas Marinhas | 26 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 | Coleta da alga e preparo da farinha algal | 29 |
| 3.2 | Preparo da fração proteica | 29 |
| 3.3 | Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) da fração proteica | 30 |
| 3.4 | Preparo da amostra protéica para 2DE | 31 |
| 3.5 | Eletroforese bidimensional – 2DE | 31 |
| 3.5.1 | Rehidratação de Immobiline™ <i>DryStrip gels</i> (IPG strips) | 32 |
| 3.5.2 | Focalização isoeétrica (IEF) – Primeira Dimensão | 32 |
| 3.5.3 | Equilíbrio de <i>DryStrip gels</i> | 33 |
| 3.5.4 | Gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS) – Segunda dimensão | 34 |
| 3.5.5 | Revelação do SDS-PAGE | 34 |
| 3.5.6 | Aquisição de imagem dos géis | 35 |
| 3.6 | Análise dos Géis por Bioinformática | 35 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5 | CONCLUSÃO | 54 |
| | REFERÊNCIAS | 55 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

A ficologia é o ramo da Botânica que estuda as algas nos aspectos que se relacionam com metabolismo, fotossíntese, taxonomia, morfologia, fisiologia, citologia, reprodução e crescimento.

As algas são seres autotróficos e fotossintéticos que produzem oxigênio e vivem em ambientes aquáticos, em assembleias heterogêneas de organismos podendo ser unicelulares ou multicelulares correspondendo, respectivamente, às microalgas e às macroalgas (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009). Ao realizarem fotossíntese, as algas transformam energia luminosa solar em energia química que resulta na incorporação de biomassa. Assim podem ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes para se desenvolverem (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O oxigênio produzido pelas algas ao se dissolver na água é usado pelos demais organismos aquáticos, como por exemplo, pelas bactérias, que atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, e servem como alimento para animais herbívoros e onívoros. Estes micro-organismos ao morrerem, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Além disso, contribuem na produção de oxigênio utilizado na respiração celular dos demais organismos heterotróficos. Segundo Guschina e Harwood (2006), as algas respondem por mais da metade da produtividade primária na base da cadeia alimentar.

As algas são encontradas em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve. Quer sejam uni ou pluricelulares, as algas retiram todos os nutrientes que precisam do meio onde estão – solução ou umidade – e, portanto, são organismos fundamentalmente aquáticos (LOBBAN; HARRISON, 1997).

De acordo com Vidotti e Rollemborg (2004), as algas são consideradas em três diferentes reinos: Monera, Protista e Plantae. As algas macroscópicas bentônicas dominantes no ambiente marinho são multicelulares e se organizam em três principais divisões ou filos, Rhodophyta, representada pelas algas vermelhas, Phaeophyta, pelas algas marrons ou pardas e as Chlorophyta, pelas algas verdes (LOBBAN; HARRISON, 1997).

As algas são um grupo de organismos muito variado e altamente especializado. Além disso, a sistemática de algas baseia-se nos tipos e combinações de pigmentos fotossintéticos presentes nas diferentes espécies. A natureza química dos produtos de armazenamento e paredes celulares de algas também desempenha um papel importante no agrupamento destes organismos (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Algas eucarióticas são um grupo muito diversificado de organismos que habitam uma grande variedade de ecossistemas, ocorrendo nos mais diversos ambientes, desde desertos e até na Antártida (GUSCHINA; HARWOOD, 2006). Apesar da simplicidade aparente destes organismos, algumas algas possuem organelas específicas, como os cloroplastos, que só são encontrados nos vegetais superiores (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A distribuição destes organismos no ambiente está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas ambientais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Segundo Sheath (1984), o regime de luz, incluindo as flutuações na qualidade, intensidade e fotoperíodo, é um dos principais fatores que afetam a distribuição e a sazonalidade, por exemplo, de algas vermelhas dulcícolas.

As macroalgas marinhas possuem corpos ou talos em três diferentes designações microscópicas: cenocítica, parenquimatosa e pseudoparenquimatosa. Portanto, podem ser, do ponto de vista citológico, bem diferenciadas.

As algas com corpo cenocítico são compostas por uma matriz citoplasmática única e multinucleada. Essas algas sofrem repetidas divisões nucleares sem formar as paredes das células, portanto são unicelulares (BARSANTI *et al.*, 2008).

As algas com corpo parenquimatoso possuem tecidos e uma matriz celular, muitas vezes interligados intercelularmente por conexões conhecidas como plasmodesmos (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009). Essas algas possuem tecido composto de células indiferenciadas e crescimento proveniente de um meristema com a divisão celular em três dimensões. Esta organização está presente em muitas das algas marrons (BARSANTI *et al.*, 2008).

As algas com talo pseudoparenquimatosas são compostas de uma agregação frouxa ou de numerosas filamentos entrelaçados e ramificados que, coletivamente, formam o talo, unidos por mucilagens, especialmente em algas vermelhas (BARSANTI *et al.*, 2008) e são fundamentalmente filamentosas (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

De acordo com Barsanti *et al.* (2008), as algas marinhas podem tolerar uma ampla variação de pH, temperatura, turbidez, concentração de CO₂ e O₂ dependendo das condições do ambiente em que vivem. Thompson (1996) relata que a capacidade das algas para se adaptarem às condições ambientais se reflete em uma excepcional variedade de padrões de lipídios, bem como com a sua capacidade de sintetizar uma série de compostos incomuns.

1.2 Algas marinhas vermelhas

Algas vermelhas são pertencentes ao filo Rhodophyta e representam um grupo antigo, com peculiares características morfológicas, bioquímicas e de história de vida, incluindo uma completa ausência de flagelos (MAGGS *et al.*, 2011). Algas vermelhas ou rodofíceas são as algas eucarióticas que possuem plastídios contendo clorofila *a* e *d* e ficobilinas como pigmentos fotossintéticos (GANTT, 1996). Estima-se que existem neste filo de 500-600 gêneros e o número de espécies chega a ultrapassar 5.000 (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

Os plastídios são conhecidos como “rhodoplasts”, os quais estão rodeados por duas membranas (RAGAN; GUTELL, 1995), como também é o caso em algas verdes e plantas. As duas membranas encontradas nos plastídios podem ter sido originadas pela fagocitose de um endossimbionte de cianobactérias, que com o passar do tempo evoluiu e tornou-se um plastídio.

Segundo Granham, Granham e Wilcox (2009), os plastídios de algas vermelhas estão intimamente relacionados com os das algas verdes, porém estas organelas não contêm amido. Em vez disso, possuem grânulos de uma glucana ramificada, conhecida como amido das florídeas, localizados no citoplasma da célula algal que são responsáveis pela reserva nutricional das algas vermelhas. As algas verdes, por sua vez, possuem o amido verdadeiro.

A cor vermelha dessas algas é produzida pela ficoeritrina, um pigmento acessório fotossintético, que está localizado nos cloroplastos. Os pigmentos ficocianina e aloficocianina também estão presentes e são azuis. Esses pigmentos apresentam características similares (anel tetrapirrólico linear) e são conhecidos como ficobilinas. Eles ocorrem ligados a proteínas, formando uma classe de compostos chamados ficobiliproteínas. As ficoeritrinas são os pigmentos dominantes nas algas vermelhas e se dividem em cinco tipos: B- ficoeritrina (I e

II) e R- ficoeritrina (I, II e III) que parecem ser quase aleatoriamente distribuídos entre os diversos grupos das rodófitas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

As algas marinhas vermelhas apresentam em sua parede celular uma estrutura chamada de *pit connection* ou *pit plugs* que são únicas desta classe, porém em algumas espécies podem estar ausentes. Existem pelo menos sete tipos diferentes de *plugs* que podem ser reconhecidos por recursos de ultraestrutura, e sua distribuição entre as rodófitas fornece informações valiosas para sua taxonomia (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Algas vermelhas são tradicionalmente divididas em dois grupos, baseados em características morfológicas, anatômicas e diferenças na história de vida: (i) Bangiophyceae e (ii) Florideophyceae (WOELKERLING, 1990). De acordo com Ragan e Gutell (1995), algumas características diferenciam as Bangiophyceae das Florideophyceae, como condição nuclear de uninuclear para multinuclear, localização dos plastídios em axial para periférica, divisão celular intercalar para na maior parte apical e presença de *pit connections* ausente e presente, nos respectivos grupos. Estudos como o de Muller *et al.* (2001) mostraram que a filogenia molecular das algas vermelhas indica que as Florideophyceae evoluíram das Bangiophyceae.

As algas vermelhas possuem uma parede celular rígida formada por microfibrilas, que podem ser compostas de celulose ou polímeros de monossacarídeos diferenciados e uma matriz mucilagenosa, formada por outros polímeros de galactose sulfatada como ágar e carragenana. Essa matriz mucilagenosa é responsável por evitar a dessecação, além de possibilitar flexibilidade e textura escorregadia, características deste grupo.

Estas algas em sua maioria são compostas por filamentos que se encontram densamente entrelaçados e unidos pela matriz intracelular mucilagenosa (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). As células das Florideophyceae consistem em mais de 70% de moléculas solúveis em água que são as galactanas sulfatadas como ágares e carragenanas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

As algas vermelhas possuem reprodução assexuada e sexuada. As Bangiophyceae se reproduzem assexuadamente por meio de esporos unicelulares enquanto as Florideophyceae por meio de monósporos. A reprodução sexuada é característica da maioria das algas vermelhas, e está envolvida com a fusão de um espermácio, gameta masculino, com o carpogônio, gameta feminino, que desenvolve o tricogino, um alongamento do carpogônio. O ciclo de vida das algas vermelhas é conhecido como bifásico ou trifásico com alternância de gerações. Bangiophyceae que têm reprodução sexuada apresentam alternância bifásica de gerações (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

1.3 Importância dos compostos bioativos de algas marinhas

Atualmente, a crescente demanda por produtos cosmeceuticos, substâncias que têm propriedades cosméticas e farmacêuticas, e nutracêuticos, substâncias consideradas como alimento ou parte de alimento que fornecem algum benefício alimentar, médico ou de saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças, tem despertado grande interesse em identificar e estudar novas biomoléculas. Neste contexto, existem vários organismos que se mostram com um enorme potencial biotecnológico, dentre os quais se destacam os organismos aquáticos, como microalgas e macroalgas.

As macroalgas marinhas possuem pigmentos do tipo bilinas e carotenóides, fenóis e macromoléculas como proteínas, polissacarídeos sulfatados e lipídios que podem ser importantes ferramentas nas áreas de biomedicina, agricultura, aquicultura, farmacêutica e de cosméticos e assim se tornam matéria-prima de alto grau de utilização e valor econômico nos produtos biotecnológicos (CARDOZO *et al.*, 2007). Estes compostos bioativos cada dia mais vêm sendo descobertos e estudados por vários pesquisadores no mundo todo, como os descritos a seguir.

1.3.1 Ácidos graxos poli-insaturados

Ácidos graxos são compostos orgânicos formados por uma cadeia de hidrocarbonetos e um grupo carboxílico que é normalmente limitado com glicerol formando glicerídeos (mono-, di- ou triglicerídeos). Dependendo da natureza da cadeia do hidrocarboneto, os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, que por sua vez pode ser mono ou poli-insaturados. Muitos dos ácidos graxos podem ser sintetizados por seres humanos, mas há um grupo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), os ácidos graxos essenciais, que o organismo humano não pode produzir: ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

Os PUFAs desempenham papéis importantes no metabolismo celular e do tecido, incluindo a regulação da fluidez da membrana e transporte de oxigênio, bem como adaptação térmica (FUNK, 2001).

Alguns estudos indicam que o conteúdo quantitativo de PUFAs em algas depende das condições do habitat, e que o regime de maré não influencia qualitativamente na posição de lipídios polares e de ácidos graxos, mas muda o teor de lipídios e proporção de PUFAs (VASKOVSKY *et al.*, 1996).

As algas vermelhas possuem diversos tipos de PUFAs. Estudos com algas dos gêneros *Gracilaria* e *Laurencia* mostraram que elas são ricas em PUFAs, principalmente C20:4 (ω 6) e C20:5 (ω 3) para *Gracilaria* e C16:2 (ω 6), C20:2 e C20:5(ω 3) para *Laurencia*. Além disso, outros ácidos graxos, saturados e insaturados, foram observados, mas em quantidades menores (KHOTIMCHENKO; VASKOVSKY; TITLYANOVA, 2002; LI *et al.*, 2002; WAHBEH, 1997).

1.3.2 Carotenóides

Os carotenóides são compostos isoprenóides que em sua maioria possuem uma cadeia de carbono central com alternância de ligações simples e duplas e carregam diferentes grupos terminais cíclicos ou acíclicos. Suas principais funções bioquímicas são determinadas pelo sistema de ligações duplas conjugadas, que também é responsável pela sua cor (BRITTON, 1995).

Os carotenoides são divididos em categorias de acordo com sua composição química como carotenos ou xantofilas (oxicarotenos). Assim pode-se exemplificar como participantes do grupo dos carotenos o β -caroteno, α -caroteno e licopeno que são compostos apenas por átomos de carbono e hidrogênio. No grupo das xantofilas encontram-se a zeaxantina, luteína, α - e β -criptoxantina, que são compostos que têm pelo menos um átomo de oxigênio. As cantaxantina e astaxantina são xantofilas importantes com grupos hidroxil como elementos estruturais (STAHL; SIES, 2005).

Os principais carotenóides presentes nas algas vermelhas são: β -caroteno, α -caroteno, luteína, zeaxantina, anterixantina, violaxantina, α e β -criptoxantina. Estas moléculas possuem várias atividades biológicas. De acordo com Okai (1996), o princípio ativo para atividade antimutagênica em um extrato de uma alga vermelha *Porphyra tenera* foi detectada três pigmentos principais que correspondem a β -caroteno, clorofila *a* e luteína, além de encontrar resultados que atribuem a estes compostos atividades de supressão contra

mutagênico induzida em um gene de expressão da *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002).

