



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**WINSTON KLEINE RAMALHO VIANA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA PRESENTE EM  
EXTRATO DA MICROALGA VERDE *Chlorella vulgaris* (Labec\_cv2019)**

**FORTALEZA**

**2024**

WINSTON KLEINE RAMALHO VIANA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA PRESENTE EM EXTRATO DA  
MICROALGA VERDE *Chlorella vulgaris* (Labec\_cv2019)

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos pesqueiros e Engenharia de pesca.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA

2024

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)

---

V668c Viana, Winston Kleine Ramalho.  
Caracterização bioquímica de uma lectina presente em extrato da microalga verde *Chlorella vulgaris* (Labcv\_cv2019) / Winston Kleine Ramalho Viana. – 2024.  
43 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

1. Atividade hemaglutinante. 2. Cromatografia. 3. Purificação. I. Título.

CDD 639.2

---

WINSTON KLEINE RAMALHO VIANA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA PRESENTE EM EXTRATO DA  
MICROALGA VERDE *Chlorella vulgaris* (Labec\_cv2019)

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos pesqueiros e Engenharia de pesca.

Aprovada em: 15 / 03 / 2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Romulo Farias Carneiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Regivânio Nascimento Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe Maria Angélica Ramalho e avó  
Maria Otília Queiroz Ramalho (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

A meu orientador, Professor Dr. Celso Shiniti Nagano, pela fé demonstrada em mim, pelos ensinamentos e sua imensa paciência.

Aos membros da banca, Dr. Romulo Farias Carneiro e Dr. Francisco Regivânio Nascimento Andrade.

A Dra. Renata Pinheiro Chaves, por sua dedicação, apoio e paciência.

Aos colegas de laboratório, Philippe Lima Duarte, Vinícius Paulino Pinto Menezes, Pedro Arthur Sousa Tabosa, Pedro Abílio Vieira, Manoel Ferreira da Costa Filho, José Gabriel de Sousa Cândido e Jessica de Assis Duarte, que muito me ajudaram durante os trabalhos.

A meu professor e amigo Dr. Aldeney Andrade Soares Filho.

A minha mãe Maria Angélica Ramalho, por tudo que ela tem feito por mim. Pela força e apoio durante toda a minha jornada pessoal e profissional.

A minha família e meus amigos, por acreditarem em mim, me apoiarem e por me proporcionarem muitas alegrias.

## RESUMO

A diversidade das microalgas está diretamente associada com as condições ambientais de modo que, em situações adversas, elas são capazes de sintetizar metabólitos para sua proteção. Uma variedade desses metabólitos apresenta atividades biológicas de interesse, dentre elas estão as lectinas, glicoproteínas que se ligam a carboidratos de maneira específica e reversível sendo capazes de interagir com diversas moléculas biológicas e seus receptores de superfície celular, e assim, podendo ter uma ampla gama de aplicações por sua especificidade. O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e caracterizar uma lectina presente no extrato da microalga *Chlorella vulgaris*, a qual foi cultivada em meio padrão *Bold Basal Medium* (BBM), de modo autotrófico em ciclos de 21 dias. O extrato homogeneizado foi obtido por meio de sonicação em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante, denominado de extrato bruto (EB), foi utilizado para a purificação. O EB foi precipitado por sulfato de amônio na saturação de 0-60%, e o precipitado proteico foi dialisado e submetido à cromatografia de troca iônica acoplada no sistema ÄKTA Pure. A atividade hemaglutinante foi avaliada contra eritrócitos de coelho. A atividade da fração foi caracterizada em relação ao pH, temperatura e sua estabilidade durante 30 min, inibição a carboidratos e glicoproteínas. A atividade da fração foi ótima na faixa de pH 4,0 - 5,0; e de temperatura entre 30 e 60 °C, com relativa estabilidade térmica. A fração foi inibida por D-Glicosamina. A fração da proteína apresentou massa molecular aparente de 15 kDa, estimada por SDS-PAGE. A lectina parcialmente purificada nesse estudo apresentou resultados diferentes das lectinas isolada da mesma espécie de microalga. Portanto, essas diferenças podem estar relacionadas com as cepas, o meio de cultura, a temperatura de cultivo, entre outros. É notório que cepas diferentes da mesma espécie de microalga possuem heterogeneidade em seus resultados bromatológicos.

**Palavras-chave:** atividade hemaglutinante; cromatografia; purificação.

## ABSTRACT

The diversity of microalgae is directly associated with environmental conditions so that, in adverse situations, they are capable of synthesizing metabolites for their protection. A variety of these metabolites present biological activities of interest, among them are lectins, and glycoproteins that bind to carbohydrates in a specific and reversible manner, being able to interact with various biological molecules and their cell surface receptors, and thus, being able to have a wide range of applications due to their specificity. The objective of this work was to extract, purify, and characterize a lectin present in the extract of the microalgae *Chlorella vulgaris*, which was grown in Bold Basal Medium (BBM), autotrophically in 21-day cycles. The homogenized extract was obtained through sonication in an ice bath. The homogenate was centrifuged and the supernatant, called crude extract (CE), was used for purification. CE was precipitated by ammonium sulfate at 0-60% saturation, and the protein precipitate was dialyzed and subjected to coupled ion exchange chromatography on the ÄKTA Pure system. The hemagglutinating activity was evaluated against rabbit erythrocytes. The activity of the fraction was characterized about pH, temperature, and its stability for 30 min, inhibition of carbohydrates and glycoproteins. The activity of the fraction was optimal in the pH range of 4.0 - 5.0; and temperature between 30 and 60 °C, with relative thermal stability. The fraction was inhibited by D-Glucosamine. The protein fraction had an apparent molecular mass of 15 kDa, estimated by SDS-PAGE. The partially purified lectin in this study showed different results than lectins isolated from the same species of microalgae. Therefore, these differences may be related to the strains, the culture medium, and the cultivation temperature, among others. It is known that different strains of the same species of microalgae have heterogeneity in their bromatological results.

**Keywords:** hemagglutinating activity; chromatography; purification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatografia de troca iônica da fração 0-60% em coluna HiTrap DEAE FF acoplada ao sistema cromatográfico (ÄKTA). A coluna foi equilibrada em tampão TBS 20 mM pH 7,6. ....	25
Figura 2 - Eletroforese em Gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS dos picos P2 e P3 oriundos da cromatografia de troca iônica. ....	26
Figura 3 - Efeito da temperatura na estabilidade da atividade da fração P3. ....	30
Figura 4 - Efeito do pH na estabilidade da atividade da lectina. ....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante das Frações de <i>Chrorella vulgaris</i> contra eritrócitos de coelho.....	25
Tabela 2 - Tabela de purificação (Concentração de proteínas solúveis). ....	28

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Algas</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Microalgas</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>Gênero <i>Chlorella</i> e <i>C. vulgaris</i></b> .....	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Lectinas</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Cultivo de Microalgas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparação do Extrato Aquoso</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Precipitação de Proteínas do Extrato Aquoso com Sulfato de Amônio</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Obtenção da Fração Rica em Atividade Hemaglutinante</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Preparação dos Eritrócitos de Coelho</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6</b>	<b>Ensaio de Atividade Hemaglutinante</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7</b>	<b>Concentração de Proteína</b> .....	<b>22</b>
<b>3.8</b>	<b>Especificidade por Açúcares e Glicoproteína</b> .....	<b>22</b>
<b>3.9</b>	<b>Efeito da Temperatura e pH na Atividade Hemaglutinante</b> .....	<b>22</b>
<b>3.10</b>	<b>Estimativa da Massa Molecular</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Precipitação de Proteínas do Extrato Aquoso com Sulfato de Amônio</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Cromatografia de Troca Iônica</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Estimativa e Determinação da Massa Molecular</b> .....	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Sumário de Purificação de Proteína</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Especificidade de Açúcar e Glicoproteína</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Efeito da Temperatura e pH na Atividade Hemaglutinante da Fração P3</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas

As algas, organismos aquáticos autótrofos que desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, têm sido objeto de estudo devido à sua notável diversidade e importância ecológica (NAPOLEÃO; COSTA; ARAÚJO, 2022). As algas, geralmente unicelulares ou multicelulares, variam em tamanho desde microscópicas até macroscópicas, exibindo uma ampla gama de morfologias que se adaptaram às diferentes condições ambientais em que habitam. Sua morfologia única, que inclui células revestidas por paredes celulares de natureza variada, muitas vezes contém pigmentos fotossintéticos, permitindo-lhes converter a energia luminosa em compostos orgânicos, desempenhando assim um papel vital na produção primária dos ecossistemas aquáticos (PEREIRA, 2021).

As principais algas marinhas pertencem às divisões Cyanophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Dinophyta, entre outras:

As cianobactérias constituem algas de tonalidade azul-esverdeada, principalmente devido à presença da ficocianina, um pigmento azulado. Algumas dessas algas também exibem pigmentação vermelha, conhecida como ficoeritrina. Dependendo da predominância desses pigmentos, que colaboram na absorção da luz solar para a síntese de carboidratos, a cianobactéria pode adquirir coloração azulada ou avermelhada.

Chlorophyta, classificadas como algas verdes, possuem uma proporção relativamente pequena de espécies marinhas, sendo a maioria habitantes de ambientes aquáticos continentais de água doce. Muitas delas consistem em organismos unicelulares, embora existam representantes multicelulares encontrados em baías, estuários e costões rochosos. Elas contêm clorofila A e B e utilizam amido como reserva energética.

Rhodophyta, conhecidas como algas vermelhas, predominantemente habitam ambientes marinhos e possuem os pigmentos ficobilinas: ficocianina e ficoeritrina, além das clorofilas A e D, e reservam amido das florídeas. Exemplos de gêneros incluem: *Gelidium*, *Gracilaria*, *Gigartina*, *Porphyra*, *Rhodymenia* e *Chondrus*. Algumas espécies dessas algas produzem carbonato de cálcio, contribuindo significativamente para a formação dos recifes de corais.

