



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ALDENI JOSÉ DA SILVA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS OBTIDAS DE
***Scenedesmus* sp. (= *Tetrademus obliquus*)**

RECIFE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIA ANIMAL

ALDENI JOSÉ DA SILVA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS OBTIDAS DE

Scenedesmus sp. (=Tetradesmus obliquus)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra.

Co-orientador:
Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

RECIFE, 2019

ALDENI JOSÉ DA SILVA

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra – Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof^a. Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento
Centro Universitário São Miguel (UNISÃO MIGUEL)

Prof.Dr. Emmanuel Viana Pontual
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr^a Karla Melo Ferreira da Silva
UNINASSAU

DEDICATÓRIA

“A minha mãe Iraci da Silva, por tudo que me ensinou e proporcionou em minha vida. Mesmo em pouco tempo recebi todo amor que uma mãe pode oferecer. Com ela aprendi que a humildade abre portas e o amor derruba barreiras (*in memoriam*)”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo seu amor, sem ele nada seria possível.

A toda minha família em especial minhas filhas Sara e Débora, pelo incansável apoio nos momentos, mais difíceis me acolheu e me conduziu ao êxito.

A Professora Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela acolhida e gentileza, sempre com sorriso no rosto mostrando que tudo é possível.

A minha Orientadora Professora Dr^a Raquel Pedrosa, pela paciência, colaboração e respeito. Mesmo diante das minhas dificuldades me orientou de forma amável sua ajuda foi fundamental.

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, pela oportunidade de aprender todos os dias com sua experiência, capacidade e motivação.

A minha amiga da Fundação Hemope, Kessia Porfírio sempre me motivando em todos os momentos, através de sua ajuda tudo aconteceu.

A Ariadne Tennyle, que me conduziu e me ensinou os primeiros passos sua paciência, compromisso e amizade me ajudaram muito nessa jornada.

A Vivianne Lays sua contribuição, trabalho e inspiração foram fundamentais no andamento desse projeto e por compartilhar seu conhecimento serei sempre grato por tudo que aprendi.

A todos os colegas e amigos que fiz na UFRPE, Priscilla Calaça, Rebeca, Alexandra, Elaine, Michele, Pablo, José Noé e todos que de alguma forma colaboraram.

Ao Centro de Apoio a Pesquisa CENAPESQ – UFRPE.

Aos funcionários do CENAPESQ – UFRPE.

Ao Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO – UFRPE.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal DMFA – UFRPE.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

A Fundação Hemope.

Ao Instituto de Hematologia do Nordeste – IHENE.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

“O conhecimento serve para
ENCANTAR as pessoas, não
para humilhá-las”

(Mario Sergio Cortella).

RESUMO

Lectinas são glicoproteínas de origem não-imune que reconhecem carboidratos específicos e, por isso, possuem diversas funções biológicas. Dentre essas fontes, destacam-se as microalgas que são ricas fontes de bioativos. O objetivo deste trabalho foi extrair purificar e caracterizar lectina a partir da microalga *Scenedesmus* sp. (= *Tetradesmus obliquus*) A biomassa microalgal foi cultivada em meio padrão BG-11, de modo autotrófico durante 15 dias. A lectina foi extraída da biomassa por agitação magnética durante 9 horas a 4°C. O homogenizado 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 60-80%, e o precipitado protéico submetido à cromatografia de troca iônica e gel filtração. A lectina foi caracterizada em relação ao reconhecimento dos grupos sanguíneos A, B, AB, O, subgrupos A1 e A2, e eritrócitos de coelho, pH ótimo, temperatura ótima e suas estabilidades durante 90 min, inibição a carboidratos, glicoproteínas e íons. Esta proteína foi purificada utilizando uma etapa cromatográfica e aglutinou os eritrócitos humanos tipos O e eritrócitos de coelho, não aglutinou subgrupos A1 e A2, A, B e AB. A lectina apresentou pH ótimo entre 7,0 - 7,5 estável por 90 min e temperatura ótima entre 20 a 50 °C com boa estabilidade térmica. A lectina foi inibida por carboidratos complexos presentes nas glicoproteínas azoalbumina, azocaseína e albumina, mas não foi inibida pelos mono e dissacarídeos. A proteína tem massa molecular aparente de 78 kDa, determinada por filtração em gel, e sua atividade foi afetada na presença de cátions divalentes, indicando que a lectina de *Scenedesmus* sp. apresenta características distintas entre as lectinas de microalgas. O presente estudo oferece uma nova alternativa para a obtenção de lectinas de alto valor biológico, bem como traz novos dados acerca do potencial biotecnológico das microalgas, contribuindo para a indústria farmacêutica, agrícola e biomédica.

Palavras chave: hemaglutininas; lectinas, purificação, caracterização.