1.3.3 Ficocolóides ou galactanas

Ficocolóides são polissacarídeos de alto peso molecular compostos por polímeros de unidades de açúcares (CARDOZO *et al.*, 2007). As galactanas de algas são polissacarídeos sulfatados tendo geralmente uma cadeia linear constituída de três cadeias alternadas de β -D-galactopirranose ligadas a quatro resíduos de α -galactopirranose. Os resíduos de β -galactose sempre pertencem a série D, enquanto que os resíduos α -galactose são D em carragenas e L em ágares. Uma parte substancial dos resíduos α -galactose pode existir na forma de um derivado 3,6-anidro (TRUUS *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos sulfados são os principais componentes estruturais das paredes das células de algas e podem estar envolvidos nos mecanismos de reconhecimento entre algas e patógenos (POTIN *et al.*, 1999).

O galactanas de algas vermelhas, ágar e carragenana, são os principais hidrocolóides usados como agentes de texturização alimentares e não alimentares. A propriedade de gelificação peculiar desses compostos é atribuída as suas características químicas, as quais na última década vêm sofrendo grandes modificações em sua caracterização, pois os avanços nas técnicas químicas, físico-químicas e métodos físicos, permitiram uma melhor caracterização estrutural desses polímeros (LAHAYE, 2001).

Ágar é o nome genérico para galactanas de algas e se refere aos polissacarídeos geletificantes que contêm uma estrutura básica de hidrocarbonetos com alternâncias de cadeias α (1-4)-3,6-anidro-L-galactose e resíduos de β (1-3)-D-galactose, com uma pequena quantidade de sulfato de esterificação (LAHAYE, 2001). As carragenanas consistem nas galactanas sulfatadas solúveis em água que apresentam uma cadeia de hidrocarbonetos e alternâncias de cadeias α (1-4)-3,6-anidro-D-galactose e resíduos de β (1-3)-D-galactose (GONÇALVES *et al.*, 2002).

As carragenanas são tradicionalmente classificadas por um prefixo grego de acordo com seu padrão de sulfatação e presença da ponte de 3,6-anidro na cadeia α -D-galactose. As três carragenanas comercialmente mais importantes são designadas de λ (lambda) carragenana, ι (iota) carragenana e κ (kappa) carragenana (CARDOZO *et al.*, 2007).

A distribuição das diferentes estruturas repetidas das galactanas é difícil de se estabelecer, devido à natureza heterogênea dos extratos e do caráter híbrido dos polissacarídeos. Algumas populações de galactanas podem ser alcançadas por adaptações aos procedimentos de extração e de precipitação e pelo uso de fracionamentos cromatográficos (LAHAYE, 2001).

1.3.4 Proteínas

O estudo de proteínas em algas marinhas é muito restrito, principalmente no que diz respeito à composição com relação aos aspectos nutricionais. Os estudos têm também se concentrado nas ficobiliproteínas e, mais recentemente, nas lectinas.

As lectinas são proteínas de origem não imune que têm a capacidade de reconhecer carboidratos presentes em solução ou complexados a estruturas, como a parede celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Devido a essa característica, as lectinas em geral têm sido apontadas como uma importante ferramenta para aplicação biotecnológica nas áreas biomédicas. As lectinas de algas marinhas, particularmente, vêm mostrando possuir excelentes características, principalmente quando comparadas com aquelas encontradas em plantas superiores (NAGANO, 2002). Dentre as algas marinhas como fonte de lectinas, a classe Rhodophyceae tem apresentado um maior número de espécies com a presença de lectinas, e a maioria dos estudos de purificação e caracterização está concentrado nas algas vermelhas (NAGANO, 2002). Portanto, se torna necessário uma maior avaliação da presença das diversas proteínas nas algas, que proporcione a identificação de novas moléculas e uma caracterização diferenciada destes compostos.

2 PROTEÔMICA

A Biotecnologia é uma ciência que envolve a aplicação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e genética (GUERRA; NODARI, 2006), sendo amplamente utilizada na identificação e caracterização de novas moléculas, como por exemplo, as proteínas.

Nas décadas de 1970 e 1980 a biologia estava focada em Engenharia Genômica e Genética, o que mudou devido ao acúmulo fenomenal de sequências genéticas desconhecidas em bancos de dados. A mudança de foco levou aos estudos dos produtos gênicos, ou seja, as proteínas e, esta abordagem ficou conhecida como genética reversa.

O ramo da Biotecnologia responsável por estudos com proteínas é denominado Proteômica, que permite determinar uma maior aproximação dos processos metabólicos intracelulares (FEY; LARSEN, 2001).

Em 1993, o termo Proteoma foi descrito por Marc Wilkins e Keith Williams da Universidade de Maquarie, em Sydney, Austrália, para se referir à identificação sistemática das proteínas totais complementares a um genoma.

A Proteômica consiste em métodos diretos para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas (DI CIERO; BELLATO, 2003), bem como elucidar suas associações e funções em uma célula, tecido ou mesmo organismo (ANDERSON; ANDERSON, 1996; CELIS *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1997).

A técnica desenvolvida, com alta resolução para análise de produtos de genes denominada eletroforese bidimensional, foi primeiramente descrita por O'Farrell (1975).

2.1 Ferramentas utilizadas em análise proteômica

O estudo proteômico de uma determinada espécie é feito com auxílio de um conjunto de técnicas e ferramentas que têm por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFORT, 2002), que pode ser realizado por eletroforese bidimensional (2DE), espectrometria de massas (MS), incluindo a digestão protéica dos pontos protéicos detectados (KATZ-JAFFE *et al.*, 2009) e por bioinformática (HOCHSTRASSER, 1998).

Um dos pontos mais difíceis para a obtenção de dados proteômicos de um organismo é a aquisição de uma boa amostra protéica (GÖRG *et al.*, 2000). Estas dificuldades são claramente evidenciadas nas algas marinhas, que apresentam biomoléculas como lipídeos, sendo compostas principalmente por carboidratos e outras moléculas não protéicas que agem como contaminantes no estudo proteômico (CARPENTIER *et al.*, 2005).

2.1.1 Eletroforese bidimensional

Os fundamentos da eletroforese bidimensional (2DE) foram apresentados pela primeira vez por Klose (1975) e O'Farrell (1975). De acordo com Chromy *et al.* (2004) e Quattieri *et al.* (2007), em eletroforese 2D-PAGE, as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004).

A 2DE combina duas técnicas de separação. A primeira dimensão é a focalização isoelétrica (IEF), e a segunda dimensão é a eletroforese em gel de poliacrilamida, chamada de SDS-PAGE, para produzir um mapa global, ou perfil, de todos (acima do nível de detecção da técnica de visualização) os produtos gênicos presentes em uma célula em determinado momento.

Apesar de 2DE não ser uma técnica nova, se tornou recentemente o método preferido para criar mapas protéicos de amostras complexas. O poder de resolução de 2DE é superior à de qualquer outra técnica de separação de proteína.

A eletroforese convencional unidimensional (SDS-PAGE e IEF) separa, na melhor das hipóteses, cerca de 100 proteínas a partir de uma amostra heterogênea. A combinação destas duas técnicas unidimensionais, resulta na eletroforese de segunda dimensão que pode, também na melhor das hipóteses, gerar 10 mil pontos protéicos. Na prática, a detecção dos pontos protéicos depende da sensibilidade da técnica de coloração (embora até 10.000 pontos por gel já tenham sido relatados).

Diferentes produtos químicos são usados na segunda dimensão na eletroforese 2DE, sendo a mais conhecida a metodologia de Laemmli (1970), no entanto, metodologias tais como Tris/tricina podem ser mais precisos com relação às moléculas de pesos moleculares menores (PATTON *et al.*, 1991).

Preparação adequada de amostras para IEF é um ponto chave para bons resultados

em 2DE. As amostras devem estar livres de sais e outros contaminantes, tais como pigmentos, compostos fenólicos e ácidos nucleicos. Estes últimos podem ser eliminados por digestão com DNase/RNase. As amostras podem então ser limpas através de precipitação com acetona ou por diálise contra um tampão. Para obter uma boa recuperação de proteínas através do uso de precipitantes ou diálise, deve-se considerar como boa recuperação, a obtenção de 1 mg/mL de proteína total (LOPEZ, 1999).

Na focalização isoeétrica as proteínas são separadas através da aplicação de uma alta tensão, em um gradiente de pH imobilizado em gel de poliacrilamida até alcançarem a posição estacionária onde a carga líquida total da proteína é zero. O valor de pH no qual a proteína tem carga líquida zero é chamado de ponto isoeletrico (pI).

Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com o peso molecular, através de uma tensão, também em gel de poliacrilamida contendo ou não o detergente dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). A mobilidade eletroforética se dá de acordo com o tamanho e forma da proteína, sendo restringida pelo tamanho do poro da matriz de poliacrilamida, de forma que as proteínas migram em uma velocidade proporcional ao seu tamanho (DI CIERO; BELLATO, 2003).

Após serem submetidas a 2DE, as proteínas são visualizadas através de métodos de detecção específicos para cada objetivo, como por exemplo, detecção de proteínas totais, modificações pós-traducionais etc.

A maioria desses métodos se baseia em coloração de proteínas com corantes, reagentes fluorescentes ou autorradiografia (detectar proteínas marcadas radioativamente). Dentre os diversos métodos de coloração de proteínas, utilizam o azul brilhante de Coomassie (Coomassie Blue R - 250) e prata, este último se torna mais caro e específico (DI CIERO; BELLATO, 2003)

Em géis bidimensionais, os polipeptídios aparecem formando manchas (“spots”), pontos protéicos, após serem corados. Em comparação com a eletroforese unidimensional em géis desnaturantes de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), a eletroforese bidimensional (2DE) apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas, enquanto que em SDS-PAGE, as bandas protéicas tendem a se sobrepor. O método unidimensional de separação pode separar um número relativamente pequeno de proteínas (GALDOS, 2009).

2.1.2 Espectrometria de Massas

Em 1993, a espectrometria de massa (MS) abriu as portas para a caracterização de polipeptídeos de alto rendimento a partir de géis 2DE (LOPEZ, 1999). Em linhas gerais, a MS é uma técnica capaz de determinar a relação entre a massa (m) e a carga (z) de espécies polipeptídicas ionizadas.

Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados.

As fontes de ionização aplicadas à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI), cuja função é ionizar de maneira suave as espécies polipeptídicas, preservando assim sua estrutura, para que elas mesmas possam ser transferidas para os analisadores de massa (CANTÚ *et al.*, 2008).

O primeiro espectrômetro de massas foi desenvolvido em 1899, mas levou quase um século para esse instrumento se tornar um método de análise de rotina na pesquisa proteômica. Isso foi possível quando rápidos métodos de ionização foram desenvolvidos, como MALDI e ESI, permitindo volatilizar biomoléculas com massas de dezenas de kDa para a fase de gás sob pressão de vácuo sem destruí-las. Os cinco tipos básicos de analisadores de massa usados atualmente em pesquisa proteômica é o quadrupolo, “ion trap”, “orbitrap”, transformada de Fourier e tempo de voo (Time Of Flight – TOF), que diferem na forma como, determinar as relações massa/carga (m/z) dos peptídeos (AHMED, 2008).

Uma abordagem para caracterização de proteínas oriundas de 2DE com auxílio de MS é identidade da massa peptídica (PMF). Esta técnica baseia-se na capacidade de determinar a massa de vários peptídeos obtidos a partir do uso de uma protease (geralmente trípica) sobre proteínas separadas por 2DE. As massas de peptídeos são então utilizadas para pesquisar a identidade da proteína em bancos de dados de sequências genômicas e protéicas. Dependendo da precisão em massa, um polipeptídeo desconhecido pode ser identificado a partir de apenas cinco peptídeos. Avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA e proteínas estão resultando em um aumento exponencial do número de sequências depositadas em bancos de dados (MANN; HØJRUP; ROEPSTORFF, 1993).

A espectrometria de massas é uma ferramenta utilizada também para determinar a massa intacta da proteína bem como determinar sua estrutura primária (HOCHSTRASSER, 1998).

2.1.3 Bioinformática

Ferramentas computacionais auxiliam na interpretação de dados obtidos por 2DE-PAGE e MS através da bioinformática. A partir dessas ferramentas pode-se identificar e caracterizar novas moléculas de natureza protéica e a partir de então, utilizá-las em diferentes aplicações na ciência (BAIROCH; APWEILER, 1998).

As informações disponibilizadas por dados biológicos são obtidas por vários grupos de pesquisas que vêm atuando em momentos diferentes em todo o mundo, os quais estabelecem interações entre si, compartilhando informações. Esses dados só podem ser organizados, analisados e interpretados com o apoio de um sistema de informática bem eficiente.

Neste sentido surge a Bioinformática que é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos. Ela pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação são elaboradas várias ferramentas que auxiliam a compreensão e o significado biológico dos dados analisados. Além disso, através da criação de bancos de dados com as informações já processadas, acelera a investigação em outras áreas como a medicina, a biotecnologia, a agronomia etc. (BORÉM; SANTOS, 2001).

2.2 Estudos de Proteômica em Algas Marinhas

Estudos sobre proteômica em algas marinhas são muitos escassos e a maioria dos estudos que existem na atualidade se concentram sobre espécies de água doce, principalmente com a clorofíceia *Chlamydomonas reinhardtii*. (STAUBER; HIPPLER, 2004). Alguns autores publicaram trabalhos de proteômica com *C. reinhardtii*, discutindo principalmente os compartimentos celulares e os grupos funcionais de proteínas (FÖRSTER; MATHESIUS; POGSON, 2006; KELLE *et al.*, 2005).