Heterokontophyta, Bacillariophyceae, compreendem as diatomáceas, algas unicelulares que possuem um invólucro externo feito de sílica, chamado frústula. Nas

diatomáceas cêntricas, a frústula é arredondada com uma estrutura radial, enquanto algumas diatomáceas são chamadas de penadas devido à formação de uma estrutura semelhante a uma pena. Em relação à coloração, geralmente são amarelo-amarronzadas devido à presença de pigmentos carotenoides, além das clorofilas A e C. Elas podem apresentar espinhos na frústula, bem como pequenos orifícios que auxiliam na troca gasosa e na produção de mucilagem.

Heterokontophyta, Phaeophyceae, denominadas algas pardas ou marrons, além das clorofilas A e C, contêm o pigmento fucoxantina, conferindo-lhes uma coloração amarelo-amarronzada. Essas algas reservam laminarina e manitol como substâncias de reserva. A maioria das espécies é encontrada em ambientes marinhos, predominando em áreas temperadas e polares, mas também são encontradas em regiões tropicais, como o gênero *Sargassum*.

Dinophyta, representadas pelos dinoflagelados, são algas microscópicas que possuem dois flagelos: um vertical e outro horizontal. Enquanto o primeiro facilita a propulsão do dinoflagelado para frente, o segundo permite que ele gire em torno do próprio eixo. Suas pigmentações incluem clorofilas A e C, e suas reservas consistem em óleo e amido. As células são compostas por várias placas de celulose e podem apresentar espinhos e poros. Algumas dessas espécies são crucialmente importantes para o crescimento dos corais, como as zooxantelas (CASTRO; HUBER, 2016; LEE, 2008).

Entre as principais características morfológicas das macroalgas, a forma ou morfologia de um determinado talo (corpo de macroalga) é uma característica muito útil para distinguir as várias espécies de macroalgas. Além disso, diferentes espécies apresentam diferentes consistências ou texturas ao toque, auxiliando a distingui-las. (GASPAR; FONSECA; PEREIRA, 2020).

Além de suas contribuições ecossistêmicas, as algas também se destacam por seu potencial biotecnológico. Seu metabolismo diversificado oferece oportunidades para a produção de uma gama de produtos, desde biocombustíveis e produtos químicos até alimentos funcionais e compostos farmacêuticos (BIRIS-DORHOI *et al.*, 2020).

As algas têm múltiplas utilizações em diferentes campos industriais como resultado da sua rica composição química e conteúdo de substâncias bioativas. Diversos estudos na área da saúde humana vêm sido desenvolvidos, demonstrando aplicações como: controle da pressão arterial, ajuda na redução de açúcar e gordura, propriedades anticoagulantes e antitrombóticas, propriedades antienvhecimento, antidepressivas e

antifadiga, potencial antimicrobiano e antioxidante, efeito antialérgico, propriedade anti-inflamatória, efeitos antifúngicos, efeitos antivirais, além de propriedades anticâncer. (BHUYAR *et al.*, 2020; BIRIS-DORHOI *et al.*, 2020; CHALE-DZUL *et al.*, 2017; MURRAY *et al.*, 2018; PALANISAMY *et al.*, 2017; PIMENTEL *et al.*, 2019; PRARTHANA e MARUTHI, 2019; SAKTHIVEL e PANDIMA, 2019; TIAN *et al.*, 2019; YIMIN, 2018; ZHONG *et al.*, 2020)

A aplicação crescente da biotecnologia na exploração desses organismos tem o potencial de impulsionar avanços significativos em áreas como energia renovável, medicina e segurança alimentar, destacando sua importância contínua no cenário científico e tecnológico contemporâneo (PEREIRA, 2018).

## 1.2 Microalgas

As microalgas têm uma história antiga que deixou uma pegada há 3,4 bilhões de anos, quando a mais antiga microalga conhecida, pertencente ao grupo das cianobactérias, fossilizou nas rochas da Austrália Ocidental (SAFI *et al.*, 2014).

As microalgas podem crescer tanto em água doce como marinha, bem como em quase todas as condições ambientais do planeta, desde terras congeladas da Escandinávia até solos quentes do deserto do Saara (LEE, 2008).

O termo "microalgas" refere-se a microrganismos algais que contêm clorofila e outros pigmentos fotossintéticos. Os organismos procarióticos, também conhecidos como cianobactérias, e os organismos eucarióticos, também conhecidos como demais microalgas, são capazes de sobreviver em uma variedade de ambientes aquáticos e toleram condições extremas de temperatura, salinidade, pH e intensidade de luz (KHAN; SHIN; KIM, 2018). As microalgas são capazes de produzir uma variedade de biomoléculas com potencial bioativo devido à sua versatilidade metabólica (SINGH *et al.*, 2020).

A classificação das microalgas abrange uma heterogeneidade de táxons, nas quais se destacam os grupos das cianobactérias, dinoflagelados, diatomáceas, clorofíceas e rodófitas (*Cyanidium*), cada qual com características distintas que contribuem para a riqueza ecológica das águas doces e marinhas. As cianobactérias, por exemplo, demonstram habilidades únicas na fixação de nitrogênio e na produção de toxinas, influenciando a qualidade da água e a saúde dos ecossistemas. As diatomáceas, caracterizadas por suas complexas estruturas

celulares de sílica, desempenham um papel vital no ciclo global de carbono e são relevantes para a produção primária nos oceanos (CHAN *et al.*, 2021).

Devido à sua grande diversidade de espécies, a classificação taxonômica das algas é bastante extensa e inclui representantes de formas unicelulares com diâmetros que variam de micro a milímetros, células em colônia, filamentos até folhas e talos com diferenciações complexas. Cyanophyceae (azul-esverdeado), Rhodophyceae (vermelho), Phaeophyceae (marrom), Chrysophyceae (marrom dourado), Bacillariophyceae (diatomáceas), Chlorophyceae (verde) e Xanthophyceae (verde-amarelo) são algumas das classes principais em que as algas são classificadas por seu tipo de pigmento. A sistemática contemporânea mantém estes grandes grupos, mas usa uma classificação atualizada com base na análise de pigmento por cromatografia líquida, além de outras características, como flagelação, estrutura, componentes da parede celular e produtos de armazenamento metabólico. As técnicas de biologia molecular contemporânea têm sido usadas nos últimos anos para confirmar ou mudar a classificação de algas anteriores, tornando-se uma ferramenta promissora para explorar seus produtos (BEN-AMOTZ, 2009).

Cerca de 72.500 espécies de microalgas foram catalogadas. A classificação taxonômica atual divide essas espécies em 16 classes diferentes, com as algas verdes, as diatomáceas e as algas douradas sendo as mais comuns na natureza. Mas as cianobactérias, juntamente com as algas verdes e as diatomáceas, são as mais procuradas como insumos intermediários e produtos finais de processos relacionados à bioenergia, alimentação e farmacêuticos (BOROWITZKA, 2018).

As microalgas são responsáveis por aproximadamente metade da produção primária global (METTING, 1996). Muitas delas também são caracterizadas pelo seu rápido crescimento, flexibilidade e adaptabilidade a diversas condições ambientais. Sendo uma fonte tão rica de lipídios, aminoácidos essenciais, pigmentos, carboidratos, proteínas, vitaminas e outros compostos bioativos nas células, podendo ser amplamente aplicadas em diversas indústrias, como alimentação humana, alimentação aquática e pecuária, farmacêutica e cosmética (ARIEDE *et al.*, 2017; PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

Com relação ao sistema de cultivo, o crescimento autotrófico é a opção mais comum. No entanto, a grande variedade metabólica de um grande número destes microrganismos permite o cultivo em condições heterotróficas (WEN; CHEN, 2003; JEREOSIN; PUMAS, 2021). Em sistemas fotossintéticos, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é convertido em biomassa na presença de energia luminosa. Em configurações heterotróficas,

por outro lado, a produção de biomassa ocorre por meio da conversão de compostos orgânicos na ausência de luz (QUEIROZ *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos extraídos de macroalgas e utilizados como fonte de ficocolóides foram os primeiros produtos comerciais derivados de algas. Após a introdução de algas para uso humano no início do século XVII, o mercado global expandiu para fornecer uma variedade de produtos de algas para uma variedade de aplicações. No entanto, a tecnologia de cultivo e coleta de microalgas só foi desenvolvida no final do século passado, quando o uso delas entrou no mercado. Quatro espécies de microalgas (*Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Nannochloropsis*) atingiram o nível de produção em cultivo industrial usando tanques a céu aberto. Por outro lado, algumas espécies de microalgas unicelulares foram capazes de se expandir em sistemas de cultivo usando bioreatores fechados (BEN-AMOTZ, 2009).

O principal benefício do cultivo comercial das microalgas é a fabricação de seus produtos metabolitos, que são usados na alimentação de animais aquáticos e terrestres, como suplementos alimentares para humanos, ou para uso em processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização do solo, biocombustíveis e fitorremediação de resíduos (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Como qualquer outro fitoplâncton, as microalgas têm valor nutricional. O documento mais antigo na utilização do consumo de microalgas data de 1500 anos na China. (GAO *et al.*, 2020). Ainda hoje, esses organismos microscópicos são consumidos como suplementos alimentares, como é o caso de *Chlorella vulgaris*, *Spirulina máxima* e *S. platensis* e seus produtos também são utilizados para diversos fins, como corantes, produtos farmacêuticos, ração animal, aquicultura e cosméticos (FRADIQUE *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2019; ZAID; HAMMAD; SHARAF, 2015).

As espécies de *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) e *Chlorella* são as mais conhecidas no que diz respeito à saúde e à alimentação. Ambas são consideradas seguras para ingestão por humanos devido às suas riquezas nutricionais (BARKIA; SAARI, 2019; JACOB-LOPES *et al.*, 2019; KOYANDE *et al.*, 2019).

Por outro lado, esses microrganismos fornecem uma alternativa aos métodos tradicionais de tratamento de águas residuais, devido à sua alta eficiência na remoção de poluentes (QUEIROZ *et al.*, 2007). Eles também permitem a valorização de resíduos agroindustriais por meio da biossíntese de produtos de valor agregado (QUEIROZ *et al.*,

2002; JACOB-LOPES *et al.*, 2007, RODRIGUES *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2017).