ABSTRACT

Lectins are non-immune glycoproteins with diverse biological in agriculture, medicine, biotechnology research and have become important tools in identifying different blood groups. The search for new sources of these macromolecules has intensified, so the objective of this work was to extract, purify and characterize a new lectin from the biomass of the *Scenedesmus* sp, a microalgae that produces bioactives with high added value. Biomass was cultivated in BG-11 medium, autotrophically for 15 days. Lectin was extracted of biomass by magnetic stirring for 9 hours at 4 °C. The homogenate was centrifuged and the supernatant (EB) used to purification step. The EB was precipitated by 60-80% ammonium sulfate and the protein precipitate was subjected to ion exchange chromatography on DEAE Sephadex C-25 and gel filtration. The lectin was characterized in relation to the recognition of blood groups A, B, AB, O, subgroups A1 and A2, and rabbit erythrocytes, optimum pH, optimum temperature and its stabilities for 90 minutes, inhibition of carbohydrates, glycoproteins and ions. The lectin was purified using a chromatographic step and agglutinated the human erythrocytes types O and rabbit erythrocytes. The lectin presented optimum pH of 7.0 - 7.5 stable for 90 min and optimum temperature of 20 to 50 °C with good thermal stability. Lectin was inhibited by complex carbohydrates present in glycoproteins azoalbumin, azocasein and albumin, but was not inhibited by most mono- and disaccharides. The lectin has an apparent molecular mass of 78 kDa, determined by gel filtration, and its activity was affected in the presence of divalent cations, indicating the lectin of *Scenedesmus* sp. characteristics among microalga lectins. The present study offers a new alternative for obtaining lectins of high biological value, as well as brings new data about the biotechnological potential of microalgae, contributing to the pharmaceutical, agricultural and biomedical industry.

Keywords: haemagglutinins; lectins, purification, characterization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Microalgas	17
2.2. Principais fatores necessários ao crescimento das microalgas	18
2.3. Tipos de cultivo das microalgas.....	19
2.4. Aplicação das microalgas	22
2.5. <i>Scenedesmus</i> sp.	24
2.6. Lectinas	26
2.6.1 Lectinas de algas e microalgas.....	31
2.6.2 Lectina Anti-A1 e A2	32
2.7. Caracterização das lectinas.....	33
2.8. Purificação das lectinas	34
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. REFERÊNCIAS	38
5. ARTIGO SUBMETIDO.....	45
Purificação e caracterização de lectinas obtidas de <i>Scenedesmus</i> sp.(= <i>Tetradismus obliquus</i>).	45
RESUMO	46
1.INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1. Microorganismos e condições de cultura	49
2.2.Extração de lectina	49

2.3. Passo de precipitação	49
2.4. Purificação da lectina de <i>Scenedesmus</i> sp. (= <i>Tetrademus obliquus</i>).....	50
2.5. Determinação de massa molecular por cromatografia por exclusão de tamanho numa coluna FPLC-Superdex G-75.....	50
2.6 Teste de atividade hemoaglutinante	50
2.7 Concentração de proteína	51
2.8. Amostra de eritrócitos	51
2.9 Inibição hemoaglutinante por açucares e glicoproteínas	52
2.10. Efeitos de íons na atividade hemaglutinante	52
2.10.1 Efeito de pH e temperatura na atividade hemaglutinante	53
3. RESULTADO	54
4. DISCUSSÃO	56
5. CONFLITO DE INTERESSE	59
6. AGRADECIMENTOS	59
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS.....	61
9. ANEXOS.....	70
9.1. Anexo 1.....	70
9.2. Anexo 2.....	71

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Fig. 1.	Fatores que podem ser utilizados no crescimento da biomassa de microalgas e seu respectivo uso industrial.....	18
Fig. 2.	Cultivo autotrófico <i>Scenedesmus sp.</i>	20
Fig. 3	Exemplo de cultivo de microalgas em uma lagoa aberta (<i>raceway pond</i>)	21
Fig. 4.	<i>Scenedesmus sp.</i>	23
Fig. 5.	<i>Scenedesmus acunae</i> . Barras de escala: 10 μm	24
Fig. 6.	Esquema ilustrativo da interação da lectina com um carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos.....	26
Fig.7.	Representação esquemática de aglutinação por lectinas aos carboidratos da superfície dos eritrócitos.....	27
Fig.8.	Diagrama de um processo genérico de purificação de produtos biotecnológicos.....	34
Fig.9.	Coluna cromatográfica exclusão molecular.....	36
Fig.12.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	36

ARTIGO

- Fig. 1.** Padrão de eluição da lectina durante cromatografia de troca aniônica no DEAE- sephadex68
- Fig. 2.** Cromatografia de exclusão de tamanho da lectina do *Tetrademus obliquus* na FPLC- Sephadex G-50 Column. Fração I mostrou título hemaglutinante.....68
- Fig. 3.** Efeito do pH (●) e estabilidade por 90 min (■) na atividade da lectina do *Tetrademus obliquus*69
- Fig. 4.** Efeito de temperatura (●) e estabilidade por 90 min (■) na atividade da lectina do *Tetrademus obliquus*.....69