Um estudo recente sobre proteínas nucleares que desempenham papel central na regulação da expressão gênica de *C. reinhardtii* mostrou a importância da identificação dessas proteínas para compreender as mudanças do repertório nuclear ao longo do tempo sob

diferentes condições. Proteínas nucleares são muitas vezes sub-representadas em estudos proteômicos devido à abundância de baixa frequência de proteínas envolvidas em processos de regulação. Até agora, apenas poucos estudos descrevendo o proteoma nuclear de espécies de plantas foram publicados. No entanto, uma descrição detalhada de proteoma nuclear de *C. reinhardtii* identificou 672 proteínas a partir de núcleos isolados. Além das bem conhecidas histonas, outras proteínas tipo fatores de transcrição e outros reguladores de transcrição foram identificados. Este estudo mostra a complexidade do ambiente nuclear desta alga (WINCK *et al.*, 2011).

Um dos poucos trabalhos encontrados na literatura sobre proteômica de algas marinhas vermelhas foi realizado por Wong *et al.* (2006) com *Gracilaria changii*. Segundo estes autores, uma das dificuldades na obtenção de dados proteômicos em algas vermelhas é a presença de polímeros fibrilares que interferem no rendimento protéico e causam problemas durante a focalização isoeétrica. Neste trabalho foram identificadas principalmente proteínas envolvidas no processo fotossintético, através do auxílio de espectrometria de massas.

O ExPASy é um Portal de Recursos de Bioinformática do Instituto Suíço de Bioinformática que dá acesso às bases de dados científicos e ferramentas de programas computacionais em diferentes áreas das ciências da vida, incluindo a proteômica, genômica, filogenia, biologia de sistemas, genética de populações, transcriptômica etc.

A ferramenta TagIdent permite a geração de uma lista de proteínas que apresente dados de pI e MM próximo aos parâmetros obtidos pela análise experimental em 2DE, a identificação de proteínas combinando uma sequência curta de até 6 aminoácidos contra proteínas depositadas no banco de dados UniProt (Swiss-Prot e TrEMBL), e a identificação de proteínas através de sua respectiva massa, caso ela tenha sido determinada por MS.

A UniProt KnowledgeBase (UniProtKB) é um banco de dados abrangente, de alta qualidade e de acesso livre de sequência de proteína e informações funcionais. Ele contém uma grande quantidade de informações, muitas das quais são derivadas de projetos de sequenciamento genômico, que estabelecem informações sobre a função biológica das proteínas derivadas da literatura de pesquisa. O UniProt é um consórcio entre o Instituto Europeu de Bioinformática (EBI), o Instituto Suíço de Bioinformática (SIB), e os Recursos de Informação Protéicas (PIR). Esta base de conhecimentos consiste em duas seções, onde uma é a UniProtKB / Swiss-Prot, manualmente anotada e revisado e, a outra é a UniProtKB/TrEMBL, automaticamente anotado e não é revisado. Estas ferramentas são úteis para auxiliar na identificação de proteínas.

Neste sentido devem-se estabelecer metodologias de extração de compostos que são considerados contaminantes e explorar novas espécies algais de interesse mundial. A costa do Ceará possui uma grande quantidade de algas que mostram ser grandes fontes de matérias primas para estes estudos. O objetivo geral deste estudo foi estabelecer uma metodologia reprodutível de obtenção de material protéico de qualidade para análise em eletroforese bidimensional e caracterizar as proteínas da amostra através da TagIdent.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da alga e preparo da farinha algal

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, espécie pertencente à Família Hypneaceae, Ordem Gigartinales, Divisão Rhodophyta, foi coletada na Praia de Paracuru – CE, no meso-litoral durante as marés de sizígia, crescendo como epífita, abundantemente sobre outras espécies algais. O material coletado foi transportado para o laboratório, em sacos plásticos em volumes diferenciados e suficientes para posterior processamento e utilização.

No laboratório, o material foi lavado com água da torneira em abundância e depois com água destilada para a retirada de resíduos de areia, sais e material indesejável. Após este procedimento, a alga foi congelada a -20°C , liofilizada e triturada em multiprocessador doméstico até obtenção uma farinha que foi acondicionada em recipientes plásticos à temperatura ambiente (25°C) para posterior utilização.

3.2 Preparo da Fração Protéica

À farinha de alga (300 g) foi adicionado tampão de extração de proteínas constituído por fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:8 (m:v) e a mistura foi deixada sob agitação constante no agitador rotativo a 10°C por 16 horas. Ao término deste procedimento, o homogenato foi filtrado em tecido de náilon seguido de papel filtro. Posteriormente, a porção filtrada foi centrifugada a $9.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato protéico total, e acondicionado para posterior utilização.

O extrato protéico total obtido foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, deixado em repouso por 4 horas à temperatura ambiente e, posteriormente centrifugada por 30 minutos a 4°C a $9.000 \times g$.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de tampão de extração, dialisado exaustivamente contra de água deionizada e

posteriormente liofilizado. Em seguida, o material foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 sem NaCl, centrifugado e o sobrenadante aplicado em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 sem NaCl.

O pico não retido no gel cromatográfico foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 sem NaCl e o pico retido eluído com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, em gradiente de NaCl de 0-1 M. As frações cromatográficas foram monitoradas a 280 nm. As frações do pico não retido foram liofilizadas e utilizadas para eletroforese.

3.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) da fração protéica

A fração protéica oriunda da cromatografia de troca iônica foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de β -mercaptoetanol (SDS-PAGE), segundo o método descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de placas de vidro verticais.

Para a confecção do gel descontinuo foi utilizado uma concentração de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel de empilhamento e 15% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, para o gel de separação.

O preparo da amostra foi feito a uma concentração de 4 mg/mL, cada amostra liofilizada foi dissolvida em tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, contendo glicerol 5%, SDS 2%, e 0,05% de azul de bromofenol) contendo 2 μ L de β -mercaptoetanol. Cada material foi aquecido e desnaturado em banho-maria a uma temperatura de 100°C por 5 min. O material foi centrifugado a 5.000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente e 15 μ L de cada amostra foram aplicados no gel PAGE-SDS.

Para efeito de comparação dos pesos moleculares, foi adicionado em um poço separado, 10 μ L do marcador de peso molecular com proteínas conhecidas com os seguintes pesos moleculares: 14, 21, 30, 45 e 66 kDa.

A eletroforese foi realizada com as placas submersas em tampão de corrida contendo Tris – HCl 0,25 M pH 8,8, glicina 1,92 M, SDS 1%, 1x concentrado em 300V, corrente constante de 50 mA e potência de 20 W.

A revelação das proteínas separadas no gel foi realizada pelo método de coloração com auxílio da solução de azul brilhante de Coomassie R-250 a 1% em metanol:ácido acético:água (40:10:60), por um período de 18 horas.

O descoramento foi realizado por 20 horas com auxílio de uma solução descorante composta de 40% de etanol e 20% de ácido acético em água destilada.

3.4 Preparo da amostra protéica para 2DE

A fração DEAE, antes de ser aplicada na eletroforese 2DE, foi submetida a um processo de limpeza para remoção de traços de sais ou quaisquer outros componentes que pudessem prejudicar a focalização das proteínas presentes na amostra. Para isso foi utilizado o kit 2D Clean-Up (GE Healthcare) que consistiu no seguinte procedimento: 1 mg de fração 40-60 liofilizada foi colocada em microtubo de centrífuga de 2 mL. À amostra foram adicionados 100 µL de água deionizada seguidas de 300 µL da solução precipitante, fornecida pelo kit. O material foi agitado em Vortex, durante 3 minutos, em modo contínuo, e deixado em repouso no gelo durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 300 µL da solução co-precipitante fornecida pelo kit e homogeneizados manualmente. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 x *g* durante 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 25 µL de água deionizada, 1 mL da solução “wast buffer” e 5 µL da solução “wast additive”, ambas soluções fornecidas pelo kit. Posteriormente, a amostra foi vortexizada durante 30 segundos, deixada em repouso por 10 minutos e, logo após, foi centrifugada a 12.000 x *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para focalização isoeletrica.

3.5 Eletroforese bidimensional – 2DE

Os géis de SDS-PAGE foram adquiridos através de adaptações do procedimento experimental de eletroforese bidimensional descrito por SHAGGER; Van JAGOW (1987).

Esta metodologia aborda cinco diferentes etapas que serão descritas a seguir: Re-hidratação de *DryStrips*; Focalização Isoelétrica (IEF) 1ª Dimensão; Equilíbrio de *DryStrips*; Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS – PAGE) 2ª Dimensão e Revelação.

3.5.1 Rehidratação de Immobiline™ *DryStrip* gels (IPG strips)

Neste procedimento foram utilizados Immobiline™ *DryStrip* gels (IPG “strips”) da GE HealthCare de 11 cm contendo gradiente de pH imobilizado na faixa de 3-10. Os géis *DryStrip* foram rehidratados na presença da amostra e para isso, seguiu-se o procedimento descrito a seguir: foram adicionados 300 µL de solução de rehidratação (ureia 7 M, tiourea 2 M, DTT 65 mM, tampão IPG 0,5%, pH 3-10, CHAPS 0,5% e traços de azul de bromofenol) a 1 mg de proteína.

Em seguida, a solução de rehidratação foi colocada em um suporte de porcelana denominado “*strip holder*” e nele foi armazenado o gel *DryStrip*, de maneira que ele ficou embebido na solução de rehidratação. Ao final, óleo mineral foi adicionado para evitar evaporação da solução de rehidratação e cristalização da ureia, já que os géis *DryStrip* foram acondicionados em temperatura ambiente por 16 horas. Este procedimento foi feito em duplicata.

3.5.2 Focalização isoeletrica (IEF) – Primeira Dimensão

A focalização isoeletrica ocorreu logo após a rehidratação dos géis *DryStrip*. Os “*strip holders*” foram levados ao aparelho de focalização isoeletrica (Ettan IPGphor, GE HealthCare) e submetidos a um campo elétrico obedecendo a programação descrita na Tabela 1. Ao término da focalização as fitas foram retiradas dos “*strip holders*” e acondicionadas em tubos de ensaio de 15ml a -20 °C.

Tabela 1 - Características dos parâmetros de focalização da fração protéica da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

| Passos | Modalidades | Voltagens (V) | Tempo (h) |
|--------|-------------|---------------|-----------|
| 1 | Step | 200 | 1 |
| 2 | Step | 500 | 1 |
| 3 | Step | 1000 | 1 |
| 4 | Gradiente | 5000 | 1 |
| 5 | Step | 5000 | 1 |
| 6 | Gradiente | 8000 | 0,5 |
| 7 | Step | 8000 | 2,5 |
| 8 | Step | 150 | 20 |

3.5.3 Equilíbrio de géis *DryStrip*

As fitas foram retiradas do freezer e colocadas sobre a bancada à temperatura ambiente. Posteriormente, as fitas foram equilibradas em uma solução tampão contendo Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 contendo glicerol 87%, uréia 6,0 M, SDS 2%, traços de azul de bromofenol e 57,8 mg de DTT.

Os géis *DryStrip* foram deixados sob agitação constante com solução de equilíbrio por 15 minutos e em seguida, a solução foi descartada e os géis *DryStrip* foram lavados com água deionizada.

Em seguida, esses géis *DryStrip* foram acondicionado em solução de equilíbrio (descrita acima) na ausência de DTT e na presença de 69,3mg de Iodoacetamida (IAA). *DryStrip* gels foram deixados sob agitação constante com solução de equilíbrio por 15 minutos. Logo após, a solução foi descartada e os géis *DryStrip* foram lavados com água deionizada.

3.5.4 Gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS) – Segunda dimensão

Para o preparo dos géis SDS-PAGE 15% foram utilizados 40 mL de solução de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%; 20 mL de tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,8; 0,8 mL de SDS a 10%; 18,78 mL de água deionizada; 360 µL de persulfato de amônio a 10% e 60 µL de TEMED. Após ter colocado a mistura acima descrita entre as placas do sistema eletroforético (GE HealthCare), foi adicionado ao topo do gel 1 mL de butanol para auxiliar na polimerização, que em seguida foi removido.

Posteriormente, cada fita foi retirada cuidadosamente do tubo de ensaio (após reidratação) e colocada no topo de cada SDS-PAGE. O marcador de peso molecular contendo proteínas com peso molecular conhecido (14, 21, 30, 45, 66 e 97 kDa) foi adicionado ao SDS-PAGE. Posteriormente, o sistema foi vedado com adição de agarose 0,5% em tampão de corrida contendo SDS e traços de azul de bromofenol. O sistema de placas com o gel montado foi acoplado à cuba menor do sistema eletroforético contendo tampão de corrida contendo HCl 0,25 M pH 8,8, glicina 1,92 M, SDS 1%. A corrida foi realizada sob os seguintes parâmetros: 300 V, 40 mA e 20 W. O sistema de eletroforese utilizado para segunda dimensão foi realizado em equipamento da GE Healthcare.

3.5.5 Revelação do SDS-PAGE

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados das placas de vidro e as proteínas presentes nos géis foram fixadas. O processo de fixação ocorreu da seguinte forma: os géis foram lavados inicialmente duas vezes, durante 20 minutos, com uma solução de etanol a 30% e ácido fosfórico a 2% e depois foram deixados 12 horas nesta mesma solução sob agitação. Posteriormente, a solução foi descartada e os géis foram lavados com solução de ácido fosfórico a 2% por 3 vezes, durante 20 minutos.

Logo após, os géis foram lavados uma vez com a solução contendo ácido fosfórico a 2%, etanol a 18% e sulfato de amônio a 15%. Os géis foram corados nesta mesma solução contendo corante azul brilhante de Coomassie G-250. Em seguida os géis foram deixados sob agitação de 100 rpm em agitador rotativo e a uma temperatura de 15°C durante

72 horas e descorados com uma solução descorante composta por 40% de etanol P.A e 20% de ácido acético P.A.

3.5.6 Aquisição de imagem dos géis

Os géis foram escaneados em Scaner ImageScanner III com auxílio do programa LabScan 6.0 (GE HealthCare), após previamente ser limpo e calibrado.

Neste momento foram ajustados parâmetros como o tipo de corante com o qual o gel foi corado bem como selecionado a área do gel de interesse (contendo os pontos proteicos). Os géis escaneados geraram um arquivo em formato “mel”.