A capacidade das microalgas de remover nutrientes de efluentes foi verificada em vários estudos (ANSARI *et al.*, 2019; LING *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2018; NOVOVESKÀ *et al.*, 2016). As espécies microalgas mais notáveis foram *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Os resultados mostraram uma eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo de *S. obliquus* de 98,54% e *C. sorokiniana* de 86,93% e 68,24%, respectivamente, e *C. vulgaris* de 89,1% e 80,9% (LI *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2016).

Além disso, devido ao potencial de ser uma matéria prima para biocombustível ecologicamente consciente, a produção de microalgas atraiu o interesse comercial devido a uma série de vantagens: não competem com outras culturas por terras produtivas e água doce; crescem rapidamente e produzem um alto teor de lipídeos (entre 20 e 50 por cento em peso seco); são capazes de fixar dióxido de carbono, o que resulta em uma redução nas emissões de gases de efeito estufa e em uma melhoria da qualidade do ar; podem ser usados como fertilizante agrícola e como fonte de proteína para rações animais (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010; CAI; PARK; LI, 2013).

Desse modo é possível verificar que as microalgas no geral contêm vários componentes que têm demonstrado grande potencial para serem utilizados em diversos campos de aplicações, como na saúde humana e na medicina. As propriedades terapêuticas das microalgas apresentam uma gama de aplicações como saúde cardiovascular, anticâncer, anti-inflamatória, anticoagulante, antiviral, antibacteriana, antifúngica e outras em produtos medicinais humanos (HASSAN *et al.*, 2022; VANEGAS; HERNÁNDEZ, 2018).

### 1.3 Gênero *Chlorella* e *C. vulgaris*

As microalgas do Gênero *Chlorella* são produzidas comercialmente em larga escala no Japão desde 1960, sua biomassa tem sido alvo de estudo em diversas áreas (MATOS, 2021). As condições de cultivo podem ser caracterizadas como: autotróficas, heterotróficas e mixotróficas, influenciando diretamente na composição de sua biomassa (SAFI *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Chlorella* são conhecidas como ricas em proteínas e contém ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais (ASSIS,

2012; ASSIS *et al.*, 2014). Esta, tem muitas características morfológicas, incluindo coloração esverdeada, unicelular ou colonial, forma cocóide com diâmetro de 2-10 um e é geralmente imóvel em ambientes de água doce, embora também possa estar em águas salobras. Acúmulo pigmentos como xantofilas, clorofilas a e b, betacarotenos e outros com apenas um cloroplasto (BEIJERINCK, 1890; SHIHIRA, KRAUSS, 1965; NURACHMAN *et al.*, 2015).

Esta microalga é um bom candidato para remover o amônio e o fósforo das águas residuais quando se trata de biorremediação (GONZÁLEZ, CAÑIZARES, BAENA, 1997). Além disso, pesquisas recentes mostraram que o extrato de *Chlorella spp.* é eficaz em eliminar larvas de *Aedes aegypti* (SIGAMANI *et al.*, 2020).

Além disso a espécie relacionada ao gênero *Chlorella*, *C. vulgaris* tem sido usada em aplicações biotecnológicas como um suplemento alimentar ou substância que adiciona cor e sabor aos alimentos (FRADIQUE *et al.*, 2010; LI, JIANG, CHEN, 2005). Também podar ser usada como emulsão alimentar (FERNANDES *et al.*, 2012). Além disso, tem características imunomoduladores e anticaspa, bem como tratamentos para hipertensão, doenças cardiovasculares e catarata. Também poda amentar a produção de colágeno na derme (YASUKAWA *et al.*, 1996; JUSTO, SILVA, QUEIROZ, 2001).

*C. vulgaris* é uma microalga que possui uma biomassa rica em diversos nutrientes como carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais, entre outros. Esta possui entre 42-58% de proteínas em seu peso seco, dependendo das condições de cultivo e crescimento (SAFI *et al.*, 2014).

A microalga *C. vulgaris* pertence ao reino Plantae, Filo Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae, Ordem Chlorellales, Família Chlorellaceae e gênero *Chlorella* (ALGAEBASE, 2022). A espécie possui amplo uso comercial devido ao seu rápido crescimento e capacidade de produzir uma série de compostos biologicamente ativos (HEYDARIZADEH *et al.*, 2013). Estudos anteriores se concentraram principalmente na manipulação das condições de cultura para aumentar a produção de metabólitos desejados e seu crescimento celular (CHEN *et al.*, 2017). Sintetiza um maior teor de proteínas quando cultivada em ambientes ricos em nitrogênio, de modo adverso quando esse é limitado reduz sua síntese proteica (MELO *et al.*, 2019).

Diversas aplicações com o uso de sua biomassa estão descritas na literatura, na pesquisa médica sendo utilizada para avaliações em atividade antimicrobiana, antitumoral, imunomoduladora, anti-hipertensiva e hepatoprotetora (KUBATKA *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2018; PANAHI *et al.*, 2015; QI; KIM, 2017; SYED *et al.*, 2015).

Em estudos, também relacionados à área médica, associam seus extratos à melhoria dos sintomas físicos e cognitivos da depressão, seu efeito na redução do impacto do stress no eixo hipotalâmico e a inibição de mediadores pró-inflamatórios (PANAHI *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2016; SIBI; RABINA, 2016).

Além dessas diversas aplicações biotecnológicas na área médica com sua biomassa, o cultivo também tem sido realizado objetivando a produção de biocombustíveis (PARICHEHREH *et al.*, 2019; SAKARIKA; KORNAROS, 2019).

#### **1.4 Lectinas**

Lectinas foram relatadas como sendo encontradas inicialmente em plantas, mas essas moléculas são encontradas em todas as classes e famílias de seres vivos, de bactérias e vírus a mamíferos (LIENER; SHARON; GOLDSTEIN, 1986).

A primeira definição do termo lectina foi proposta por Boyd e Shapleigh (1954) como proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoconjugados, embora Stillmark (1888) tenha sido o primeiro autor a relatar na literatura substâncias proteicas em plantas com atividade hemaglutinante.

A definição de lectinas vegetais mais utilizada é a proposta por Peumans e Van Damme (1995), que define essas moléculas como proteínas de origem não imune, contendo pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não ter outros tipos de sítios com domínios catalíticos.

Sampaio (1997) sugeriu, a partir da combinação de várias definições, que as lectinas são geralmente proteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados, exibindo atividade reversível de ligação não covalente com carboidratos e substâncias que os contêm, na forma livre em solução ou na superfície das células sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas.

No cenário da biologia molecular e bioquímica, as lectinas emergem como um grupo diversificado de proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos específicos, desempenhando papéis cruciais em uma variedade de processos biológicos e interações celulares (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998). Desde sua descoberta inicial, as lectinas têm sido objeto de um intenso escrutínio científico devido à sua relevância em campos que vão desde a pesquisa fundamental até aplicações clínicas e biotecnológicas.

As lectinas, possuindo a capacidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, são capazes de interagir com diversas moléculas de fluidos biológicos e receptores de superfície celular, atuando como decodificadores de informações trocadas entre moléculas, células e organismos, apresentando assim uma variedade de efeitos biológicos (SELL; COSTA, 2000).

As lectinas possuem diversas aplicações incluindo tipagem sanguínea, identificação de anticorpos e antígenos, reconhecimento de microrganismos patogênicos, elaboração de kits diagnósticos, atividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas (CAVALCANTI *et al.*, 2021; COELHO *et al.*, 2017).

O papel fisiológico das lectinas em algas, microalgas e cianobactérias também permanece desconhecido, alguns estudos apontam seu mecanismo interno de proteção da planta e a ação tóxica em predadores (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002). Segundo Hori *et al.*, (1996), vários relatos sugerem que os receptores de lectina na superfície de microalgas marinhas podem estar envolvidos no reconhecimento celular, adesão à superfície celular, simbiose com invertebrados marinhos ou outras algas e fagocitose de vírus e bactérias.

Além disso, entre as algas, as microalgas também abrigam um arsenal de lectinas com potencialidades diversas. A investigação das lectinas de microalgas revela suas implicações em processos biotecnológicos (CAVALCANTI *et al.*, 2021). A presença de lectinas em microalgas ressalta sua complexidade biológica e seu envolvimento em interações celulares e reconhecimento, não apenas entre as próprias microalgas, mas também em suas relações com outros organismos do ecossistema aquático (HORI *et al.*, 1996).

Diversas microalgas tem sido objeto de estudos preliminares quando a existência de lectinas, como no trabalho de Arekal e Savitha (2021), onde foram avaliadas a A.H. de 40 espécies e a afinidade por carboidratos e glicoproteínas de 15 dessas espécies.

Singh *et al.* (2018) avaliou 5 espécies de microalgas quanto a A.H e sua afinidade por carboidratos e glicoproteínas.

Em trabalho anterior, a lectina de *C. vulgaris* foi objeto de investigação quanto a sua aplicação biotecnológica em sua capacidade de combater larvas de *Aedes aegypti*. Outro estudo trata da aplicação de um gel cicatrizante à base de seu extrato purificado (ANDRADE *et al.*, 2021; CAVALCANTI *et al.*, 2021).

Esses trabalhos encontrados com a lectina de *C. vulgaris* apresentaram diferentes massas na análise por eletroforese, além de outras diferenças durante o processo de purificação e caracterização, como: concentração de sal para precipitação, afinidade por açúcar e glicoproteínas, pH ótimo, temperatura limite. A exemplo, no trabalho de Cavalcanti

*et al.* (2021) a lectina isolada apresentou massa de 17 kDa, por outra parte, na pesquisa de Andrade *et al.* (2021) apresentou massa de 36 kDa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Purificar a lectina presente nos extratos de *Chlorella vulgaris* (LABEC\_cv2019) e caracterizá-la bioquimicamente.