LISTA DE TABELAS REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela.1	Nutrientes e funções biológicas.....	19
Tabela.2	Alguns produtos obtidos a partir de algas e respectivas aplicações	22
Tabela.3	Compostos extraídos da biomassa de microalgas descritos na literatura	24
Tabela.4	Classificação das lectinas quanto a sua especificidade ao ligante.....	26

ARTIGO

Tabela.1	Sumário da purificação da <i>Tetradismus obliquus</i>	65
Tabela.2	Especificidade de grupo sanguíneos da lectinas de <i>Tetradismus obliquus</i>	65
Tabela.3	Efeitos de vários carboidratos e glicoproteínas da lectina purificada (atividade hemaglutinante inicial: 2048 U)	66
Tabela.4	Efeitos de ions metálicos na lectina (Atividade hemaglutinante inicial 2048U)	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade Hemaglutinante
ARA	Ácido araquidônico
ATP	Adenosine Trifosfato
CO₂	Gás carbônico
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DHA	Ácido decosaheptaenoico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EB	Extrato Bruto
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GLA	Ácido gama-linolênico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	High-performance High-pressure liquid Chromatography
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton

LA	Ácido linolênico
PAGE	Gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PGK	Fosfoglicerato quinase
pH	Potencial hidrogênioônico
PHB	Ácido poli- β -hidroxibutírico
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido Tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

Em busca de novas fontes biotecnológicas, as microalgas vêm se destacando na produção de compostos de alto valor comercial na indústria alimentícia, química e farmacêutica devido à presença de diferentes bioativos encontrados na sua biomassa (Derner et al., 2006). A biomassa das microalgas e seu conteúdo macromolecular podem ser utilizados em diversas áreas da biotecnologia, como importantes aliados na produção de vários compostos e sua comprovada aplicabilidade nas mais diferentes áreas da pesquisa científica, investigações bioquímicas e biológicas (Sharon & Lis, 2001).

Algumas microalgas são conhecidas por possuírem um alto teor de proteína na sua biomassa, entre elas, podemos destacar o gênero *Scenedesmus* sp. (Kumar et al., 2010; Lohman et al., 2014). Além disso, este gênero apresenta um conteúdo lipídico relativamente alto e são facilmente cultivadas (Jena et al., 2012).

Dentre as diversas proteínas que podem ser extraídas de algas e microalgas, como a *Scenedesmus* sp., destacam-se as lectinas que são glicoproteínas capazes de realizar ligações reversíveis com monossacarídeos e oligossacarídeos específicos. As lectinas podem ligar-se aos radicais de carboidratos na superfície dos eritrócitos e aglutinar sem alterar as propriedades dos carboidratos (Sze et al., 2011).

Em relação às aplicações biológicas, as lectinas de algas são estudadas no meio científico, visto que induzem menor imunogenicidade nas células hospedeiras, possuem grande estabilidade devido às várias pontes dissulfeto e mostram uma alta especificidade por glicoconjugados complexos, como os presentes na superfície das células (Pinto et al., 2009).

No momento, as lectinas comerciais são de origem vegetal e há poucos trabalhos sobre microalgas como fonte de lectinas, mesmo tendo sido comprovado, em estudos prévios, que estas apresentam características favoráveis a diferentes aplicações industriais e biotecnológicas. Assim, torna-se necessária a pesquisa com novos gêneros de microalgas com o objetivo de obter novas fontes de lectinas.

Desse modo, faz-se necessário explorar o potencial biotecnológico da *Scenedesmus* sp em relação as suas propriedades biológicas a serem aplicadas em animais e humanos. Diferentes fontes e tipos de lectina, por sua vez, devem ser mais explorados, uma vez que apresenta potencialidade como agente terapêutico para possível aplicação na medicina veterinária e humana, como utilização em fármacos, nas áreas de pesquisa em bioquímica, biologia celular, imunologia, imono-hematologia, indicadores de interação célula-célula, bem como para aumentar o valor agregado dos micro-organismos fotossintetizantes (Becker, 2004; Colla et al., 2004; Pulz&Gross,2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes que se desenvolvem em diferentes condições ambientais, sendo encontradas em ambientes salinos ou em água doce (Hoek et al. 1995; Mchugh, 2003). A maioria delas tem hábitos planctônicos, embora existam também muitas espécies bentônicas e terrestres (habitando em ambientes úmidos). As microalgas planctônicas constituem o fitoplâncton, ou seja, são organismos fotoautotróficos do plâncton.

Os diversos organismos fitoplanctônicos podem se apresentar como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células. Em todos os casos ocorre pouca ou nenhuma diferenciação das funções ou especialização das células, ou seja, cada célula realiza todas as funções vitais e podem variar em tamanho, morfologia e outras características (Lourenço, 2006).

A composição bioquímica da biomassa e de produtos metabólicos das microalgas pode ser afetada pelas interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (Falkowski et al., 1997).

Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas características da espécie cultivada, e a influência de outros microrganismos sobre o crescimento da microalga. Enquanto que características, como a iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes no meio são os principais fatores físico-químicos (Guillard 1975; Richmond, 2004).

Em comparação as plantas terrestres, as microalgas possuem maiores taxas de crescimento, eficiência fotossintética e diversidade bioquímica. Tais características foram importantes para que as microalgas tenham recebido considerável interesse como matéria-prima potencial para a produção de biomoléculas de interesse comercial. (Stephenson et al., 2011; Slade et al., 2013).

2.2. PRINCIPAIS FATORES NECESSÁRIOS AO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Alguns fatores são importantes e podem ser utilizados no cultivo de microalgas estão descritos, dentre eles destacam-se a luminosidade, pH, agitação, temperatura e nutrientes. Esses fatores precisam ser otimizados para obter uma maior produtividade celular. (Figura 1) (Slade et al., 2013).

Figura 1. Fatores que podem ser utilizados no crescimento da biomassa de microalgas e seu respectivo uso industrial.



Fonte: Borges, 2010 apud Becker, 1994.

A intensidade luminosa é um dos fatores que precisam ser controladas no cultivo de microalgas. A iluminação nas células influencia o crescimento celular (Lourenço, 2006; Derner et al., 2006). Baixa intensidade luminosa limita o crescimento das microalgas e alta intensidade luminosa pode ocasionar uma maior produção de espécies de oxigênio reativas prejudiciais, como o H_2O_2 , prejudicando a organização celular, ou iniciando o fenômeno da fotoinibição, isto é, a diminuição da possibilidade de fotossíntese causando branqueamento e morte (Soletto et al., 2005; Muller et al.; 2001; Mehlitz, 2009).

Existe uma ligação direta entre a variação do pH do meio e a concentração de CO_2 , uma vez que o aumento da alcalinidade do meio de cultura está diretamente relacionado ao consumo do dióxido de carbono pelas microalgas e do seu consequente crescimento, pois a redução no conteúdo de carbono inorgânico se dá através do consumo necessário ao crescimento celular. O pH atinge diretamente a disponibilidade de diversos elementos químicos encontrados no

meio. Estes podem condensar e precipitar de acordo com o pH do cultivo. (Schmidt, 2007; Lourenço, 2006).

Em relação aos nutrientes, o nitrogênio e fósforo são dois macronutrientes essenciais para o desenvolvimento e o metabolismo das microalgas (Tabela 1). Nitrogênio é um elemento de grande importância para a formação de ácidos nucleicos e proteínas, tornando-se responsável por 7 a 20% do peso seco da célula.

Outro nutriente essencial e que precisa ser fornecido é o carbono. Ele tem grande relevância na fotossíntese, no crescimento e reprodução celular. Outros micronutrientes importantes são chamados de elementos traços, e são utilizados em quantidades bem reduzidas. (Brennan et al., 2010).

Tabela 1. Nutrientes e funções biológicas.

Componente	Função biológica
Carbono	Componente estrutural de macromoléculas
Nitrogênio	Componente estrutural de macromoléculas
Fósforo	Realiza processos de troca de energética (ATP)
Potássio	Regulação osmótica
Magnésio	Constituinte da molécula de clorofila
Enxofre	Estruturação de proteínas, como cisteína e metionina
Ferro	Participação da via de biossíntese

Fonte: Adaptação de Grobbelaar (2004).

2.3. TIPOS DE CULTIVO DAS MICROALGAS

O cultivo de microalgas que utilizam predominantemente a fotossíntese (fotoautotróficos) como mecanismo de assimilação do carbono pode mitigar as emissões de CO₂ derivadas das atividades humanas, utilizando radiação solar e luz artificial como fonte de energia e convertendo o CO₂ a biomoléculas, como carboidratos e ácidos graxos. (Chen et al., 2017).

Na verdade, os micro-organismos autotróficos são responsáveis hoje por quase 50% da fixação global, por outro lado, o cultivo heterotrófico apresenta elevado potencial (Figura 2) (Brennan et al., 2010).

Embora os cultivos autotróficos utilizem uma fonte energética abundante e de baixo custo, normalmente apresentam produtividade de biomassa inferior ao dos cultivos heterotróficos (Chenet al., 2017). Na ausência de luz, algumas espécies microalgais são capazes de metabolizar carbono orgânico presente no meio de cultivo utilizando uma estratégia de assimilação heterotrófica (Salamaet al., 2017). O cultivo mixotrófico equivale à junção do autotrófico com o heterotrófico, onde tanto os compostos orgânicos, a presença de luz e o CO₂ são necessários para o crescimento, operando simultaneamente o metabolismo respiratório e o fotossintético (Grobbelaar, 2004). Entretanto, nem todas as espécies conseguem se beneficiar dessa rota de assimilação.