Figura 1 - Equipamento Image Scanner III utilizado na digitalização dos géis da fração protéica da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

3.6 Análise dos Géis por Bioinformática

Os géis obtidos em duplicata foram analisados pelo programa Image Master 7.0 (GE HealthCare) que geraram informações como massa molecular aparente e ponto isoelétrico de cada ponto proteico.

Basicamente para obtenção dos dados, foram realizadas quatro etapas de processamento dos arquivos dos géis, em que a primeira consistiu na melhora de imagem dos géis e detecção dos pontos proteicos, ou seja, dos pontos proteicos, criação de “matches”, criação de classes e obtenção dos resultados dos dados gerados pelo processamento. Estes

dados foram utilizados pela ferramenta de identificação de proteínas denominada tagIdent disponível pelo sistema ExPasy (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente existem poucos estudos sobre proteômica com macroalgas marinhas, principalmente quando se trata de algas vermelhas. Na pesquisa de algas, os estudos de proteômica têm sido feitos com algumas microalgas unicelulares verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (STAUBER, *et al.*, 2004; CARDOL, *et al.*, 2005) e *Haematococcus pluvialis* (WANG, *et al.*, 2004; WANG, *et al.*, 2005).

A ausência de trabalhos referentes a proteômica em macroalgas marinhas se deve principalmente a difícil obtenção de uma amostra livre de contaminantes (carboidratos, pigmentos, lipídios etc). As macroalgas marinhas vermelhas são ricas em compostos que agem como interferentes no processo de obtenção de amostras protéicas de boa qualidade, como por exemplo, carotenóides, ficobilinas e polissacarídeos. Estes últimos se apresentam distribuídos nas paredes celulares resistentes que contêm fibras de celulose incorporadas em uma matriz extensa gelatinosa composta principalmente por polímeros de galactose sulfatada (MICHEL *et al.*, 2003), encontrado também na alga *Hypnea musciformis*, espécie utilizada neste estudo.

Estes compostos contaminantes são solubilizados durante o processo de extração de proteínas totais e podem gerar problemas como interferência na focalização isoelétrica das proteínas durante a primeira dimensão (IEF) e na eletroforese 2DE. Para evitar este problema, é necessário utilizar o método de extração de proteínas juntamente com o método de remoção de pigmentos e polissacarídeos, a fim de se obter uma amostra protéica de qualidade. Neste sentido, a metodologia utilizada neste trabalho mostrou-se efetiva.

O extrato protéico da alga marinha vermelha *H. musciformis* quando aplicada em cromatografia de troca iônica em gel DEAE produziu duas frações proteicas principais. A primeira fração, denominada PI, apresentou-se translúcida, livre de pigmentos, e a segunda fração, denominada PII, apresentou-se rosada, ou seja, rica em contaminantes do tipo bilina. As frações proteicas (PI e PII) foram analisadas quanto a sua qualidade pela eletroforese SDS-PAGE unidimensional (LAEMMLI, 1970). O critério para determinar a qualidade da amostra foi o aparecimento de inúmeras bandas protéicas livres de arrastados no gel.

A Figura 2 apresenta o perfil eletroforético oriundo da cromatografia de troca iônica. O pico I apresentou-se de boa qualidade com uma ampla faixa de bandas protéicas. A análise do perfil eletroforético do pico II permitiu a visualização de bandas protéicas, de menos diversidade, mesmo com a presença de pigmentos. Porém, dados não mostrados aqui

revelaram que a presença do pigmento contribuiu negativamente para a focalização isoeétrica das proteínas.

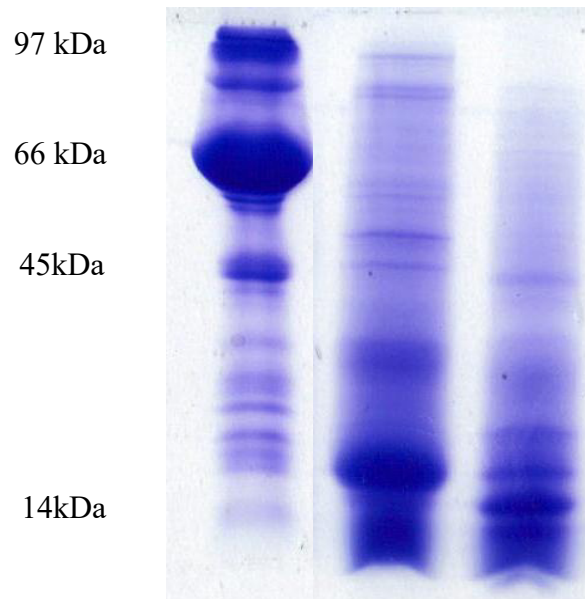


Figura 2 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das frações protéicas da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. Poço 1: marcadores moleculares; 2 - pico I (DEAE); 3 - pico II DEAE.

O rendimento da cromatografia foi determinado após dialise e liofilização da amostra com auxílio de balança analítica pela pesagem do material protéico, já que contaminantes como pigmentos interferiram na quantificação de proteínas. A partir de 300 g de alga foram obtidos 590 mg de proteínas no pico I e 202 mg de proteínas no pico II. Com base nestes resultados, o pico I foi escolhido para análise nas etapas posteriores.

A eletroforese bidimensional foi realizada após a aplicação sequencial de passos que provavelmente removeram alguns contaminantes interferentes, tais como pigmentos, polissacarídeos, ácidos nucleicos e sais que normalmente interferem no processo de focalização isoeétrica (IEF) (WONG *et al.*, 2006). Estes passos incluíram a cromatografia de troca iônica, diálise exaustiva contra água deionizada e limpeza da amostra com o uso do quite “Clean-Up” da GE. O objetivo do uso deste quite foi remover qualquer molécula contaminante (não protéica) que pudesse interferir na focalização isoeétrica. Como o material biológico é de origem marinha, a extração de proteínas totais foi realizada com fosfato de sódio e a precipitação de proteínas totais com sulfato de amônio, todos estes sais, se presentes nas moléculas de proteínas, poderiam interferir negativamente na focalização isoeétrica. O

gel obtido a partir da realização da eletroforese bidimensional apresentou pontos protéicos bem definidos, proteínas com diversidade de massas, onde a maioria das delas foram caracterizadas com pI entre a faixa neutra a básica (Figura 3).

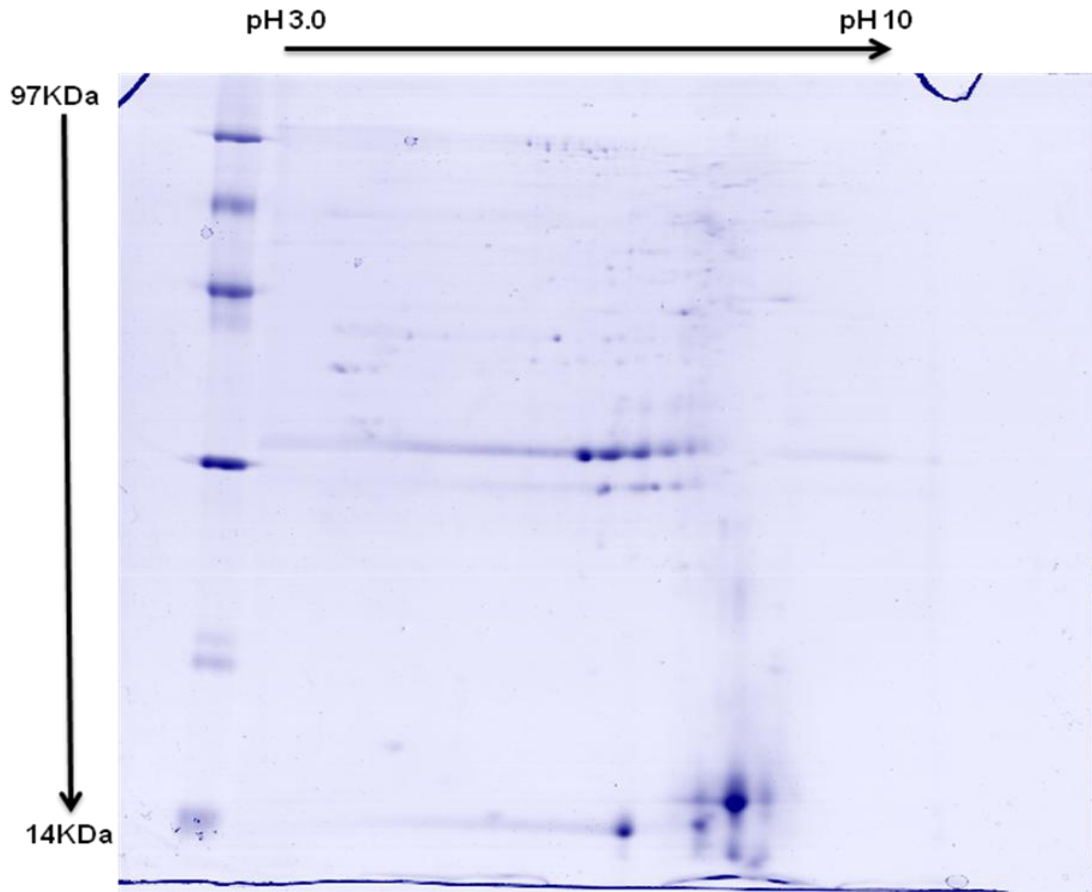


Figura 3 - Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* sem processamento computacional. Na horizontal, distribuição dos valores de pH de 3 à 10 e separação das proteínas por focalização isoeletrica (primeira dimensão). Na vertical, separação das proteínas de acordo com a massa molecular aparente (segunda dimensão). Marcadores moleculares: 14, 21, 30, 45, 66 e 97 kDa.

O experimento foi feito em duplicata e os géis 2DE foram analisados com o auxílio do programa Image Master 7.0 (GE), sendo comparados entre si. Um gel foi denominado gel de referência, e nele foram detectados 141 pontos protéicos. No segundo gel, denominado gel de comparação, foram detectados 161 pontos protéicos.

Na comparação entre os géis, 115 pontos protéicos foram idênticos entre si. O conjunto de pontos protéicos presentes em ambos os géis é denominado “match”, sendo o “matching” uma operação fundamental em análise de imagem 2DE. Basicamente, o

“matching” consiste em um algoritmo de correspondência que compara imagens de géis para encontrar correspondências entre eles e pontos relacionados, ou seja, pontos que representam a mesma proteína no gel. Estes “matches” indicam os pontos protéicos que tanto apareceram em um gel como no outro, e assim inferindo na qualidade e reprodutibilidade dos géis (BJÖRKGATAN, 2008).

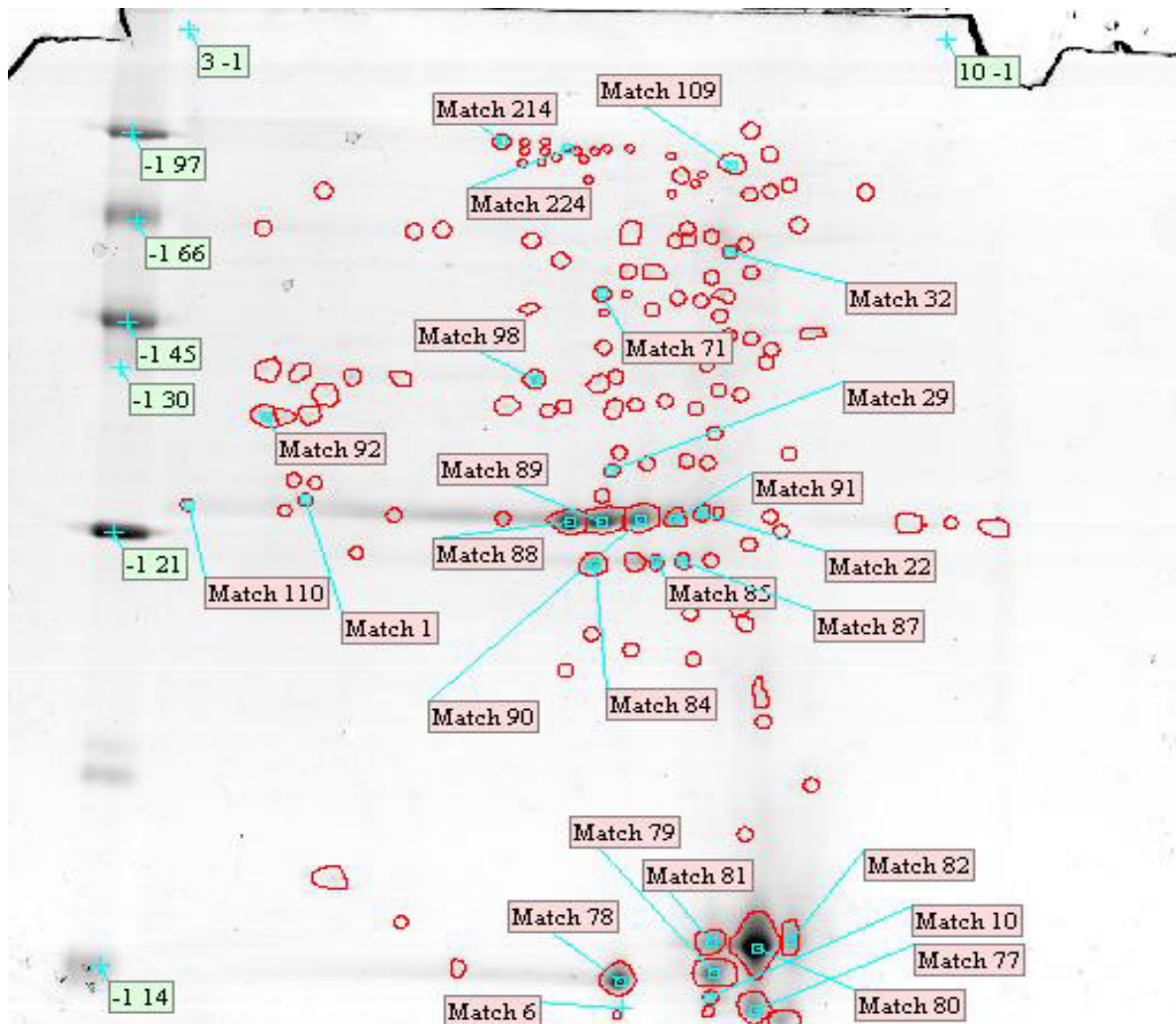


Figura 4 - Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* com processamento computacional. Na horizontal, valores de referência de pH (3-10) e na vertical, valores de referência de marcadores moleculares: 14, 21, 30, 45, 66 e 97 kDa.