### 2.2 Objetivos Específicos

- i) Detectar e avaliar a atividade hemaglutinante de extratos de microalga, além de determinar a sua afinidade por carboidratos e glicoproteínas;
- ii) Purificar uma lectina de *Chlorella vulgaris* através de cromatografia líquida;
- iii) Estimar a massa molecular da lectina por meio de SDS-PAGE.
- iv) Avaliar sua estabilidade frente a de temperatura e pH.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo de Microalgas

A microalga *Chlorella vulgaris* (Cepa: LABEC\_cv2019) foi obtida da coleção de cultura do Laboratório de Bioecologia – LABEC, da Universidade Federal do Ceará – UFC, e cultivada em meio BBM (CAVALCANTI *et al.*, 2021), contendo em mg.L<sup>-1</sup>: NaNO<sub>3</sub>, 250; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 175; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 25; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 75; NaCl, 25; EDTA, 50; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 4,98; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 11,42; ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 8,82; NaMoO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,72; CoCl × 6H<sub>2</sub>O, 0,38; MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O, 1,44; CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, 1,57; tiamina, 10; biotina, 0,1; vitamina B12, 0,01. O pH foi ajustado em 6,8 em sistema de recirculação de 200 litros, a 25 °C e sob intensidade de luz contínua de 52 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após cada ciclo de 21 dias, o cultivo de microalgas foi centrifugado a 3500 rpm a 4 °C por 15 min, onde fora obtida a biomassa úmida. Sendo congelada e reservada para uso e análise posterior.

#### 3.2 Preparação do Extrato Aquoso

No Laboratório de Biotecnologia Marinha – BIOMAR/UFC, a biomassa foi suspensa em solução tamponada (100 mg.mL<sup>-1</sup>) de Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM, pH 7,6 (TBS) e submetida à homogeneização em agitador. A suspensão foi sonicada (200 W) em banho de gelo com ciclos de 30 segundos e 60 segundos de intervalo. Os extratos obtidos foram centrifugados a 9.000 xg por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes denominados extratos aquosos (EA) testados quanto à atividade hemaglutinante (A.H.).

#### 3.3 Precipitação de Proteínas do Extrato Aquoso com Sulfato de Amônio

O extrato aquoso foi precipitado por fracionamento em cinco etapas, 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100% (v/v) de saturação de sulfato de amônio. Adicionando-se lentamente sulfato de amônio sólido, mantendo agitação constante para permitir um aumento uniforme da concentração e assegurar um equilíbrio rápido. O precipitado de cada concentração foi dissolvido em tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM, pH 7,6 e dialisado contra água destilada e a última contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6.

### 3.4 Obtenção da fração rica em atividade hemaglutinante

A obtenção de uma fração rica em atividade hemaglutinante foi realizada segundo protocolo determinado por Cavalcanti *et al.* (2021) com modificações. As proteínas solúveis no extrato precipitado com atividade hemaglutinante foram concentradas e purificadas por cromatografia de troca iônica. A fração precipitada foi aplicada em uma coluna de troca iônica de HiTrap DEAE FF 1 mL acoplada a um cromatógrafo (ÄKTA pure). A matriz foi equilibrada com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,6) a uma taxa de fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os eluatos foram obtidos com o mesmo tampão e taxa de fluxo, usando um gradiente de NaCl (0-1 M) e frações de 1 mL foram coletadas e verificadas quanto à presença de proteínas medindo a absorbância a 280 nm (A280 nm) e posteriormente por atividade hemaglutinante.

### 3.5 Preparação dos Eritrócitos de Coelho

Os eritrócitos foram obtidos de amostras de sangue de coelho. Cada amostra de sangue foi lavada seis vezes com 10 volumes de solução salina (NaCl 150 mM). Após a lavagem, uma suspensão de eritrócitos a 3% (v/v) foi preparada em solução salina e utilizada como eritrócitos nativos. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes internacionalmente aceitas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUPA 2211202101).

### 3.6 Ensaio de Atividade Hemaglutinante

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo V, aplicando o método da dupla diluição seriada conforme descrito por Sampaio e colaboradores (1998), utilizando eritrócitos nativos. Primeiramente, foram adicionados 50 µL de tampão em cada poço e 50 µL do extrato ou da solução lectínica diluídas serialmente, e em seguida, 50 µL das suspensões de eritrócitos a 3%, previamente preparados. As placas foram deixadas em repouso por 1 hora a temperatura ambiente e o resultado observado macroscopicamente e expresso em título de hemaglutinação, Unidades de Hemaglutinação por mL (U.H.mL<sup>-1</sup>), definida como a quantidade de lectina capaz de aglutinar e precipitar eritrócitos em uma suspensão após 1 h.

### 3.7 Concentração de Proteína

A concentração de proteína nos extratos e frações foram determinadas pelo método de Bradford (1976) usando albumina sérica humana como padrão.

### 3.8 Especificidade por Açúcares e Glicoproteína

Para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizou-se placas de microtitulação de fundo V, onde foram adicionados em cada poço 50  $\mu\text{L}$  de TBS e 50  $\mu\text{L}$  da solução de açúcares (100 mM) e glicoproteínas (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), diluídos serialmente no mesmo tampão. Posteriormente foi adicionado a fração P3 com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a 4 U.H. $\text{mL}^{-1}$ . A placa foi mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente, um volume igual de suspensão de eritrócitos a 3% foram adicionados. Após 1 hora, as placas foram observadas e os resultados foram expressos em concentração mínima de inibidores capazes de impedir a hemaglutinação (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998).

Os seguintes açúcares e glicoproteínas foram usados no ensaio de inibição: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose,  $\alpha$ -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- $\alpha$ -D-glucosídeo, metil- $\alpha$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-tiogalactose, fenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, mucina submaxilar bovina (BSM) e mucina do estômago suíno (PSM) tipo II e tipo III (as mucinas foram adquiridas na Sigma Aldrich, lotes M3895 e M1778, respectivamente).

### 3.9 Efeito da Temperatura e pH na Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi realizada contra eritrócitos de coelho. O efeito da temperatura na lectina foi avaliado na faixa de 30 a 100  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Amostras incubadas a 25  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min foram usadas como controle e a porcentagem sobre a unidade de hemaglutinação a 25  $^{\circ}\text{C}$  foi considerada 100%.

O efeito do pH na atividade hemaglutinante foi avaliado em diferentes tampões (faixa de pH 4,0–10,0). O pH ótimo da lectina foi determinado pela incubação em diferentes tampões de pH 4,0–10,0 a 25 °C por 60 min. Os seguintes tampões (100 mM) foram usados: tampão citrato fosfato para pH 4,0–6,0, tampão Tris-HCl para pH 6,0–9,0 e tampão glicina-NaOH para pH 9,0–10,0. Todos os tampões continham NaCl 150 mM. Amostras incubadas com tampão (20 mM, pH 7,6) foram usadas como controle e a atividade hemaglutinante foi expressa em termos de porcentagem sobre a unidade de hemaglutinação por mL em comparação ao controle.

### 3.10 Estimativa da massa molecular

O grau de pureza e a massa molecular aparente da lectina, sob condição desnaturante, foram estimadas em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, poliacrilamida 15%), na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, seguido de coloração com Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970).

As amostras foram preparadas em tampão de amostra (Tris 80 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e SDS 2%) e aplicados 10  $\mu$ L em cada poço do gel. O sistema foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V, por 1 hora. Um marcador com proteínas de massas moleculares conhecidas, foi utilizado como padrão de referência para estimar a massa molecular aparente (Albumina Sérica Humana – HSA, 66 kDa; Lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; Lectina da *Chondrilla caribensis*, 15 kDa).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Precipitação de Proteínas do Extrato Aquoso com Sulfato de Amônio

A primeira etapa da purificação foi a precipitação em sulfato de amônia. O extrato bruto obtido foi submetido à precipitação em sulfato de amônia em cinco frações, com valores de saturação crescentes 0-100% para determinar em qual fração precipitada haveria maior concentração de atividade hemaglutinante. Foi observado que fração saturada de 0-60% apresentou atividade hemaglutinante (título  $2^5$ ), enquanto as frações 60-80% e 80-100% não apresentaram atividade.

Segundo Carvalho (2015), a precipitação de proteínas pode ser alcançada por vários métodos como: ácidos (ex.: ácido acético), solvente orgânico (ex.: acetona) ou sal (ex.: sulfato de amônia). A precipitação com sulfato de amônia é a mais amplamente usada como protocolo inicial devido principalmente seu baixo custo. Tal método de precipitação (*salting-out*) é baseado na camada de solvatação, devido à exclusão do cossolvente da camada de água, associada com a proteína por sua característica hidrofílica.

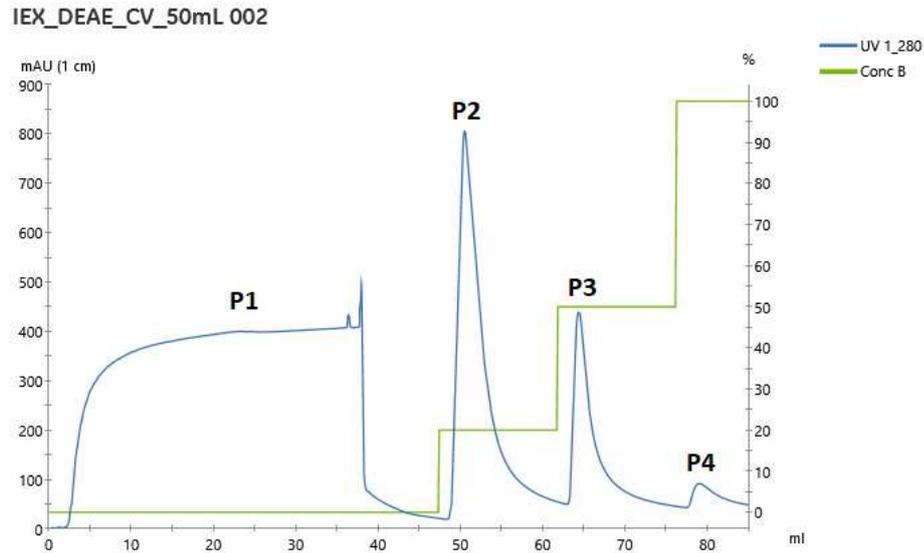
A precipitação por sulfato de amônio é uma técnica comumente utilizada na concentração e como passo preliminar na purificação de lectinas nas lectinas do gênero *Chrorella*. Andrade *et al.* (2022) analisando compostos bioativos de *C. vulgaris* (UTEX, 1803) obteve a maior concentração proteica na fração precipitada com 0-60% sulfato de amônio. De modo similar, a lectina da *C. pyrenoidosa* foi obtida por precipitação com 0-75% de sulfato de amônio (YI; PING; YANRU, 2003). Em contraste com outros resultados, Cavalcante e colaboradores (2021), durante a purificação da lectina de *C. vulgaris* (UTEX, 1803), observaram que a única fração que apresentou A.H. foi a 60-80% de sulfato de amônio. Em outra purificação, com *C. sorokiniana*, a fração com melhores resultados foi a com 60-70% (ROOPASHRI; DIVYASHREE; SAVITHA, 2023).