Como o cultivo heterotrófico não depende da luz para a assimilação de carbono, essa estratégia permite a obtenção de culturas com alta densidade celular. Geralmente esse tipo de mecanismo atenua as limitações do cultivo. (Salamaet al., 2017).

Figura 2. Cultivo autotrófico *Scenedesmus* sp.



Fonte: Próprio autor

Os sistemas de cultivo utilizados para o crescimento das microalgas são classificados em dois tipos: sistemas abertos – tanques aerados e com as extremidades elípticas; e sistemas fechados - reator em placas ou tubular (Dasgupta et al., 2010).

Os sistemas de cultivo em larga escala do tipo “open ponds” ou pista aberta ou sistema aberto, são tanques de tamanhos diversos colocados a céu

aberto, mantidos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação.

Eles se caracterizam como tanques rasos, construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato, com fundo de terra ou revestidos com material plástico, onde as culturas são mantidas em circulação constante (Figura 3) (Rawat et al., 2013).

Figura 3. Cultivo de microalgas em uma lagoa aberta (raceway pond).



Fonte: Barak et al., 2014 (acesso em 10/09/2018, disponível em Seambiotic: <http://www.seambiotic.com/>).

2.4. APLICAÇÃO DAS MICROALGAS

As microalgas podem ter aplicações na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e na obtenção de biocombustíveis (Tabela 2). Na indústria alimentícia são utilizadas por produzirem vitaminas, sais minerais, pigmentos, aminoácidos e ácidos graxos essenciais aos animais. Uma das principais utilizações dos ácidos graxos de microalgas é no enriquecimento de rações para peixes e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta (Olaizola, 2003; Morais et al., 2008). Alguns produtos obtidos a partir de algas e respectivas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Tabela 2 - Alguns produtos obtidos a partir de algas e respectivas aplicações.

	Produto	Aplicação
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais <i>health food</i> Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (astaxantinas e cantaxantina) Lutina Betacaroteno Vitaminas C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico – ARA Ácido eicosapentaenoico – EPA Ácido docosahexaenóico – DHA Ácido gama-linolênico GLA Ácido linoleico – LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase – SOD Fosfoglicerato quinase – PGK Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição	Alimentos Pesquisa em biotecnologia alimentar Medicina Aditivos alimentares
Polímeros	Polissacarídeos Amido	Cosméticos Medicina

	Ácido poli- β -hidroxibutírico-PHB	
	Peptídeos	
	Toxinas	
Produtos especiais	Isótopos	Pesquisa em biotecnologia
	Aminoácidos (prolina, argininas, ácidos aspártico)	alimentar Medicina
	Esteroides	

Fonte: Adaptado de Derneret al., 2006.

Durante a década de 60 foi iniciada a produção comercial de microalgas com espécies de *Chlorella* e *Spirulina*, como suplementos dietéticos, *Dunaliellasalina* para obtenção de β -caroteno, *Haematococcus pluvialis* para produção de astaxantina e várias outras espécies para aplicação na aquicultura. Elas são utilizadas na produção de suplementos alimentares que possuem valor comercial e são extraídos principalmente dos gêneros *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* e *Dunaliella*.

Estudos mostram que as algas e microalgas são farmacologicamente ativas, apresentando atividades antiinflamatórias, antidiabética, anticoagulante, antiviral, antifúngica, anticancerígena, ou seja, podem ser utilizadas de diversas formas na indústria farmacêutica (Lauritano et al., 2014). Além disso, as microalgas também podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de bio-polímeros/plásticos, que apresentam a vantagem de serem biodegradáveis (Pribadi, 2009).

Algumas algas e microalgas são conhecidas por possuírem um alto teor de proteína na sua biomassa (Kumar et al., 2010; Lohman et al., 2014). As proteínas possuem diversas funções, como estruturais, transportadoras, reguladoras e enzimáticas (Neves, 2006). Dentre as diversas proteínas destacam-se as lectinas que são glicoproteínas capazes de realizar ligações reversíveis com monossacarídeos e oligossacarídeos específicos (Sze & Tzi, 2011).

2.5. SCENEDESMUS SP.

Scenedesmus sp. é uma microalga aquática, dominante em lagos de água doce e rios (Kim et al., 2013). Pertence ao grupo das algas verdes do domínio Eukarya chorophyta da classe Euhlorophyceae ordem Chlorococcales da família *Scenedesmaceae* (Ramos et al., 2007).

Figura 4. *Scenedesmus* sp.



Fonte: <http://www.planktonforum.eu/index.php>.

São clorofiladas, unicelulares e uninucleadas, possui forma elipsoidal (Figura 6), as colônias são planas (série linear) com as células agrupadas em número de 4, 8, raramente 16 ou 32 (Stankiewicz et al., 1981).

Em meio com pouco fósforo ou sais minerais, o gênero *Scenedesmus* é induzido a crescer como única célula, semelhante aos gêneros *Chodatella* e *Franceia*, e quando privado de nitrogênio, podem ocasionalmente formar zoosporos (Trainor, 1998).