Para analisar semelhanças dos géis ou variações experimentais, tais como disparidades de mancha, intensidade ou de carregamento de amostra, foi produzido um diagrama de dispersão para os pontos correspondentes (Figura 5 e 6). O diagrama de

dispersão fornece informações (da variação de dispersão) sobre o mesmo ponto protéico presente nos dois géis. (BJÖRKGATAN, 2008).

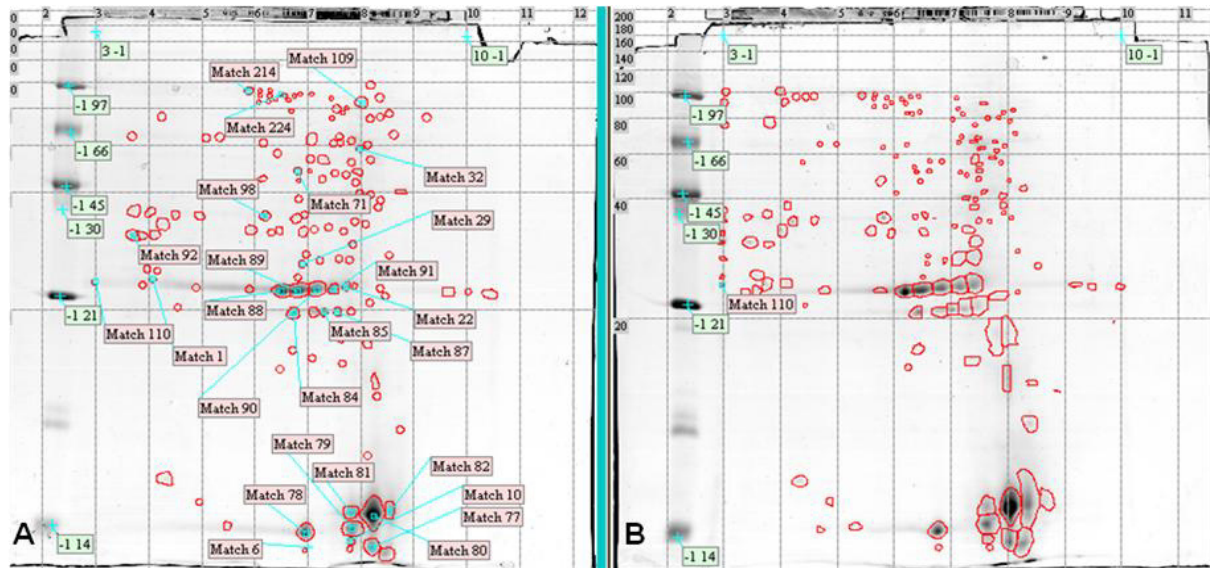


Figura 5 - Comparação entre os géis de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. A: gel de referência; B: gel de comparação mostrando os dados após o “matching” utilizando o programa Image Master 7.0 Na horizontal, valores de referência de pH (3-10) e na vertical, valores de referência de marcadores moleculares: 14, 21, 30, 45, 66 e 97 kDa.

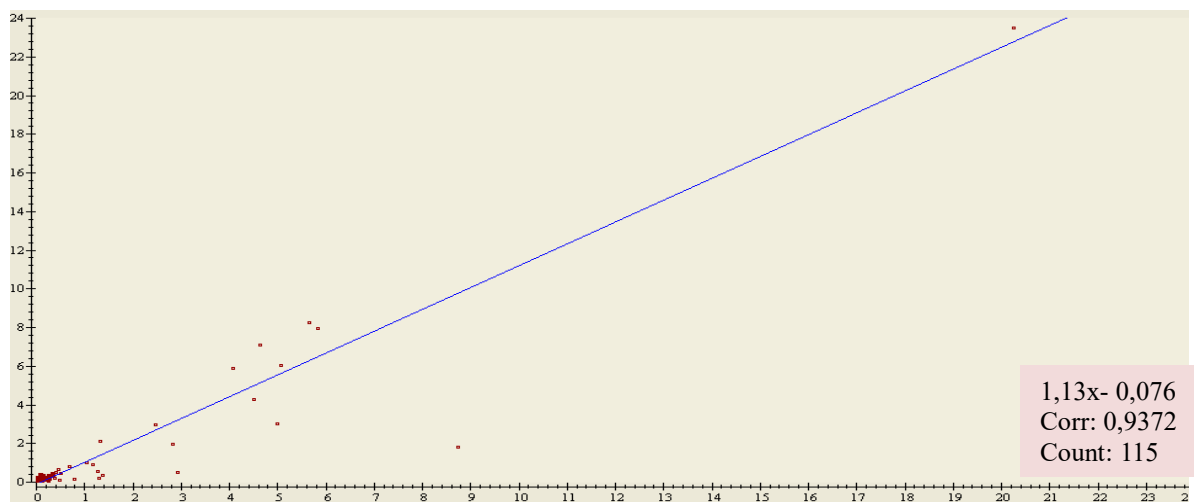


Figura 6 – Diagrama de dispersão dos pontos protéicos identificados nos géis de referência e comparação da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*.

A Figura 7 representa o gel de eletroforese bidimensional analisado no programa

Image Master 7.0 na presença de linhas de grade, o que possibilitou uma melhor visualização dos pontos protéicos mais intensos em relação a pI e MM. As área 1 e 2 representam regiões com pontos protéicos mais intensos.

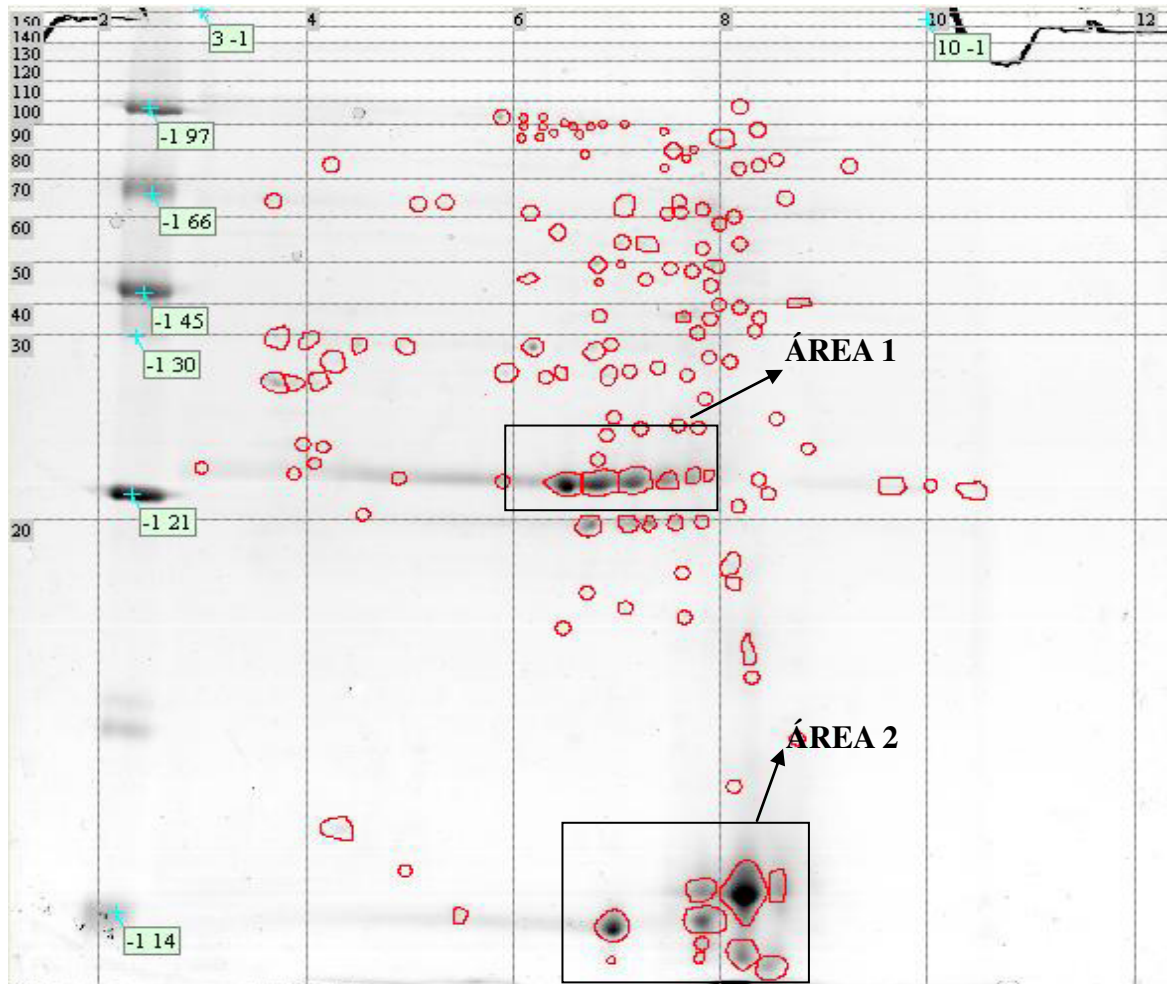


Figura 7 - Gel de eletroforese 2DE 15% da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* mostrando a área 1 e 2 contendo os pontos protéicos mais intensos. Marcadores moleculares: 14, 21, 30, 45, 66 e 97 kDa..

Após a inserção das linha de grades no gel foram analisadas as variações de intensidades de cada ponto protéico com o auxílio da ferramenta “View 3D”. Esta ferramenta possibilitou analisar estes pontos em perspectiva tridimensional. Neste tipo de visão, o eixo X e Y representam os valores de pI e MM, enquanto que a intensidade do pixel é plotado ao longo da terceira dimensão (eixo Z). A imagem resultante mostra um pico para cada ponto protéico, sendo a altura do pico proporcional à intensidade do local (Figura 8 e 9). A partir da

análise do gel foi gerado a Tabela 2, contendo informações de parâmetros físicos e químicos de todos os pontos protéicos.

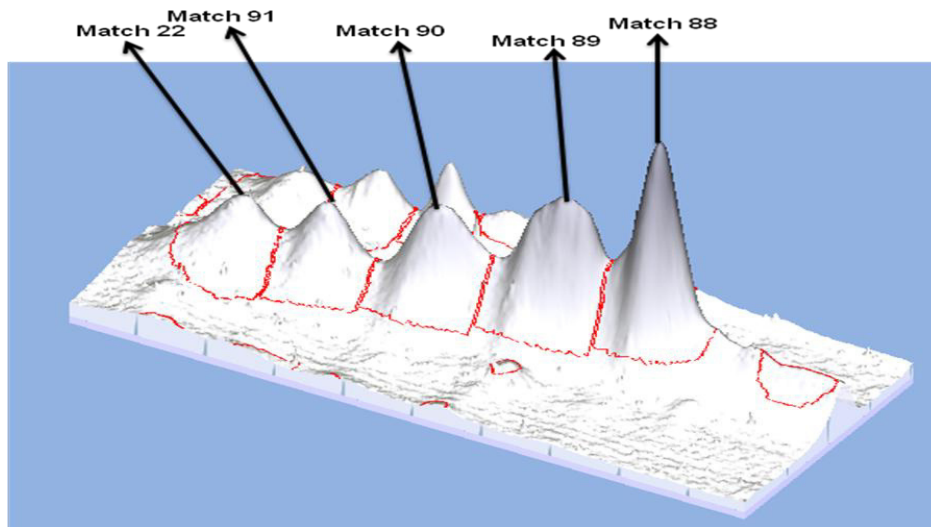


Figura 8 - Imagem 3D da área 1 da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, contendo os pontos protéicos mais intensos localizadas no gel 2DE.

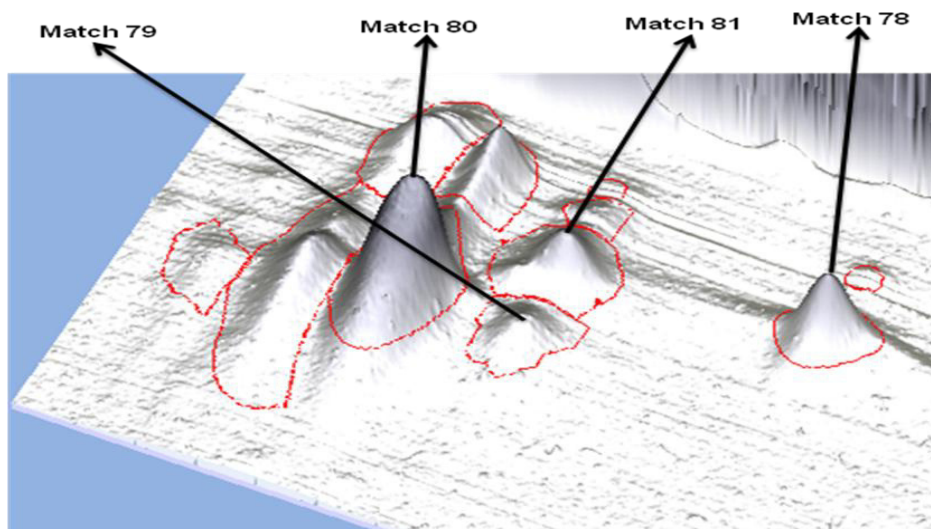


Figura 9 - Imagem 3D da área 2 da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*, contendo os pontos protéicos mais intensos localizadas no gel 2DE.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros físicos químicos dos 115 pontos protéicos presentes nos dois géis (de referência e comparação). Os dados marcados representam as proteínas que foram utilizadas para identificação de proteínas através da ferramenta TagIdent.