### 4.2 Cromatografia de Troca Iônica

A precipitação obtida com uma saturação de sulfato de amônia 0-60% foi submetida à diálise e então aplicada a uma coluna de cromatografia de troca iônica HiTrap DEAE FF 1 mL acoplada no ÄKTA pure™. O perfil de eluição da cromatografia é mostrado

na Figura 1, demonstrando 4 picos distintos, que foram dialisados e liofilizados. As frações foram analisadas posteriormente mediante SDS-PAGE e Atividade Hemaglutinante.

Figura 1 - Cromatografia de troca iônica da fração 0-60% em coluna HiTrap DEAE FF acoplada ao sistema cromatográfico (ÄKTA). A coluna foi equilibrada em tampão TBS 20 mM pH 7,6.



Fonte: Autor (2023).

Todos os picos apresentaram atividade hemaglutinante, sendo que P3 apresentou maior atividade (Tabela 1)

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante das Frações de *Chrorella vulgaris* contra eritrócitos de coelho.

Fração	Título
Extrato	$2^5$
F0/60	$2^5$
P1	$2^5$
P2	$2^3$
P3	$2^{24}$
P4	$2^4$

P(1-4): Picos obtidos a partir de cromatografia de troca iônica (ÄKTA), dialisados e liofilizados.

Fonte: Autor

No estudo aqui realizado, o maior título de A.H., encontrado no pico P3 da cromatografia, foi de  $2^{24}$ , evidenciando uma menor pureza e ou menor concentração da lectina de interesse em comparação com outros estudos com a mesma espécie.

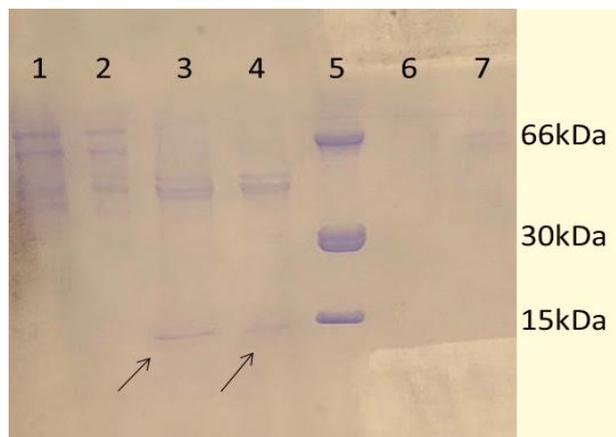
Cavalcanti *et al.* (2021) verificou que lectinas purificadas a partir da biomassa de *C. vulgaris* cultivada sob condições autotróficas apresentam A.H. > 2<sup>36</sup>. Do mesmo modo, Melo *et al.* (2019) encontrou A.H. > 2<sup>48</sup> no extrato de cultivo mixotrófico de *C. vulgaris*. Nota-se que as condições de cultivo também podem alterar de forma significativa a produção de alguns compostos/metabolitos nas microalgas, já que em comparação com os demais estudos, o realizado aqui obteve uma A.H. de apenas 2<sup>5</sup> em seu extrato.

A A.H. também pode ser afetada pelo dia de crescimento do cultivo, para Singh *et al.* (2018) o melhor dia de cultivo de *C. vulgaris* ficou entre o 17 e 22º dia, sendo esse o momento de colheita preferencial, onde se acumulará o máximo da lectina. Seu extrato apesar de obter apenas um título de 2<sup>5</sup> como resultado, as células não foram lisadas, de modo que apenas as lectinas presentes na parede extracelular estavam servindo de ligantes.

### 4.3 Estimativa e Determinação da Massa Molecular

Os picos P2 e P3 foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE na presença e ausência de β-mercaptoetanol (Figura 2).

Figura 2 - Eletroforese em Gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS dos picos P2 e P3 oriundos da cromatografia de troca iônica.



1. P2 sem 2-mercaptoetanol; 2. P2 com 2-mercaptoetanol; 3. P3 sem 2-mercaptoetanol; 4. P3 com 2-mercaptoetanol; 5. Marcadores: Albumina Sérica Humana – HSA, 66 kDa; Lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; Lectina da *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; 6. P4 sem 2-mercaptoetanol; 7. P4 com 2-mercaptoetanol.

Fonte: Autor (2023).

As frações P2 e P3 não se apresentaram homogêneas, sendo observadas diversas bandas entre 30 e 60 kDa. No entanto, no P3 também apresentou uma banda de massa aparente de 15 kDa, e em comparação dos dados obtidos com e sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, na qual não houve alteração da migração na presença de redutor, sugerindo que essa banda proteica não possui pontes dissulfeto intercadeia. No trabalho de Cavalcanti *et al.* (2021), a lectina de *C. vulgaris* apresentou um tamanho de 17 kDa mediante exclusão molecular. Em outro trabalho de diferentes autores, também com a lectina de *C. vulgaris*, encontraram uma lectina de 36 kDa na eletroforese, nesse a atividade hemaglutinante foi maior que  $2^3$  para eritrócitos humanos do tipo B (ANDRADE, *et al.* 2021).

A lectina estudada, apresentou relativa baixo peso molecular, 15kDa. Notadamente, algas, microalgas e cianobactérias, em comparação com lectinas de plantas terrestres e animais, possuem baixo peso molecular, como exemplo temos: *Chlorella sorokiniana* 40 kDa (AREKAL *et al.*, 2023), *Spirogyra spp.* 56 kDa (OLIVEIRA *et al.*, 2017), *Chlorella pyrenoidosa* 15 kDa (YI; PING; YANRU, 2003), as cianobactérias *Microcystis aeruginosa* 57 kDa (YAMAGUCHI *et al.*, 1998), *Microcystis viridis* 12,2 kDa (YAMAGUCHI *et al.*, 1999), *Oscillatoria agardhii* 13 kDa (SATO *et al.*, 2000) e *Scytonema varium* (9,7 kDa; BOKESCH *et al.*, 2003). A título de comparação, as lectinas típicas de leguminosas apresentam massa molecular de 25 a 30 kDa (KATOCH; TRIPATHI, 2021). Geralmente, as lectinas de macroalgas apresentam como característica uma baixa massa molecular em comparação com lectinas de plantas e animais, com tamanhos variando de 9 a 25 kDa (COSTA FILHO, 2024).

#### 4.4 Sumário de Purificação de Proteína

O extrato de *Chlorella vulgaris* aglutinou eritrócitos de coelho e apresentou um título de  $2^5$  e foi submetido para etapas de purificação como o fracionamento por sulfato de amônio 0-60% e dialisado. O pico P3 de *C. vulgaris* obtido pela purificação por cromatografia de troca iônica, com coluna HiTrap DEAE FF, revelou uma atividade de aglutinação de  $2^{24}$  (Tabela 2). Mesmo com um baixo rendimento de 0,31%, resultou em uma alta atividade específica (U.H/mg de proteína) sugerindo uma alta concentração da proteína de interesse.

Tabela 2 - Tabela de purificação (Concentração de proteínas solúveis).

	Volume (mL)	Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Proteína Total (mg)	Atividade Hemaglutinante (U.H./mL)	Atividade Específica (UH.mg <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Purificação (X)
Extrato	600	0,19	111,04	32	172,92	100%	1,00
F0/60	250	0,03	8,47	32	944,44	7,6%	5,50
P3DEAE	1	0,35	0,35	16.777.216	48.621.321,51	0,31%	281.181,00

Fonte: Autor.

De acordo com a Tabela 2, o extrato aquoso é onde se tem a maior quantidade de proteína total. Nota-se que já na primeira fase da purificação (F0/60) houve uma redução em mais de 90% da proteína total, mas a atividade específica por sua vez aumentou em mais de cinco vezes, evidenciando que a proteína de interesse estava sendo concentrada. Após a fase de cromatografia (P3DEAE) apenas 0,35 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína foi mantida, contudo a atividade hemaglutinante específica cresceu de modo exponencial, demonstrando que essa foi uma etapa sólida no processo de purificação da lectina. Apesar do rendimento final ser de apenas 0,31%, a purificação foi superior a  $2,81 \times 10^5$  vezes.

Em um trabalho diferente do escopo, relatando vegetais, contudo relatando processo de purificação de lectina. Na purificação da lectina de *Curcuma zedoaria*, a fração 20-60% de sulfato de amônio foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose que levou a um aumento de 3,3 vezes da atividade específica. Quando a fração Q1 de Q-Sepharose, foi submetida à próxima fase, com coluna de filtração em gel Superdex75, esta etapa levou a uma purificação de 8,7 vezes. Na terceira fase de purificação, quando a fração Q1s2-Superdex75 foi submetida a cromatografia HPLC de fase reversa em coluna C8, essa etapa levou a uma purificação de 77,0 vezes com aumento da atividade específica da lectina (TIPTHARA *et al.*, 2007).

De modo similar, mas apenas com duas fases na purificação da lectina de rizomas de *Curcuma longa*, o extrato homogeneizado de rizoma bruto foi submetido a precipitação com sulfato de amônio com saturação de 80% reduzindo o total de proteína em cerca de 3,5 vezes, mas aumentou ligeiramente a atividade específica da lectina em 3,7 vezes. A fase seguinte com cromatografia de afinidade em coluna Sepharose o aumento da atividade específica foi substancial, em 91,9 vezes (PETNUAL; SANGVANICH; KARNCHANATAT, 2010).

Já na purificação da lectina da alga *Vidalia obtusiloba* o tratamento do extrato bruto de com sulfato de amônio saturado a 0/60% levou a uma purificação de 4,5 vezes da

atividade específica da lectina. Quando a fração de sulfato de amônio 0/60% foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose, e posteriormente eluída com a adição de NaCl 0,5 M. Esta etapa levou a uma purificação de 16,5 vezes. Essas duas fases de purificação foram eficazes na eliminação de pigmentos e compostos de pequeno peso molecular e na concentração da lectina. Quando a fração DEAE foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna preenchida com goma de guar reticulada, toda a atividade hemaglutinante foi ligada ao gel e posteriormente eluída com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, contendo 0,15 M de NaCl. Essa etapa levou a uma purificação de 20,6 vezes com aumento da atividade específica da lectina. Demonstrando que passos adicionais puderam concentrar melhor a lectina e remover o material acompanhante (MELO *et al.*, 2004).