Figura 5. *Scenedesmus acunae*. Barras de escala: 10 µm.



Fonte: Souza et al., 2013.

O gênero *Scenedesmus* sp., é descrito na literatura como fonte protéica e lipídeos como descrito na (Tabela 3). Esta microalga foi considerada uma das mais promissoras para a produção de biodiesel, pois possui teor lipídico e produtividade relativamente elevados e é relativamente fácil de cultivar (Jena et al., 2012).

Tabela 3. Compostos extraídos da biomassa de microalgas descritos na literatura

Microalga	Compostos extraídos da biomassa	Fonte
<i>Scenedesmus</i> sp.	Hidrolisados protéicos	Tchorbanov, Bozhkova, 1988
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Biodiesel	Mandal; Mallick; 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Lipídeos	Choi et al.; 1987
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	Biodiesel e bioethanol	Ashokkumar et al., 2015
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Carotenoids	Macías-Sánchez et al., 2010
<i>Scenedesmus</i> sp.	Proteínas e biocombustível	García-Moscoso et al., 2013

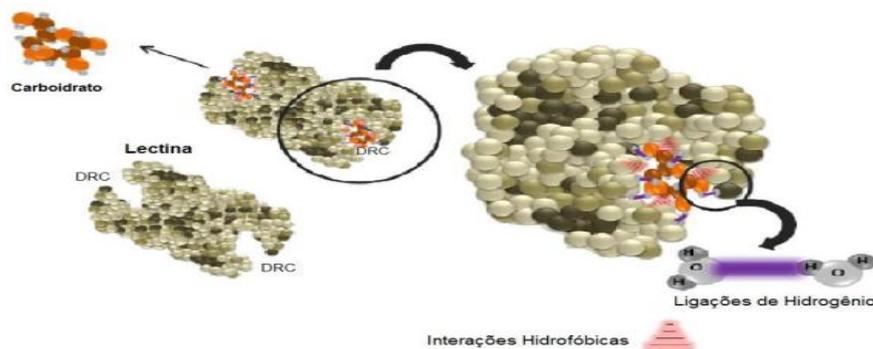
Fonte: Adaptado: Souza et al., 2013.

A biomassa da *Scenedesmus* sp é composta por uma ótima fonte de proteína destacamos as lectinas, que tornaram-se o foco de intenso interesse em diversas áreas em particular, para as pesquisas e aplicações na agricultura, medicina entre outros. Estas proteínas com características únicas têm encontrado uso em diversos campos à medida que mais lectinas estão sendo isoladas e sua função elucidada. (Movafagh et al., 2013).

2.6. LECTINAS

As proteínas estão entre os quatro grandes grupos de macromoléculas biológicas em maior quantidade, que ocorrem em todas as células, estão no centro da ação dos processos biológicos e são extremamente versáteis em suas funções. Elas estão envolvidas no metabolismo celular, como enzimas, inibidores de enzimas, hormônios, proteínas de transporte, estruturais, de reserva, de defesa, que geram força mecânica e eletroquímica. Dentre as proteínas, a lectina destaca-se como uma das mais importantes (Figura 6) (Gaboret al.,2001)

Figura 6. Esquema ilustrativo da interação da lectina com um carboidrato específico através de domínio de reconhecimento a carboidratos.



Fonte: Silva et al., 2012

As lectinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interage especificamente e de forma reversível com carboidratos através de ligações não-covalentes (Singh et al., 2017). Esta ligação, que ocorre com açúcares isolados ou em estruturas maiores, como glicoproteínas e glicolipídios, ocorre devido a um domínio de reconhecimento de carboidratos dentro de sua estrutura (Cagliari et al., 2018) (figura 6). São ainda conhecidas pela sua especificidade de aglutinar alguns subgrupos sanguíneos do sistema ABO, subgrupos A1 e A2.

O nome lectina, que deriva do latim *lectus* (escolhido, selecionado) (Kennedy et al., 1995; Matsui et al., 2001).

É diversa a distribuição de lectinas na natureza, fazendo com que elas estejam presentes em todos os reinos, inclusive podendo ser encontradas em bactérias (Imbert et al., 2004); vírus (Gamblin et al., 2004); algas (Han et al., 2010); vegetais (Leite et al., 2005; Solet et al., 2007); fungos (Khan et al., 2007; Leonidas et al., 2007); líquens (Silva et al., 2009); invertebrados: esponjas (Moura et al., 2006); cnidários (Fenton-Navarro et al., 2003); moluscos (Takahashi et al., 2008; Kong et al., 2011); crustáceos (Xu et al., 2010); insetos (Ourth et al., 2005); vertebrados: peixes (Terada et al., 2007); répteis (Nunes et al., 2011); aves (Hogenkamp et al., 2006); mamíferos (Ola et al., 2007).