Tabela 2 - Parâmetros de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (M.M) correspondentes aos pontos protéicos detectados no gel de referência com e sem “matching”.

| Match ID | pI | P.M. | Match ID | pI | P.M. | Match ID | pI | P.M. |
|----------|---------|------|----------|---------|------|----------|---------|------|
| 0 | 3,88578 | 22 | 47 | 7,52296 | 49 | 94 | 5,93169 | 28 |
| 1 | 4,08959 | 23 | 48 | 7,71892 | 49 | 95 | 6,46473 | 28 |
| 2 | 4,54423 | 21 | 49 | 7,82083 | 53 | 96 | 4,26988 | 28 |
| 3 | 8,83987 | 23 | 50 | 7,5935 | 64 | 97 | 6,78611 | 29 |
| 4 | 10,0314 | 21 | 51 | 8,3617 | 75 | 98 | 6,19821 | 29 |
| 5 | 4,95185 | 15 | 52 | 8,16573 | 74 | 99 | 4,95185 | 29 |
| 6 | 6,95073 | 13 | 53 | 7,46025 | 74 | 100 | 4,51288 | 29 |
| 7 | 8,73796 | 17 | 54 | 6,83315 | 47 | 101 | 4,02688 | 30 |
| 8 | 10,4625 | 21 | 55 | 7,03695 | 50 | 102 | 3,73684 | 30 |
| 9 | 9,66293 | 21 | 56 | 6,87234 | 90 | 103 | 7,65622 | 36 |
| 10 | 7,80515 | 14 | 57 | 6,68421 | 79 | 104 | 8,76932 | 41 |
| 11 | 5,48488 | 14 | 58 | 6,64502 | 86 | 105 | 6,14334 | 48 |
| 12 | 8,12654 | 19 | 59 | 6,75476 | 90 | 106 | 7,94625 | 50 |
| 13 | 7,65622 | 19 | 60 | 6,58231 | 89 | 107 | 7,28779 | 54 |
| 14 | 7,08399 | 19 | 61 | 6,38634 | 87 | 108 | 7,08399 | 63 |
| 15 | 6,4804 | 18 | 62 | 6,29227 | 90 | 109 | 8,02464 | 84 |
| 16 | 6,70773 | 19 | 63 | 6,30011 | 93 | 110 | 3 | 22 |
| 17 | 8,46361 | 21 | 64 | 6,08063 | 85 | 111 | 7,79731 | 13 |
| 18 | 8,17357 | 21 | 65 | 6,10414 | 90 | 112 | 8,26764 | 18 |
| 19 | 7,82083 | 20 | 66 | 6,10414 | 93 | 113 | 3,96417 | 24 |
| 20 | 4,89698 | 22 | 67 | 5,88466 | 93 | 114 | 8,12654 | 60 |
| 21 | 5,90034 | 22 | 68 | 8,62038 | 65 | 115 | 8,52632 | 77 |
| 22 | 7,7346 | 22 | 69 | 7,55431 | 80 | 116 | 7,66405 | 77 |
| 23 | 8,54199 | 25 | 70 | 7,05263 | 54 | 117 | 7,45241 | 87 |
| 24 | 7,84435 | 26 | 71 | 6,80963 | 50 | 118 | 6,26092 | 85 |
| 25 | 7,78163 | 24 | 72 | 6,16685 | 61 | 119 | 5,33595 | 64 |
| 26 | 7,5935 | 24 | 73 | 6,44121 | 57 | 120 | 3,68981 | 64 |
| 27 | 7,22508 | 24 | 74 | 4,23852 | 75 | 121 | 4,12094 | 27 |
| 28 | 6,81747 | 23 | 75 | 5,08511 | 63 | - | 8,13438 | 16 |
| 29 | 6,9037 | 24 | 76 | 8,48712 | 13 | - | 8,31467 | 18 |
| 30 | 6,96641 | 25 | 77 | 8,2206 | 13 | - | 7,64054 | 19 |
| 31 | 8,18141 | 54 | 78 | 6,97424 | 14 | - | 8,09518 | 20 |
| 32 | 7,98544 | 58 | 79 | 7,84435 | 14 | - | 7,89138 | 22 |
| 33 | 7,82867 | 62 | 80 | 8,24412 | 14 | - | 8,36954 | 22 |
| 34 | 7,61702 | 61 | 81 | 7,82083 | 14 | - | 4,16797 | 23 |
| 35 | 8,33035 | 31 | 82 | 8,55767 | 14 | - | 3,89362 | 27 |
| 36 | 8,08735 | 28 | 83 | 4,33259 | 15 | - | 7,12318 | 28 |
| 37 | 7,89138 | 29 | 84 | 6,74692 | 20 | - | 6,82531 | 36 |
| 38 | 7,67973 | 27 | 85 | 7,32699 | 20 | - | 8,18141 | 39 |
| 39 | 7,3897 | 28 | 86 | 7,12318 | 20 | - | 7,27996 | 47 |
| 40 | 6,94289 | 29 | 87 | 7,56215 | 20 | - | 7,50728 | 61 |
| 41 | 6,31579 | 27 | 88 | 6,51176 | 21 | - | 9,24748 | 75 |
| 42 | 7,78163 | 31 | 89 | 6,82531 | 21 | - | 7,74244 | 80 |
| 43 | 7,89138 | 35 | 90 | 7,17021 | 22 | - | 8,35386 | 88 |
| 44 | 8,37738 | 36 | 91 | 7,4916 | 22 | - | 6,49608 | 90 |
| 45 | 7,90705 | 46 | 92 | 3,71333 | 27 | - | 7,08399 | 90 |
| 46 | 7,98544 | 40 | 93 | 6,92721 | 27 | - | 8,18925 | 98 |

A Tabela 3 apresenta o valor dos pontos protéicos em relação a caracterização de ponto isoelétrico (pI). Na Figura 10 mostra que a maioria das proteínas encontradas, possuem pI neutro e básico. Na Tabela 4 e Figura 11 apresentam os valores dos pontos protéicos referentes ao parâmetro de massa molecular (MM), onde a maioria das proteínas exibem massa molecular relativamente baixos.

Tabela 3 - Valores de ponto isoelétrico (pI) e quantidade de pontos protéicos correspondente ao intervalo de classe.

| Classe de pI | Pontos protéicos | |
|--------------|------------------|--------|
| | Quantidade | % |
| 3 a 4 | 19 | 13,48 |
| 5 a 6 | 41 | 29,08 |
| 7 a 8 | 77 | 54,61 |
| 9 a 10 | 4 | 2,84 |
| Total | 141 | 100,00 |

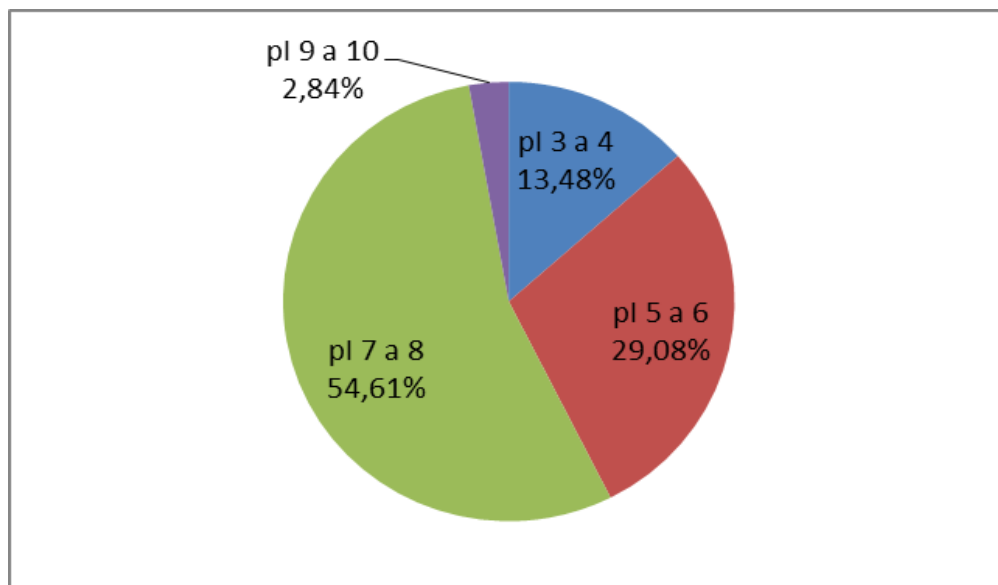


Figura 10 - Percentual de pontos protéicos da fração da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* com relação as classe de valores de pI.

Tabela 4 - Valores de massa molecular (MM) e quantidade de pontos protéicos correspondente ao intervalo de classe.

| Classe de MM (kDa) | Pontos protéicos | |
|-----------------------|------------------|--------|
| | Quantidade | % |
| 0 a 20 | 23 | 16,20 |
| 20 a 40 | 62 | 43,70 |
| 40 a 60 | 18 | 12,70 |
| 60 a 80 | 19 | 13,40 |
| 80 a 100 | 20 | 14,10 |
| Total | 141 | 100,00 |

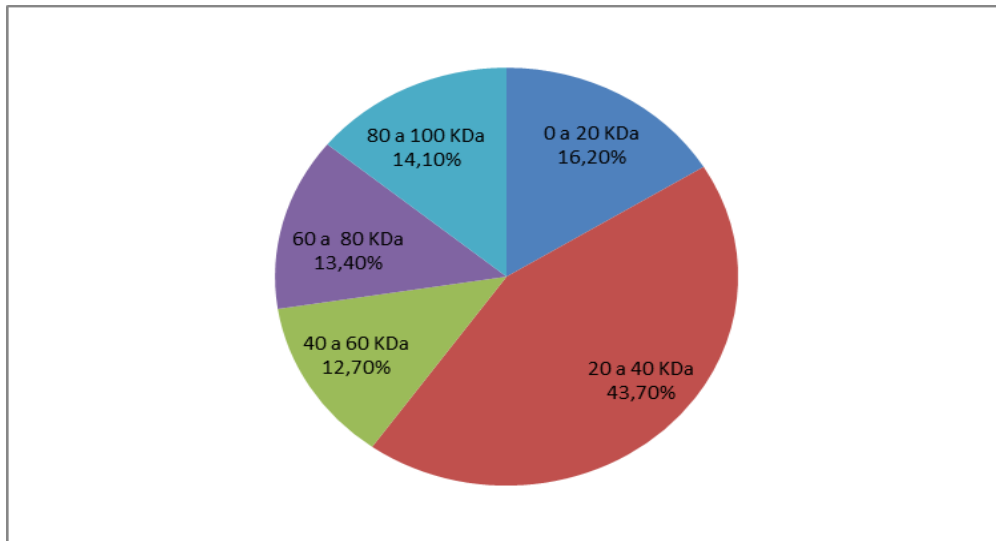


Figura 11 - Percentual de pontos protéicos da fração protéica da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* com relação as classe de valores de massa molecular.

A partir dos parâmetros obtidos pelo programa Image Mater 7.0, 24 pontos protéicos tiveram suas proteínas identificadas pela ferramenta TagIdent. A identificação foi realizada com o auxílio dos dados de pI e MM de cada um desses 24 pontos protéicos, e foi estabelecido uma faixa de tolerância para encontrar as proteínas referentes de 5 a 10% na ferramenta TagIdent. Algumas dessas proteínas ao serem identificadas no banco de dados possibilitaram o conhecimento de suas funções, já conhecidas em outros organismos.

O TagIdent é uma ferramenta de identificação de proteínas que necessita de dados experimentais de pI e peso molecular. Esses dados foram combinados com informações existentes de sequências de proteínas de diversos organismos existentes nos bancos de dados. A ferramenta TagIdent está disponível pelo ExpaSy (<http://web.expasy.org/tagident/>), um portal de recursos de bioinformática. Os pontos protéicos foram nomeados quanto ao número do “match” originado na análise pelo Image Master 7.0, e foram expresso na Tabela 5.

O ponto protéico de “match” 1 apresentou um pI de 4,08959 e um P.M. de 23.000 Da. Quando submetido à identificação no Tagident mostrou ser, muito provavelmente, uma proteína putativa não caracterizada (A1SBR3), também encontrada na bactéria gram-negativa anaeróbica *Shewanella amazonensis* (strain ATCC BAA-1098/SB2B). Essa bactéria possui genôma completo sequenciado e vive em barreiras de encostas do rio Amazonas.

O ponto protéico de “match” 6 apresentou pI de 6,95073 e P.M. de 13.000 Da semelhante a uma proteína da subunidade 50S do ribossomo (A0B601), existente na arqueabactéria *Methanosaeta thermophila*. A proteína acima se liga ao complexo ribossomal sendo importante para o processo de tradução nas células.

O ponto protéico com valor de “match” 10 apresentou pI de 7,80515 e um P.M. de 14.000 Da, semelhante a uma proteína encontrada em *Mycobacterium tuberculosis*, porém com função desconhecida.

O ponto protéico de “match” 22 mostrou pI de 7,7346 e P.M. de 22.000 Da, corresponde a subunidade beta proteína do proteossoma (D2RGT4), da bactéria *Archaeoglobus profundus*. Os proteossomos representam um complexo de proteínas localizadas no citoplasma com função de degradar proteínas não necessária pelo organismo num determinado momento.

O ponto protéico com “match” 29 apresentou pI 6,9037 e P.M. de 24.000 Da. Esses parâmetros correspondem a uma proteína não caracteriza encontrada no fungo *Sordaria macrospora*.

O ponto protéico com “match” 32 apresentou um valor de pI de 7,98544 e P.M. de 58.000 Da e corresponde a uma glicoproteína de fusão celular (PO6828) com atividade hemolítica presente no vírus *Human parainfluenza*.

O ponto protéico com “match” 69 apresentou pI de 7,55431 e um P.M. de 30.000 Da, que provavelmente corresponde a uma metiltransferase (Q12LC6), presente na subunidade maior do RNA ribossomal. Essa proteína foi encontrada também na bactéria *Shewanella denitrificans* e apresenta a função de metilar especificamente a guanossina da posição 2.445 da subunidade 23S do RNA ribossomal (rRNA) desta bactéria. A metilação do

rRNA é extremamente importante para proteger a autoclivagem do material genético bacteriano, já que a mesma possui inúmeras enzimas de restrição.