#### 4.5 Especificidade de Açúcar e Glicoproteína

Foram testados 36 açúcares diferentes, apenas a D-Glicosamina a 3,12 mM foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante. Cavalcanti *et al.* (2021) em seu trabalho com a lectina de *C. vulgaris* obteve inibição com monossacarídeos, onde nove deles resultaram positivos em afinidade: D-glucose, D-galactose, D-frutose, L-ramnose, D-Rafinose, D-Xilose, D-Lactose, D-Maltose, D-N-acetil-D-glucosamina.

Singh *et al.* (2018) testou 35 carboidratos contra o extrato de *C. vulgaris*, encontrando resultados positivos quanto a afinidade em 13 deles: L-Fucose; D-Galactose; D-Manitol; D-Lactose; D-Sacarose; ácido-D-Galacturônico; ácido neuramínico; ácido N-Glicolilneuramínico; N-Acetil-D-galactosamina; Fetuína; Asialofetuína; Mucina submaxilar bovina e de estômago suíno.

Em outro estudo com diversas microalgas, de 16 carboidratos testados, apenas D-frutose e L-estaquiase resultaram positivos em afinidade para hemaglutinina de *C. vulgaris* (AREKAL; SAVITHA, 2021).

Com a microalga *C. pyrenoidosa*, cinco glicoproteínas testadas mostraram efeitos inibitórios: c-globulina, asialofetuína, fetuína, mucina e manana de levedura, os demais carboidratos testados não inibiram (CHU; HUANG; LING, 2006).

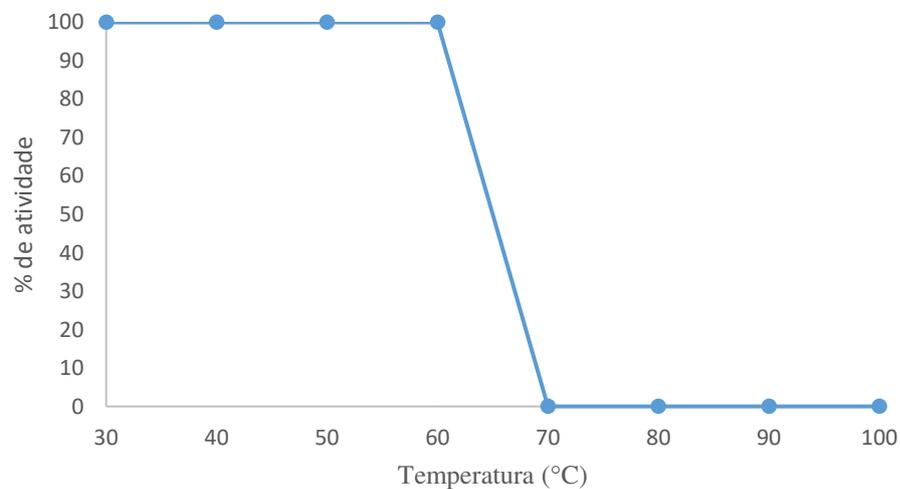
Para Singh e Walia (2018) um dos fatores que pode afetar a especificidade de ligação aos carboidratos é a alteração do valor do pH, por afetar a ionização dos resíduos de aminoácidos na molécula da proteína. Em conjunto, os dados de inibição apontam para uma

diversidade de especificidade das lectinas presentes nos extratos do gênero *Chrorella*, sugerindo a existência de diferentes lectinas.

#### 4.6 Efeito da Temperatura e pH na Atividade Hemaglutinante da Fração P3

A atividade da fração P3 foi testada quanto a temperatura. A A.H. nas temperaturas de 30 a 60 °C se manteve constante, perdendo atividade a partir dos 70 °C (Figura 3).

Figura 3 - Efeito da temperatura na estabilidade da atividade da fração P3.



Fonte: Autor.

No estudo de Cavalcanti *et al.* (2021) a lectina de *C. vulgaris*, manteve a A.H. até os 50 °C por 90 minutos, a 60 °C por 60 minutos reduziu sua atividade em 50% e aos 70 °C foi abolida completamente após 30 minutos.

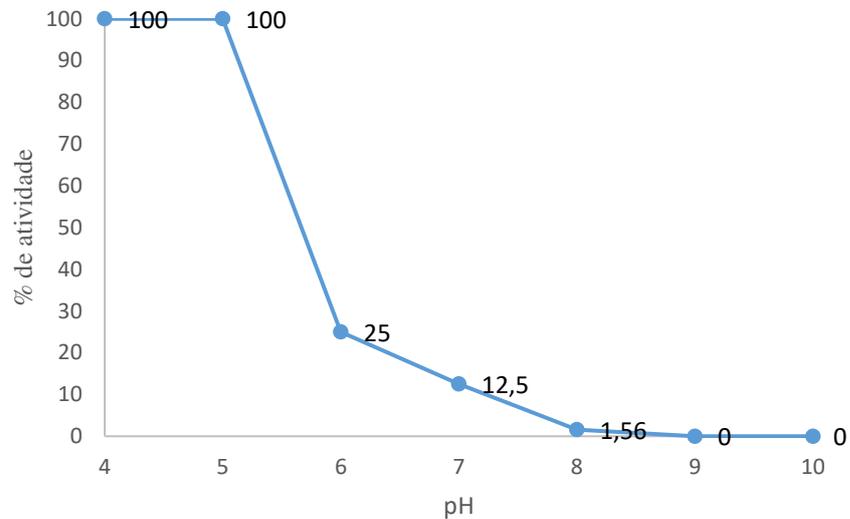
A lectina de *Tetradismus obliquus* apresentou atividade ótima em temperatura entre 20 e 50 °C, também não foi afetada pela exposição à temperatura de 50 °C por 90 min, mas diminuiu rapidamente, atingindo 6,25% do valor controle, quando aquecida a 60 °C por 30 min e foi totalmente abolida quando a lectina foi aquecida a 70 °C por 30 min (SILVA *et al.*, 2020).

De modo diferente, a lectina da *Chlorella pyrenoidosa* (15 kDa) foi tolerante a alta temperatura e sua atividade pôde ser mantida quando aquecida a 90 °C por 10 min (YI; PING; YANRU, 2003). Lectinas com baixa massa molecular são mais termoestáveis devido a

sua estrutura tridimensional e presença de cisteínas formando ligações dissulfeto (NAGANO *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Quanto ao pH, na faixa de 4 a 5 a A.H. de da fração P3 se manteve, sendo considerado a faixa ótima. A partir do pH 6 a atividade relativa diminuiu abaixo de 50%, resultando nos pH 6, 7 e 8 com percentuais de atividade remanescentes de 25,0; 12,5; e 1,56% respectivamente, abolindo a atividade completamente a partir do pH 9 (Figura 4).

Figura 4 - Efeito do pH na estabilidade da atividade da lectina.



Fonte: Autor.

No estudo de Cavalcanti *et al.* (2021) a lectina de *C. vulgaris* manteve a A.H. no pH entre 4,0 e 9,0, perdendo completamente a atividade a partir do pH 10,0.

Diferente do encontrado com a fração estudada aqui, que seu pH ótimo se encontrou totalmente no perfil ácido, a lectina purificada de *T. obliquus* mostrou melhor A.H. no pH entre 7,0–7,5 (SILVA *et al.*, 2020). Do mesmo modo a lectina de *Chlorella sorokiniana* demonstrou um pH ótimo em 7,0 e 8,0, ambas indicando uma tendência neutro-alcalina (AREKAL *et al.*, 2023).

Extremos de pH podem alterar a estrutura original da lectina devido a mudanças no estado de ionização de resíduos de aminoácidos, o que pode levar a desnaturação da lectina, desse modo ocorrendo a redução ou perda da A.H.

## 5 CONCLUSÃO

A lectina presente na microalga foi parcialmente purificada, precipitando com 0-60% de concentração de sulfato de amônio, sua A.H. alcançou título de  $2^{24}$ , mostrou afinidade a D-Glicosamina, ótimo pH entre 4-5 e estabilidade térmica à 60 °C. Os dados obtidos com a lectina parcialmente purificada a partir da cepa (LABEC\_cv2019) de *Chrorella vulgaris*, apresentam diferenças bioquímicas de outras lectinas estudadas de diferentes cepas de *C. vulgaris* (ex. UTEX 1803) como a especificidade, estabilidade frente a pH e temperatura, evidenciando que pode existir expressão diferenciada tanto por conta de serem cepas heterólogas como também possivelmente quanto as diferentes condições de cultivo.

Outros passos cromatográficos de refinamento, como a de exclusão molecular, poderiam teoricamente melhorar a purificação. Percebe-se que *C. vulgaris* é uma das microalgas que pode se tornar fonte natural de produção de lectinas ou de outro metabólito de interesse. Ademais, estudar variações entre os métodos de purificação de suas proteínas pode auxiliar na obtenção de um melhor rendimento e pureza da lectina presente.