As lectinas podem ser classificadas de diferentes formas, como em relação a sua especificidade ao carboidrato ou glicoconjugado, quantidade e tipos de domínios de ligação, a dependência de íons divalentes e quanto à fonte de obtenção. A sua atividade é principalmente influenciada pelo pH e temperatura. (Silva et al., 2012)

Tabela 4. Classificação das lectinas quanto a sua especificidade ao ligante.

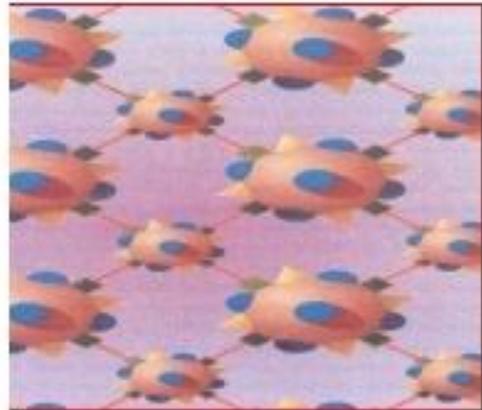
Famílias	Exemplos	Fonte
Lectinas ligadoras de glicose/manose	<i>Cratylia mollis</i> seeds Lectin (CramoLL)	Melo et al., 2011
Lectinas ligadoras de acetilglicosamina	<i>Schinus terebinthifolius</i> Leaves Lectin (SteLL)	Gomes et al., 2013
Lectinas ligadoras de galactose	<i>Bothrops leucurus</i> venom Lectin (BIL)	Nunes et al., 2011
Lectinas ligadoras de N-acetilgalactosamina	Lectina de macrófago humano (hMGL)	Takada et al., 2004
Lectinas ligadoras de fucose	<i>Colossoma macropomum</i> Lectin (ComaSeL)	Carvalho et al., 2012
Lectinas ligadoras de ácido siálico	<i>Gymnopilus spectabilis</i> Lectin (GSL)	Alborés et al., 2014
Lectinas ligadoras de glicoproteínas	<i>Sebastiania jacobinensis</i> Bark Lectin (SejaBL)	Vaz et al., 2010

Lectinas ligadoras de mucina	<i>Aspergillus gorakhpurensis</i>	Singh et al., 2017
	Lectin	

Fonte: Adaptado: Silva, 2017.

Para a terminologia das lectinas não existe um padrão (Povineli et al., 2002). Por isso, várias lectinas são nomeadas de acordo com o local onde as espécies foram isoladas ou purificadas, por exemplo, lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* Aiton ou CpL (Rego et al., 2002). Outras são nomeadas com base na especificidade ao carboidrato, isto é, lectina específica para D-galactose extraída do látex de *Synadenium carinatum* B. (Souza et al., 2005). Ainda, sua classificação é baseada no nome científico ou popular da espécie, por exemplo, Heveina, uma lectina extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* (Van Parijs et al., 1991).

Figura 7. Representação esquemática de aglutinação por lectinas aos carboidratos da superfície dos eritrócitos.



Fonte: Kennedy et al., 1995

De acordo com sua estrutura geral, as lectinas são ainda subdivididas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas. As merolectinas são caracterizadas por possuírem um sítio de ligação para carboidratos, serem pequenas, com um único peptídeo e não possuem a capacidade de aglutinar células por serem monovalentes. As Hololectinas apresentam múltiplos sítios de ligação a carboidratos, podendo aglutinar células ou glicoconjugados.

As Quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos e possuem atividade catalítica. Por fim, as Superlectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, porém estes apresentam diferentes especificidades (Peumans & Van Damme, 1995).

O começo das pesquisas sobre lectinas foi marcado pela descoberta de Stillmark ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona). Ele observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos, devido à presença de uma proteína extraída, a ricina. O primeiro relato a respeito de lectinas se deu em 1888 (Kennedy et al., 1995).

Em 1888 Hermann Stillmark, ao observar a aglutinação de células vermelhas do sangue (atividade hemaglutinante) por extratos do feijão castor (*Ricinus communis* – Ricina), cresceu o estudo de aplicações destas proteínas (Gabor et al., 2001).

Estas informações atraíram a atenção de Paul Ehrlich que, trabalhando com a proteína de *Abrus precatorius* com propriedade similar à ricina, na última década de 1800, introduziu as lectinas dentro da pesquisa imunológica (Sharon, 1989; Kennedy et al., 1994).

Pouco tempo depois, outra hemaglutinina, chamada abrina, foi encontrada em sementes de *Abrus precatorius* (Jequiriti). Porém, somente em 1960 o estudo sobre lectinas foi ganhando força, chamando a atenção para a investigação e aplicação delas (Gabor et al., 2004).

Algumas lectinas possuem especificidade para mais de um carboidrato, aglutinando células de diferentes espécies. Também existem lectinas que só aglutinam as células em que houver a presença de um determinado carboidrato (Kabir, 1998; Sato et al., 2000; Gabor et al., 2001; Coutiño-Rodríguez et al., 2001). Peumans e Van Damme (2003), por exemplo, estudaram lectinas de plantas que exibem uma ampla especificidade para carboidrato, sendo que outras apresentam maior afinidade para oligossacarídeos do que para açúcares simples ou têm especificidade direcionada contra glicanos estranhos (que não são próprios da planta), além disso, lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer o mesmo carboidrato.