Tabela 5 – Os 24 pontos protéicos identificados pela ferramenta TagIdent, com parâmetros correlacionados com os pontos obtidos pelo programa Image Master 7.0.

| Match ID | pI | MM (kDa) | pI | MM (kDa) | FUNÇÃO | ORGANISMO | CÓDIGO |
|----------|--------------|----------|---------|----------|--|-------------------------------------|--------|
| | Experimental | | Teórico | | | | |
| 1 | 4,08959 | 23 | 4,09 | 23,020 | - | <i>Shewanella amazonensis</i> | A1SBR3 |
| 6 | 6,95073 | 13 | 6,95 | 13 | Liga-se ao complexo ribossomal | <i>Methanosaeta thermophila</i> | A0B601 |
| 10 | 7,80515 | 14 | 7,80 | 14,039 | - | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 006607 |
| 22 | 7,7346 | 22 | 7,66 | 22,095 | Degradação de proteínas | <i>Archaeoglobus profundus</i> | D2RGT4 |
| 29 | 6,9037 | 24 | 6,90 | 24,024 | - | <i>Sordaria macrospora</i> | F7W7C6 |
| 32 | 7,98544 | 58 | 7,97 | 58,092 | Atividade hemolítica | <i>Human parainfluenza</i> | PO6828 |
| 69 | 7,55431 | 80 | 7,55 | 80,029 | Função de metilar a guanosina | <i>Shewanella denitrificans</i> | Q12LC6 |
| 71 | 6,80963 | 50 | 6,81 | 50,078 | Proteína de transporte | <i>Francisella tularensis</i> | AOQ4P2 |
| 77 | 8,2206 | 13 | 8,21 | 13,039 | Proteína de controle celular | <i>Homo sapiens</i> | AOZSE6 |
| 78 | 6,97424 | 14 | 6,96 | 14,043 | - | <i>Gallus gallus</i> | 013153 |
| 79 | 7,84435 | 14 | 7,83 | 13,999 | Reconhecimento de células apoptóticas | <i>Caenorhabditis elegans</i> | P34500 |
| 80 | 8,24412 | 14 | 8,24 | 14,005 | Lipídios de membrana do espermatozóide | <i>Canis familiaris</i> | Q28895 |
| 81 | 7,82083 | 14 | 7,82 | 14,032 | Síntese protéica. | <i>Methanocorpusculum labreanum</i> | A2SPL7 |
| 82 | 8,55767 | 14 | 8,53 | 14,012 | Proteínas da célula | <i>Rathus norvegicus</i> | Q62625 |
| 84 | 6,74692 | 20 | 6,74 | 19,999 | Reconhece a junção Holliday | <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> | A1T883 |
| 85 | 7,32699 | 20 | 7,33 | 20,017 | - | <i>Clostridium bartlettii</i> | BOA730 |
| 87 | 7,56215 | 20 | 7,50 | 19,999 | Transporte de elétrons | <i>Thlaspi bursa-pastoris</i> | A4QKP9 |
| 88 | 6,51176 | 21 | 6,51 | 21,001 | - | <i>Pelobacter propionicus</i> | A1ALH5 |
| 89 | 6,82531 | 21 | 6,82 | 21,004 | Envolvida na ubiquitinação | <i>Candida glabrata</i> | Q6FVQ8 |
| 90 | 7,17021 | 22 | 7,17 | 22,033 | Liga-se a carboidratos | <i>Caenorhabditis briggsae</i> | A8XUE7 |
| 91 | 7,4916 | 22 | 7,49 | 22,077 | - | <i>Populus trichocarpa</i> | B95214 |
| 92 | 3,71333 | 27 | 3,71 | 27,040 | - | <i>Vibrio cholerae</i> | DOI1N3 |
| 98 | 6,19821 | 29 | 6,19 | 29,089 | Síntese de estruturas pirrólicas | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | A4WP10 |
| 109 | 8,02464 | 84 | 8,02 | 84,024 | Síntese de ATP | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | A6ZL24 |

(-) Não possuem função ainda conhecida.

O ponto protéico de “match” 71 possui um pI de 6,80963 e um P.M. de 50.000 Da e, muito provavelmente, corresponde a proteína de transporte da família HlyC/CORC (AOQ4P2) encontrada na bactéria *Francisella tularensis* subsp.*novicida*.

O ponto protéico de “match” 77 possui dados experimentais de pI 8,2206 e um P.M. de 13.000 Da que, muito provavelmente, corresponde a proteína de controle celular 50C, pertencente ao organismo *Homo sapiens*. A proteína de controle celular 50C está localizada nas membranas celulares.

O ponto protéico de “match” 78 apresentou pI de 6,97424 e P.M. de 14.000 Da, corresponde a proteína relacionada com Avidina 1 (013153) pertencente a espécie *Gallus gallus* (galinha).

O ponto protéico de “match” 79 apresentou pI de 7,84435 e P.M. de 14.000 Da, que provavelmente corresponde a proteína do tipo transtirretina 2, que medeia o reconhecimento de células apoptóticas (P34500) presente no nematóide *Caenorhabditis elegans*.

O ponto protéico de “match” 80 apresentou pI de 8,24412 e P.M. de 14.000 Da, provavelmente a proteína secretora do epidídimo E1 (Q28895) pertencente a espécie *Canis familiaris*. Esta proteína está envolvida na regulação da composição lipídica das membranas de espermatozoides durante a maturação das células.

O ponto protéico de “match” 81 apresentou pI de 7.82083 e P.M. de 14.000 Da, provavelmente corresponde a proteína ribossomal da subunidade 30S (A2SPL7) presente na espécie *Methanococcus labreanus*, proteína importante para a estruturação do complexo de síntese protéica.

O ponto protéico de “match” 82 apresentou pI 8,55767 e P.M. de 14.000 Da, corresponde a proteína de microtúbulos (proteínas do citoesqueleto celular) de *Rattus norvegicus* (Q62625).

O ponto protéico de “match” 84 apresentou pI 6,74692 e P.M. de 20.000 Da, provavelmente, corresponde a enzima RuvA que reconhece junção *Holliday* (conjunto de 4 fitas de DNA que sofrem recombinação). Essa enzima, presente em *Mycobacterium vanbaalenii*, atua como helicase e é dependente de ATP.

O ponto protéico de “match” 85 possui um pI de 7,32699 e P.M. de 20.000 Da presente na bacteriana *Clostridium bartlettii*. Essa proteína não apresenta função conhecida.

O ponto protéico com “match” 87 apresentou um pI de 7,56215 e P.M. de 20.000 Da e corresponde a subunidade-I de quinona oxirredutase dependente de NADPH (A4QKP9) presente nos cloroplastos de *Thlaspi bursa-pastoris*. Esta proteína tem função de transportar

elétrons através de plastoquinona, durante a fotossíntese.

O ponto protéico de “match” 88 apresentou pI 6,51176 e P.M. de 21.000 Da, provavelmente corresponde a metilase de RNA ribossomal (A1ALH5) presente na bacteriana *Pelobacter propionicus*.

O ponto protéico de “match” 89 apresentou pI 6,82531 e P.M. de 21.000 Da, provavelmente, corresponde a enzima conjugada a RUB1, enzima envolvida na ubiquitinação (marcação de proteínas a serem degradadas) presente no fungo *Candida glabrata*.

O ponto protéico de “match” 90 apresentou pI 7,17021 e P.M. de 22.000 Da, provavelmente, corresponde a proteína CBR-LEC-10 (A8XUE7) presente no nematóide *Caenorhabditis briggsae*. Essa proteína se liga a carboidratos e apresenta um domínio galectínico.

O ponto protéico com “match” 91 apresentou um pI 7.4916 e P.M. de 22.000 Da, que provavelmente, corresponde a proteína de função desconhecida presente em *Populus trichocarpa*, vegetal superior.

O ponto protéico de “match” 92 apresentou um valor de pI de 3,71333 e P.M. de 27.000 Da, e corresponde a uma proteína de função não conhecida presente em *Vibrio cholerae*.

O ponto protéico de “match” 98 apresentou pI de 6,19821 e P.M. de 29.000 Da, que provavelmente corresponde a proteína pirroloquinolina quinona sintetase pertencente a bactéria *Rhodobacter sphaeroides*. Esta proteína possui função de ciclização de metabólito para sintetizar estruturas pirrónicas.

O ponto protéico de “match” 109 apresentou pI 8,02464 com P.M. de 84.000 Da, provavelmente corresponde a enzima ATPase (A6ZL24) localizada na membrana interna da mitocôndria de de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta enzima está envolvida na síntese de ATP de diversos organismos.

Poucos são os estudos proteômicos de algas marinhas encontrados na literatura. Além disso, para se obter uma amostra de boa qualidade para estudos proteômicos, é necessário conhecer a natureza da alga em estudo. Este conhecimento é extremamente importante para se desenvolver um protocolo eficiente e que produza amostras de proteínas com qualidade e grandes quantidades. Algumas algas são ricas em carboidratos o que é o caso das macroalgas vermelhas. Outras algas mesmo apresentando poucos carboidratos em sua composição possuem pigmentos que são compostos considerados contaminantes. Carboidratos e pigmentos são os principais contaminantes que interferem nos estudos proteômicos de algas marinhas. Além disso, esses compostos geralmente são solubilizados em

protocolos utilizados para extração de proteínas totais. Para remover esses contaminantes dos extratos proteicos, a maioria dos autores que desenvolveram estudos proteômicos de algas utilizou TCA e acetona como agentes precipitantes de proteínas e fenol/clorofórmio como agente de remoção de pigmentos e ácidos nucleicos. Uma alternativa para remover carboidratos é realização de uma pré-extração com etanol, que também remove poucos pigmentos.

Nos estudos proteômicos realizados com a macroalga marinha vermelha *Gracilaria changii* quatro diferentes metodologias foram testadas. Na metodologia 1 as proteínas totais foram extraídas com tampão Tris-HCl pH 8,8 na presença de SDS. Na metodologia 2 as proteínas totais foram extraídas com um tampão de lise na presença de endonucleases. Na metodologia 3 as proteínas foram extraídas com ácido tricloroacético/acetona e SDS, sendo precipitadas a -20 ° C. E na metodologia 4 as proteínas totais foram extraídas com TRI Reagent® (para extração de RNA), sendo o extrato clarificado com fenol e clorofórmio (para remover contaminantes) e as proteínas foram precipitadas com isopropanol -20°C. A metodologia 1 produziu grande quantidade de proteínas e a metodologia 3 houve baixa produtividade de proteínas totais. Além disso, as amostras extraídas pelas metodologias 1 e 3 apresentaram baixa resolução no gel 2DE, sendo muitas proteínas não focalizadas e poucas proteínas resolvidas. A melhor metodologia que apresentou um gel de boa resolução foi a metodologia 4 que utilizou fenol e clorofórmio para remover contaminantes (carboidratos e pigmentos) e isopropanol (para precipitar as proteínas totais). Mesmo assim, muitas estrias apareceram no gel. Além disso, a análise proteômica de *G. changaii* foi bem sucedida em tiras de pH de 4-7 e de 5-8. No total 500 pontos protéicos foram revelados em pH de 4-8 sendo 15 identificadas por espectrometria de massas. Não houve uma boa resolução em tiras de pH 3-10 (WONG *et al.*, 2006).

As metodologias utilizadas no estudo proteômico de *G. changii* também foram testadas para preparo de amostras de *H. musciformis*, com algumas modificações. No entanto, nenhuma destas metodologias produziu amostras de qualidade. Em todas as metodologias havia sempre a presença de pigmentos, que impediam a focalização das proteínas totais. No intuito de melhorar o processo de extração, nestas mesmas metodologias foram adicionados ácido ascórbico e EDTA a fim de inibir proteases. Mesmo assim, os resultados foram negativos para estudos proteômicos.

Em estudos proteômicos das algas marrons *Scytosithon gracilis* e *Ectocarpus siliculosus* foram testados 5 diferentes protocolos para extração de proteínas totais. Na

metodologia 1 foi utilizado ureia para extração de proteínas totais e precipitação das mesmas com acetona. Na metodologia 2 foi realizada extração com uréia, seguida de ultracentrifugação e precipitação de proteínas totais com acetona. Aqui a acetona foi utilizada somente como agente precipitante, já na metodologia de extração de proteínas de *G. changii* a acetona contribui também para extração das proteínas totais. A metodologia 3 foi realizada extração com uréia, ultracentrifugação e precipitação com ácido tricloroacético/acetona. Na metodologia 4 a extração foi realizada somente com fenol e por fim, na metodologia 5 a extração de proteínas totais foi realizada com fenol seguida de etapas de dessalinização. Para estudos proteômicos a metodologia 4 se mostrou mais eficiente para as duas algas marrons em estudo, no entanto a metodologia 5 apresentou melhor resolução devido as sequenciais etapas de dessalinização, revelando a presença de proteínas de 200 a 19 kDa. Para identificação de proteínas por espectrometria de massa foram selecionados 46 pontos protéicos de *S. gracilis* e 150 de *E. siliculosus*. Sendo encontradas principalmente proteínas como fatores de transcrição e tradução, proteínas fotossintéticas e proteínas de citoesqueleto. Nestes estudos os maiores contaminantes presentes nas amostras foram polissacarídeos e polifenóis e, portanto, o fenol foi considerando um agente de limpeza da amostra e minimizou a degradação de proteínas (CONTRERAS *et al.*, 2008).

Nos estudos realizados com a macroalga marron *Ecklonia kurome* foram testados 7 diferentes protocolos de extração de proteínas totais (tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 7,0; tampão Tris-HCl pH 8,8; solução de lise; solução de lise/acetona; solução de lise/TCA e etanol/fenol), sendo o método etanol/fenol o que apresentou melhor resolução. Vinte e sete proteínas foram identificadas por espectrometria de massas sendo, sendo a maioria proteína fotossintéticas (RUBISCO), fator de tradução e proteínas do citoesqueleto.