## REFERÊNCIAS

- ALGAEBASE. *Chlorella vulgaris* (BEIJERINCK, 1890). 2022. Disponível em: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=27676](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676). Acesso em: 12 maio 2022.
- ANDRADE, A.; EGITO, M.; VILELA, W.; ROMERO COSTA, R.; NETO, P.; SILVA, R.; PORTO, A.; BEZERRA, R. Wound Healing Gel Based on *Chlorella vulgaris* Extract Characterization. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, Amsterdam, v. 12, p. 4463-4475, 2021.
- ANSARI, A.; RAVINDRAN, B.; GUPTA, S.K.; NARS, M.; RAWAT, I.; BUX, F. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 240, p. 293-302, 2019.
- AREKAL, N.R.; SAVITHA, J. Screening of freshwater microalgae species for occurrence of lectins and their carbohydratebinding specificity, **Journal of Applied Biological Sciences**, Wuhan, v. 16, n. 1, p. 24-34, 2021.
- AREKAL, N.R.; SAVITHA, J.; KUMAR, A.; GUNASHREE, B.S.; DIVYASHREE, M.S. **Structural and functional analysis of a novel galactose-binding lectin derived from *Chlorella sorokiniana* MW769776**. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2023.2274519> Acesso em: 01 dezembro 2023.
- ARIEDE, M.B.; CANDIDO, T.M.; JACOME, A.L.M.; VELASCO, M.V.R.; DE CARVALHO, J.C.M.; BABY, A.R. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, Amsterdam, v. 25, p. 483–487. 2017.
- ASSIS, L. M.; MACHADO, A. R.; MOTTA, A. S.; COSTA, J. A.V.; SOARES, L.A.S. Development and characterization of nanovesicles containing phenolic compounds of microalgae *Spirulina* strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa*. **Advances in Materials Physics and Chemistry**, Wuhan, v. 4, n. 1, p. 6-12, 2014.
- ASSIS, L.M. **Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas**. 2012. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- BARKIA, I.; SAARI, N. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. **Marine Drugs**, Basileia, v. 17, n.5, p. 304, 2019.
- BEIJERINCK, M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, Washington, v. 47, p. 725-739, 1890.
- BEN-AMORTZ, A. **Bioactive compounds: Glycerol Production, Fatty Acids Production**. In: BEN-AMORTZ, A.; POLLE, J.E.W.; RAO, D.V.S. The Alga *Dunaliella*: Biodiversity,

physiology, genomics and biotechnology. 1st ed. Science Publishers, cap. 8, p. 189-190, 2009.

BHUYAR, P.; RAHIM, M.H.; SUNDARARAJU, S.; MANIAM, G.P.; GOVINDAN, N. Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. **Global Journal of Environmental Science and Management**, Orange, v. 6, p. 47–58. 2020.

BIRIS-DORHOI, E.S.; MICHIU, D.; POP, C.R.; ROTAR, A.M.; TOFANA, M.; POP, O.L.; SOCACI, S.A.; FARCAS, A.C. Macroalgae - Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. **Nutrients**, Basileia, v. 12, n. 10, p.3085, 2020.

BOKESCH, H.R.; O'KEEFE, B.R.; MCKEE, T.C.; PANNELL, L.K.; PATTERSON, G.M.; GARDELLA, R.S.; SOWDER, R.C. 2nd.; TURPIN, J.; WATSON, K.; BUCKHEIT, R.W. Jr.; BOYD, M.R. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, Washington, v. 42, p. 2578–2584, 2003.

BOROWITZKA, M. A. **Microalgae in medicine and human health: a historical perspective**. In: Levine, I., & Fleurence, J., (eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Academic Press, p. 195-210, Cambridge. 2018.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of bood group antigens suggested by tests with lectins. **Plant Physiology**, Oxford, v.36, p.209-234, 1954.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAI, T.; PARK, S.Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 360-369, 2013.

CARVALHO, Kamilla Alves. **Avaliação do uso de sais na precipitação de uma proteína empregada como agente antiviral**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

CASTRO, P.; HUBER, M. R. **Capítulo 5: The Microbial World**. Em: CASTRO, P.; HUBER, M. R. *Marine Biology*. 10. ed. New York: Mc Graw Hill, v. 10, p. 88-97, 2016.

CASTRO, P.; HUBER, M. R. **Capítulo 6: Multicellular Primary Producers: Seaweeds and Plants**. Em: CASTRO, P.; HUBER, M. R. *Marine Biology*. 10. ed. New York: Mc Graw Hill, v. 10, p. 104-107, 2016b.

CAVALCANTI, V.L.R.; BRANDÃO-COSTA, R.M.P.; PONTUAL, E.V.; ANDRADE, A.F.; ALVES, L.C.; PORTO, A.L.F.; BEZERRA, R.P. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. **Algal Research**, Amsterdam, v.56, p.102290-102296, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926421001090>. Acesso em: 12 maio 2022.

CHALE-DZUL, J.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D.; MOO-PUC, R. Protective effect of fucoidans from tropical seaweeds against oxidative stress in HepG2 cells. **Journal of Applied Phycology**, Washington, v. 29, p. 2229–2238, 2017.

CHAN, W.Y.; OAKESHOTT, J.G.; BUERGER, P.; EDWARDS, O.R.; VAN OPPEN, M.J.H. Adaptive responses of free-living and symbiotic microalgae to simulated future ocean conditions. **Global Change Biology**, New Jersey, v. 27, p. 1737-1754, 2021.

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M.A.; CHANG, J.S.; BAI, F.; ZHAO, F. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

CHU, C.Y.; HUANG, R.; LING, L.P. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 967-973, 2006.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, P.M.S. LIMA, V.K.M.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEAO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins, Interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 1, p. 1594074-1594096, 2017.

COSTA FILHO, Manoel Ferreira da. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antimicrobiano em associação com antibióticos da lectina CiL-2 de *Codium isthmocladum*, novo membro das lectinas do Tipo-H.** 2024. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

FERNANDES, A.S.; NOGARA, G.P.; MENEZES, C.R.; CICHOSKI, A.J.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Identification of chlorophyll molecules with peroxy radical scavenger capacity in microalgae *Phormidium autumnale* using ultrasound-assisted extraction. **Food Research International**, Ottawa, v. 99, p. 1036–1041, 2017.

FERNANDES, B.; DRAGONE, G.; ABREU, A.; GEADA, P.; TEIXEIRA, J.; VICENTE, A. Starch determination in *Chlorella vulgaris*—a comparison between acid and enzymatic methods. **Journal of applied phycology**, Washington, v. 24, n. 5, p. 1203-1208, 2012.

FRADIQUE, M.; BATISTA, A.P.; NUNES, M.C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N.M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 90, p. 1656-1664, 2010.

GAO, F.Z.; GE, B.S.; XIANG, W.Z.; QIN, S. Development of microalgal industries in the past 60 years due to biotechnological research in China: A review. **Scientia Sinica Vitae**, Beijing, v. 51, p. 26–39, 2020.

GASPAR, R.; FONSECA, R.; PEREIRA, L. **Illustrated Guide to the Macroalgae of Buarcos Bay**, Figueira da Foz, Portugal. Coimbra, Portugal: MARE UC, DCV, FCT, 2020.

GONZÁLEZ, L.E.; CANIZARES, R.O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 259-262, 1997.

GUPTA, S.K.; ANSARI, F.A.; SHRIWASTAV, A.; SAHOO, N.K.; RAWAT, I.; BUX, F. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 115, p. 255-264, 2016.

HAN, L.; PEI, H.; HU, W.; HAN, F. SONG, M.; ZHANG, S. Nutrient removal and lipid accumulation properties of newly isolated microalgal strains. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 165, p. 38-41, 2014.

HASSAN, S.; MEENATCHI, R.; PACHILLU K; BANSAL S.; BRINDANGNANAM P.; AROCKIARAJ J.; KIRAN, G.S.; SELVIN, J. Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 62, p. 999–1029, 2022.

HEYDARIZADEH, P.; POIRIER, I.; LOIZEAU, D.; ULMANN, L.; MIMOUNI, V.; SCHOEFS, B.; BERTRAND, M. Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, p. 3425–3471, 2013.

HORI, K.; OGATA, T.; KAMIYA, H.; MIMURO, M. Lectin-like and lectin receptors in marine microalgae hemagglutination and reactivity with purified lectins. **Journal of Phycology**, New York City, v. 32 p. 783–790, 1996.

JACOB-LOPES, E.; MARONEZE, M.M.; DEPRÁ, M.C.; SARTORI, R.B.; DIAS, R.R.; ZEPKA, L.Q. Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 25, p. 1–7, 2019.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q; PINTO. A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thinlayer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, Amsterdam, v. 46, p. 63–69, 2007.

JEREOSIN, S.; PUMAS, C. Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, London, v. 9, p. 1–19, 2021.

JUSTO, G.Z; SILVA, M.R; QUEIROZ, M.L. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, London, v. 23, n. 1, p. 119-132, 2001.

KATOCH, R.; TRIPATHI, A. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, Amsterdam, v. 46, p. 104, 2021.

KHAN, M.I.; SHIN, J.H.; KIM, J.D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, London, v. 17(1), p. 1–21, 2018.

- KOYANDE, A.K.; CHEW, K.W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D.T.; SHOW, P.L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, Amsterdam, v. 8(1), p. 16–24, 2019.
- KUBATKA, P.; KAPINOV, A.; KRU-ZLIAK, P.; KELLO, M.; DESANKA V.; KAJO K.; et al. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. **Nutrition**, Amsterdam, v. 31, p. 560–569, 2015.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, R.E. **Phycology**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, England, 2008.
- LI, H-B.; JIANG, Y.; CHEN, F. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1070-1072, 2002.
- LI, Y.; CHEN, U.; CHEN, P.; MIM, M.; ZHOU, W.G.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, p. 5138-5144, 2011.
- LIENER, I.E; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. Cambridge: Cambridge University Press, England, 1986.
- LIN, Y.H.; CHEN, G.W.; YEH, C.H.; SONG, H.; TSAI, J.S. Purification and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides and the Antihypertensive Effect of *Chlorella sorokiniana* Protein Hydrolysates. **Nutrients**, Basiléia, v. 10, p. 1-14, 2018.
- LING, Y.; SUN, L.; WANG, S.; LIN, C.S.K.; ZHOU, Z. Cultivation of oleaginous microalga *Scenedesmus obliquus* coupled with wastewater treatment for enhanced biomass and lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 148, p. 162-169, 2019.
- MATOS, A.P. Avanços na Pesquisa de Microalgas no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia**, v.64, e.21200531, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200531>. Acesso em: 05 março 2024.
- MELO, F.R.; BENEVIDES, N.M.B.; PEREIRA, M.G.; HOLANDA, M.L.; MENDES, F.N. P.; OLIVEIRA, S.E.M.; FREITAS, A.L.P.; SILVA, L.M.C.M. Purificação e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Brazilian Journal of Botany**, Amsterdam, v.27(2), p.263–269, 2004.
- MELO, R.G.; ANDRADE, A.F.; BEZERRA, R.P.; VIANA MARQUES, D.A.; SILVA, V.A.; PAZ, S.T.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. **Journal of Applied Phycology**, Washington, v.31, p.3653-3663, 2019.

- METTING, F. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 477–489, 1996.
- MURRAY, M.; DORDEVIC, A.L.; RYAN, L.; BONHAM, M.P. An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: Marine algal polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Oxford, v. 58, p. 1342–1358, 2018.
- NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; BLOCH, C.JR.; PRATES, M.V.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; TAVARES, T.D.; NASCIMENTO, K.S.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein & Peptide Letters**, Brisbane, v. 9, p. 159–165, 2002.
- NAPOLEÃO, P.C.R.; COSTA, A. G.; ARAÚJO, M. P. M. Importância ambiental, ecológica e econômica das microalgas: uma sequência didática para o ensino médio. **Revista Brasileira de Educação Ambiental**, São Paulo, v. 17, p. 275-297, 2022.
- NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; NUNES, E.V.; RODRIGUES, G.V.; CALVETE, J.J.; SAKER, S.; SAMPAIO, W.R.L.; FARIAS, S.A.H. Isolation and characterization of a new agglutinin from red marine alga *Hypnea cervicornis* J Agardh. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 84, p. 49-54, 2006.
- NOVOVESKÁ, L.; ZAPATA, A.K.M.; Zabolotney, J.B.; ATWOOD, M.C.; SUNDSTROM, E.R. Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors. **Algal Research**, Amsterdam, v. 18, p. 86-94, 2016.
- NURACHMAN, Z.; HARTINI, H.; RAHMANYAH, W. R.; KURNIA, D.; HIDAYAT, R.; PRIJAMBOEDI, B.; SUENDOC, V.; RATNANINGSIH, E.; PANGGABEAN, L.M.G.; NURBAITI, S. Tropical marine *Chlorella sp.* PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **Algal Research**, Amsterdam, v. 10, p. 25–32, 2015.
- OLIVEIRA, A.S.; LÓSSIO, C.F.; RANGEL, A.J.; MARTINS, M.G.Q.; NASCIMENTO, F.E.P.; ANDRADE, M.L.L.; CAVADA, B.S.; LACERDA, S.R.; NASCIMENTO, K.S. Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra spp.* **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2113–2117, 2017.
- PALANISAMY, S.; VINOSHA, M.; MARUDHUPANDI, T.; RAJASEKAR, P.; PRABHU, N.M. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 102, p. 405–412, 2017.
- PANAHI, Y; BADELI, R.; KARAMI, G.R.; *et al.* A randomized controlled trial of 6-week *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with major depressive disorder. **Complementary Therapies in Medicine**, Amsterdam, v. 23, p. 598–602, 2015.
- PARICHEHREH, R.; GHESHLAGHI, R.; MAHDAVI, M.A.; ELKAMEL, A. Optimization of lipid production in *Chlorella vulgaris* for biodiesel production using flux balance analysis. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 141, p. 131–145, 2019.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M.; DE BASHAN, L. E. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolismo and potencial products. **Water Research**, London, v. 45, p. 11-36, 2011.

PETNUAL, P.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. A Lectin from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.) and Its Antifungal, Antibacterial, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. **Food Science and Biotechnology**, Amsterdam, v. 19(4), p. 907-916, 2010.

PEREIRA L. Macroalgae. **Encyclopedia**. Basel, v. 1, p. 177-188. 2021.

PEREIRA, L. **Therapeutic and Nutritional Uses of Algae**. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, 2018.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.N. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Oxford, v. 109, p. 347-352, 1995.

PIMENTEL, F.B.; ALVES, R.C.; HARNEDY, P.A.; FITZGERALD, R.J.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Macroalgal-derived protein hydrolysates and bioactive peptides: Enzymatic release and potential health enhancing properties. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 93, p. 106–124, 2019.

POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F. As multiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire - Journal of the Brazilian of Society and Food Nutrition**, Amsterdam, v. 24, p. 135-156, 2002.

PRARTHANA, J.; MARUTHI, K.R. Fresh water algae as a potential source of bioactive compounds for aquaculture and significance of solvent system in extraction of antimicrobials. **Asian Journal of Scientific Research**, Dubai, v. 12, p. 18–28, 2019.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **Journal of algal biomass utilization**, Paris, v. 3, p. 89–100, 2012.

QI, J; KIM, S.M. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 95, p. 106-114, 2017.

QUEIROZ, J.S.; BLASCOA, I.M.; GAGLIANO, H.; et al. *Chlorella vulgaris* reduces the impact of stress on hypothalamic–pituitary–adrenal axis and brain c-fos expression. **Psychoneuroendocrinology**, Amsterdam, v. 65, p. 1–8, 2016.

QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 2163–2169, 2007.

QUEIROZ, M.I.; BASTOS, R.G.; BENERI, R.V.; ALMEIDA, R.V. Evaluación Del crecimiento de la *Aphanothece microscopica* Nägeli en las aguas residuales de la parbolizacion del arroz. **Revista información Tecnológica**, La Serena, v. 1, p. 61–65, 2002.

RODRIGUES, D.B.; FLORES, É.M.M.; BARIN, J.S.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, Ottawa, v. 65, p. 144–148, 2014.

ROOPASHRI, A.N.; DIVYASHREE, M.S.; SAVITHA, J. High-sensitivity profiling of glycoproteins from ovarian cancer sera using lectin-affinity and LC-ESI-Q-TOF-MS/MS. **Current Research in Biotechnology**. Amsterdam, v. 5, p. 100122, 2023.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 58-64, 2010.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAKARIKA, M.; KORNAROS, M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 273, p. 237–243, 2019.

SAKTHIVEL, R.; PANDIMA, D.K. **Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer potential of natural bioactive compounds from seaweeds**. In: Bioactive Natural Products. Rahman, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, v. 63, p. 113-160, 2019.

SAMPAIO, A.H. **Lectins from Ulva and Ptilota species**. 1997. 91 f. Thesis (Doctorate in Biomedical Sciences) - University of Portsmouth, Inglaterra, 1997.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J.A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SANTOS, A.B.; FERNANDES, A.S.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Biogenesis of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor. **Journal of Applied Phycology**, Washington, v. 28(2), p. 1561–1570, 2016.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, Amsterdam, v. 125, p. 169–177, 2000.

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

SHIHIRA, I.; KRAUSS, R. W. **Chlorella**: physiology and taxonomy of forty-one isolates, p. 97, Maryland: University of Maryland, College Park, 1965.

SIBI, G.; RABINA, S. Inhibition of Pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella Vulgaris* extracts. **Pharmacognosy Research**, Mumbai, v. 8, n. 2, p. 118-122, 2016.

SIGAMANI, S.; CHINNASAMY, R.; DHARMARAJ, R.K.; RAMAMURTHY, D.; DEVARAJAN, N.; NARAYANASAMY, M.; NATARAJAN, H. Larvicidal potency of the extracts from *Chlorella sp.* against *Aedes aegypti*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, p. 101663, 2020.

SILVA, A.J.; CAVALCANTI, V.L.R.; PORTO, A.L.F.; GAMA, W.A.; BRANDÃO-COSTA, R.M.P.; BEZERRA, R.P. The green microalgae *Tetradasmus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. **Journal of Applied Phycology**, Washington, v. 32, p. 103-110, 2020.

SINGH, R.S.; WALIA, A.K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of Applied Phycology**, Washington, v. 30, p. 1833–1858, 2018.

SINGH, R.S.; WALIA, A.K.; KAUR, J.; SINGH, D.P.; RAJPUT, A. New cell surface bound lectins with complex carbohydrate specificity from members of green algae. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 56, p. 484-492, 2018.

SINGH, S.K.; KAUR, R.; BANSAL, A.; KAPUR, S.; SUNDARAM, S. Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds. In: Verma, M., & Chandel, A., **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**, Amsterdam, p. 221–259, 2020.

STILLMARK, P.H. **Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen.** 1888. 125 f. Thesis (Doctos der Medicin) - University of Dorpat, Dorpat, Estonia, 1888.

SYED, S.; ARASU A.; PONNUSWAMY I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, [s.l.], v. 7, p. 185-190, 2015.

TANG, C.; TIAN, Y.; HE, Z.; ZUO, W.; ZHANG J. Performance and mechanism of a novel algal-bacterial symbiosis system based on sequencing batch suspended biofilm reactor treating domestic wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 265, p. 422-431, 2018.

TIAN, T.; CHANG, H.; HE, K.; NI, Y.; LI, C.; HOU, M.; CHEN, L.; XU, Z.; CHEN, B.; JI, M. Fucoïdan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 75, p. 105823, 2019.

TIPTHARA, P.; SANGVANICH, P.; MACTH, M.; PETSOM, A. Mannose-Binding Lectin from *Curcuma zedoaria* Rosc. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 50(2), p. 167-173, 2007.

VANEGAS, J; HERNÁNDEZ, L.H., **Potencial biotecnológico de las microalgas zonas áridas.** Bogotá, Colômbia: Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, 2018.

WEN, Z.Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 21(4), p. 273–294, 2003.

YAMAGUCHI, M.; JIMBO, M.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, Amsterdam, v. 119, p. 593–597, 1998.

YAMAGUCHI, M.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIO, Y.; JIMBO, M.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 265, p. 703–708, 1999.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 19, n. 4, p. 573-576, 1996.

YI, Z.; PING, Y.; YANRU, L. Purification and partial characterization of *Chlorella pyrenoidosa* lectin. **Acta Hydrobiologica Sinica**, Beijing, v. 27, p. 36–40, 2003.

YIMIN, Q. **Health benefits of bioactive seaweed substances. In Bioactive Seaweeds for Food Applications**, 1st ed.; Quin, Y., Ed.; Academic Press: London, UK, p. 180-199, 2018.

ZAID, A.A.; HAMMAD, D.M.; SHARAF, E.M. Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. **International Journal of Pharmacology**, Dubai, v. 11, p. 846–851, 2015.

ZHONG, R.; WAN, X.; WANG, D.; ZHAO, C.; LIU, D.; GAO, L.; WANG, M.; WU, C.; NABAVID, S.M.; DAGLIA, M. Polysaccharides from marine Enteromorpha: Structure and function. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 99, p. 11–20, 2020.