A contribuição da identificação destas proteínas se deve aos poucos genomas de algas sequenciados. O DNA de cloroplastos da macroalga marinha vermelha *Gracilaria tenuistipitata* foi sequenciado completamente, isso reflete a grande quantidade de proteínas fotossintéticas identificadas. Estudos de genoma da macroalga marinha marrom *Ectocarpus siliculosus* estão sendo realizados. Algumas microalgas apresentam genôma nuclear sequenciado como as *Chlamydomonas*. Esses genômas sequenciados auxiliarão enormemente na identificação das proteínas presentes em macroalgas (NAGAI *et al.*, 2008).

Além disso, na maioria dos trabalhos de proteômica de macroalgas desenvolvidos até o momento, as proteínas identificadas apresentam funções relacionadas a fotossíntese, como a RUBISCO e proteínas relacionadas a fatores de transcrição e fatores de tradução. Existe uma grande dificuldade em se determinar a função das proteínas separadas por

ferramentas de estudos proteômicos devido ao fato de haver poucas sequências de proteínas de algas disponíveis em bancos de dados. Além disso, poucos são os dados de genômas de algas sequenciados quando comparado com organismos como bactérias.

A maioria dos estudos de proteomas de algas foram realizados em microalgas como *Clamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e *Alexandrium tamarense*. Poucos são os estudos realizados com macroalgas. Essas considerações mostram a importância deste trabalho, fazendo com que os estudos realizados com a macroalga marinha vermelha *H. musciformis* contribuirá enormemente para a identificação de proteínas de algas e o conhecimento aprofundado desta espécie.

5 CONCLUSÃO

A metodologia foi eficiente para obtenção de géis com ponto protéico de alta resolução. Além disso, o protocolo de extração de proteínas totais deste trabalho é único na literatura, não sendo ainda descrito por outros autores.

As proteínas identificadas no presente trabalho, através da ferramenta TagIdent, também mostraram semelhanças em relação a função das proteínas de outras algas já estudadas e identificadas por espectrometria de massas, como proteínas do citoesqueleto e fatores de transcrição. Este trabalho representa uma enorme contribuição nos estudos de proteômica de macroalgas marinhas. Estudos posteriores estão sendo realizados em nosso laboratório para a identificação de proteínas por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, n.6, p.841-864, 2008.

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

ANDERSON, I. J. *et al.* Complete genome sequence of *Methanocorpusculum labreanum* type strain Z. **Standards in Genomic Sciences**, East Lansing, v. 1, n. 2, p. 197-203, 2009.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, Deerfield Beach, v. 17, n. 3, p. 443-453, Mar 1996.

BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1998. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 38-42, Jan 1998.

BARSANTI, P. *et al.* **The World of Algae**. Springer Science. Business Media B.V. 2008

BARSSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. CRCpress. Taylor e Francis group.2006.

BJÖRKGATAN, A. B. *et al.* **ImageMaster 2D Platinum 7.0** - User Manual. GE Healthcare Bio-Sciences 30751 84 Uppsala Sweden, 2008.

BJÖRKGATAN, A. B. **ImageScanner III LabScan 6.0** - User Manual 28-9173-83 Edition AAGE Healthcare Bio-Sciences 30751 84 Uppsala Sweden, 2008.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia simplificada**. Viçosa, MG: Ed. Suprema, 2001.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, Dec 1995.

CANTÚ, M. D. *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARDOL, P. *et al.* The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 2, p. 447-459, Feb 2005.

CARDOZO, K. H. M. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology Pharmacology**, New York, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, July-Aug 2007.

CARPENTIER, S. C. *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, July 2005.

CELIS, J. E. *et al.* Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 398, n. 2-3, p.129-134, Dec 1996.

CHROMY, B. A. *et al.* Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 320, n. 2, p. 474-479, July 2004.

CONTRERAS, L. *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis analysis of brown algal protein extracts. **Journal of Phycology**, Malden, v. 44, n. 5, p. 1315-1321, Oct 2008.

COPELAND, A. *et al.* **Complete sequence of chromosome of *Pelobacter propionicus* DSM 2379**. Submitted (Oct-2006) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A1ALH5>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 3 nov 2011.

COPELAND, A. *et al.* **Complete sequence of chromosome of *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17025**. Submitted (Apr-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A4WPI0>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 4 nov 2011.

COPELAND, A. *et al.* **Complete sequence of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1**. Submitted (Dec-2006) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A1T883>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 31 out 2011.

COPELAND, A. *et al.* **Complete sequence of *Shewanella amazonensis* SB2B**. 2006. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A1SBR3>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 01 nov 2011.

COPELAND, A. *et al.* **Complete sequence of *Shewanella denitrificans* OS217.** Submitted (Mar-2006) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q12LC6>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 31 out 2011.

DAMONTE, E. B. *et al.* Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 47, n. 12, p. 2187-2192, June 1994.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. Proteoma: Avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 158-164, 2003.

DUJON, B. *et al.* Genome evolution in yeasts. **Nature**, London, v. 430, n. 6995, p. 35-44, July 2004.

ELLERBROCK, K. *et al.* Gene-expression in the dog epididymis: a model for human epididymal function. **International Journal of Andrology**, Oxford, 17, n. 6, p. 314-323, Dec 1994.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, n. 1, p. 26-33, Feb 2001.

FÖRSTER, B.; MATHESIUS, U.; POGSON, B. J. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 15, p. 4309-4320, Aug 2006.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, Washington, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, Nov 2001.

WOELKERLING, W. J.; COLE, K. M.; SHEATH, R. G. **Biology of the red algae**. Cambridge Uni. Press, New York. p -1-6, 1990.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009

GANTT, E. Pigment protein complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 48, n. 1-2, p. 47-53, May 1996.

GASTEIGER, E. *et al.* **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.** In: J. M. Walker (ed.): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press p. 571-607. Copyright Humana Press, 2005.

GONÇALVES, A. G. *et al.* Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 337, n. 24, p. 2443-2453, Nov 2002.

GÖRG, A. *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, Apr 2000.

GRANHAM, L. E.; GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education, 616 p, 2009.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Introdução ao conceito de Biotecnologia. **Apostila de Biotecnologia** - CCA/UFSC. Florianópolis: Steinmacher, p. 1-41, 2006.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 160-186, Mar 2006

HOCHSTRASSER, D. F. Proteome in perspective. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 36, n. 11, p. 825-836, Nov 1998.

HOEK, V. C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to Phycology**. Cambridge: University Press, 623 p, 1995.

HOSOUCHI T. *et al.* **Sequencing analysis of *Capsella bursa-pastoris* JO22 chloroplast DNA.** Submitted (Mar-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A4QKP9>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 31 out 2011
<<http://www.uniprot.org/uniprot/A0B601>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 29 out 2011.
<<http://www.uniprot.org/uniprot/A0Q4P2>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 3 nov 2011.

ISFORT, R. J. Proteomic analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 771, n. 1-2, p. 155-165, May 2002.

KAJI H. *et al.* Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans*

and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 6, n. 12, p. 2100-2109, Dec 2007.

KATZ-JAFFE, M.G. *et al.* The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 271-277, May 2009.

KAWAKUBO, A. *et al.* The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, n. 4, p.331-338, 1997.

KEINAENEN, R. A. LAUKKANEN, M. L.; KULOMAA, M. S. Molecular cloning of three structurally related genes for chicken avidin. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 1-6, p. 17-21, 1988.

KELLE, L.C. *et al.* Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas centrioles* reveals orthologs of ciliary-disease genes. **Current Biology**, Cambridge, v. 15, n. 12, p. 1090-1098, June 2005.

KHOTIMCHENKO, S. V.; VASKOVSKY, V. E.; TITLYANOVA, T. V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. **Botanica Marina**, Berlin, v. 45, n. 1, p.17-22, Jan 2002.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. Novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, New York, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, A. S. Structural analysis of antiviral sulfated α -D -(1 3)-linked mannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 273, n. 2, p. 179-185, Aug 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 173-184, Apr 2001.

LI, X., *et al.* Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. **Phytochemistry**, Oxford, v.59, n. 2, p. 157-161, Jan 2002.

LIMA, H. C, *et al.* Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 153-162, 1998.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. **Seaweed, Ecology and Physiology**. University of Cambridge – USA, 366 p, 1994.

LOPEZ, M. F. Proteome analysis. I- Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 722, n. 1-2, p. 191-202, Feb 1999.

MAGGS, C. A. *et al.* Speciation in red algae: Members of the Ceramiales as model organisms. Oxford University. **Integrative and Comparative Biology**, Cary, v. 51, n. 3, p. 492-504, Sept 2011.

MANN, M.; HØJRUP, P.; ROEPSTORFF, P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biological Mass Spectrometry**, West Sussex, v. 22, n. 6, p. 338-345, June 1993.

MICHEL, G. *et al.* The structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 334, n. 3, p. 421-433, Nov 2003.

MULLER, K. M. *et al.* Ribosomal DNA phylogeny of the bangiophycidae (rhodophyta) and the origin of secondary plastids. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 8, p. 1390–1400, Aug 2001.

MUZNY, D. M. *et al.* The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. **Nature**, London, v. 440, n. 7088, p. 1194-1198, Apr 2006.

NAGAI, K. *et al.* Protein extraction for 2-DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (Laminariales): Recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, n. 3, p. 672-681, Feb 2008.

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

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 84, n.

1, p. 49-54, Feb 2006.

NG, T. B.; LI, W. W.; YEUNG, H. W. Effects of lectins with various carbohydrate binding specificities on lipid metabolism in isolated rat and hamster adipocytes. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 149-155, 1989.

NOWROUSIAN, M. *et al.* De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 4, article number, e1000891, Apr 2010.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OKAI, Y. *et al.* Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asadusa-nori). **Cancer Letters**, Clare, v. 100, p. 235-240, June 1996.

PATTON, W. F. *et al.* Tris-tricine and Tris-borate buffer systems provide better estimates of human mesothelial cell intermediate filament protein molecular weights than the standard Tris-glycine system. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 197, n. 1, p. 25-33, Aug 1991.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 2, p. 347-352, Oct 1995.

POTIN, P. *et al.* Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 276-283, June 1999.

QUALTIERI, A. *et al.* Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 125-133, Jan 2007.

RAGAN, M. A.; GUTELL, R. R. Are red algae plants? **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 118, n. 2, p. 81-105, June 1995.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 234 p, 2007.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. *et al.* Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-12, Jan 2010

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconjugated Journal**, Dordrecht, v. 18, n. 8, p. 589-613, Aug 2001.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A. Análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, n.77, p.7-17, 2004.

SAUNDERS E. H. *et al.* **Los Alamos National Laboratory (LANL), National Microbial Pathogen Data Resource (NMPDR)** Submitted (Oct-2009) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/D0I1N3>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em 4 nov 2011.

SHAGGER, H.; VAN JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379, Nov 1987.

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

SHEATH, R. G. The biology of freshwater red algae. In: Round, F. E.; Chapman, D. J. (eds.). **Progress in Phycological Research**, v. 3, p. 89-157, 1984.

SPRIGGS M. K. *et al.* Fusion glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: nucleotide sequence of the gene, direct identification of the cleavage-activation site, and comparison with other paramyxoviruses. **Virology**, San Diego, v. 152, n. 1, p. 241-251, Jul 1986.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1740, n. 2, p.101–107, May 2005.

STAUBER, E. J.; HIPPLER, M. *Chlamydomonas reinhardtii* proteomics. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 12, p. 989–1001, Dec 2004.

STEIN L.D. *et al.* The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 1, n. 2, p. 166-192, Nov 2003.

SUDARSANAM P., *et al.* **Draft genome sequence of *Clostridium bartlettii* (DSM 16795).** Submitted (Nov-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/B0A730>> e <<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>> Acesso em: 3 nov 2011.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMONAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 2503-2518, Dec 2004.

THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 1302, n. 1, p. 17–45, July 1996.

TRUUS, K. *et al.* Structural and compositional characteristics of gelling galactan from the red alga *Ahnfeltiata buchiensis* (Ahnfeltiales, the Sea of Japan). **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 130–135, Jan 2006.

TUSKAN G.A. *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, Washington, v. 313, n. 5793, p. 1596-1604, Sept 2006.

VASKOVSKY, V. *et al.* Polar lipids and fatty acids of some marine macrophytes from the Yellow Sea. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 1347-1356, July 1996.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da Economia nos Ambientes Aquáticos à Bioremediação e à Química Analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.1, p.139-145, jan-fev 2004.

VON JAN, M. *et al.* Complete genome sequence of *Archaeoglobus profundus* type strain (AV18). **Standards Genomic Sciences**, East Lansing, v. 2, n. 3, p. 327-346, 2010.

WAHBEH, M. I. Amino acid macroalgae and fatty acid profiles of four species of from Aqaba and their suitability for use in fish diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 1-2, p. 101-109, Dec 1997.

WANG, S-B. *et al.* Isolation and characterization of cell wall-deficient *Hematococcus pluvialis* mutants. **Proteomics**, Malden, v. 5, n. 18, p. 4839–4851, Nov 2005.

WANG, S. -B. *et al.* Proteomics analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Planta**, New York, v. 220, n. 1, p.17–29, Nov 2004.

WEI, W. *et al.* Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 31, p. 12825-12830, July 2007.

WILKINS, M. R. *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, New York, v. 14, n. 1, p. 61-65, Jan 1996.

WILKINS, M. R. *et al.* **Proteome research**: new frontiers in functional genomics. Germany: Springer-Verlag, p. 243, 1997.

WINCK, F. V. *et al.* The nuclear proteome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proteomics**, 2011. DOI: 10.1002/pmic.201000782

WITVROUW, M. E. J.A. *et al.* Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhie llatenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 297-303, Mar 1994.

WONG, P. F. *et al.* Proteomics of the red alga, *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 113-120, Feb 2006.