A especificidade de uma lectina a carboidratos ou glicoconjugados tem sido realizada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH), utilizando diferentes carboidratos (Gabor et al., 2001; Ng e Yu, 2001). As lectinas

possuem valiosas ferramentas para a investigação estrutural de complexo de carboidrato, especialmente glicoproteínas, e para a análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde células normais até células transformadas no câncer (Sharon e Lis, 2001). Ademais, lectinas são usadas para obter insights em processos biológicos essenciais, incluindo proliferação celular, apoptose, metástase de células neoplásicas, especialmente infecção microbiana, dentre outros usos (Van Buul & Brouns, 2014).

Na natureza, as lectinas têm o importante papel de reconhecimento biológico entre células e proteínas e protegem as plantas contra patógenos (Van Buul & Brouns, 2014). As lectinas podem ser utilizadas como matrizes de afinidade para a purificação de várias glicoproteínas, glicolipídeos (ou qualquer amostra que contenha sacarídeo) de grande importância médica, como a purificação de glicoproteínas e na identificação de algumas doenças como o vírus HIV (do inglês - human immunodeficiency virus) o qual está sendo utilizado no desenvolvimento de vacinas (Gilljam, 1993; Bertrand et al., 1998) e também para a purificação de IgA e IgM (Fassina et al., 2001).

A afinidade de lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada, também para a identificação de microrganismos (Wu et al., 2000) ou para identificação de grupos sanguíneos ABO e seus subgrupos. (Matsui et al., 2001).

Algumas lectinas possuem afinidades específicas por grupos sanguíneos, podendo apresentar diferentes valores de atividade hemaglutinante com eritrócitos de diferentes animais e podem ser específicas para determinado tipo sanguíneo, como a lectina de *Salviabogotensis*, que só aglutina eritrócitos humanos Tn (VegaePérez, 2006), a lectina BAA-Ade *Bunodeo psisantilliensis* (Fenton-Navarro et al., 2003) e a de *Tachypleus tridentatusi* (Nagai, 1999), específicas para eritrócito tipo A, e as lectinas de *Charybdis japonica* (Umetsu, 1991), a do cogumelo *Marasmius oreades* (Winter et al., 2002) e a aglutinina-B (BAA-B) de *Bunodeopsis antilliensis*, (Fenton-Navarro et al., 2003), específicas para eritrócitos tipo B. Diferentemente uma lectina fúngica da espécie *Cordyceps militaris*, denominada CML, aglutina eritrócitos de ratos e camundongos, mas não aglutina eritrócitos do grupo ABO (Junget al., 2007).

As lectinas algais têm imenso potencial e são objeto de intensa pesquisa devido ao grande número de aplicações biomédicas, como atividades anti-HIV, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória e antinociceptiva (Singh et al., 2017). No entanto, pouco se tem explorado e estudado sobre esta proteína em algas e microalgas, o que contribui para despertar um maior interesse dos pesquisadores a respeito desta fonte de lectinas.

2.6.1 LECTINAS DE ALGAS E MICROALGAS

As lectinas encontradas comercialmente são principalmente extraídas de plantas terrestres, sendo o estudo de lectinas presentes em microalgas menos difuso na ciência. Estudos com algas marinhas revelaram que as lectinas presentes neste organismo mostraram natureza protéica semelhante àquela encontrada em lectinas de plantas terrestres, com apenas algumas diferenças em suas propriedades, como peso molecular menor e mais especificidade a oligossacarídeos ou glicoproteínas (Rogers & Hori, 1993).

Ademais, as lectinas de algas são monoméricas, exibem um alto conteúdo de aminoácidos ácidos, não necessitam de íons metálicos para sua atividade biológica e têm alto potencial para aplicações biomédicas, como atividades anti-HIV, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória e antinociceptiva (Singh et al., 2018).

Até o presente momento, a pesquisa para extração de lectinas de algas utilizou cerca de 800 espécies, onde aproximadamente 60 % das algas apresentaram atividade de lectina (Teixeira et al., 2012). No entanto, poucas são as espécies de microalgas (50 espécies) realmente analisadas e estudadas para extração de lectinas (Hwang et al., 2018).

Entre algas e microalgas pesquisadas atualmente e com alto teor de protéico e lectinas, estão *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum infusiformis*, *Desmodesmus dimorphus*, *D. subspicatus* e *Scenedesmus quadricauda* (Chun et. al, 2006).

As microalgas são organismos promissores em relação aos seus compostos bioativos, como as lectinas. Por isso, a necessidade de se estudar ainda mais estes organismos e as lectinas que podem ser extraídas deles. (Cavalcanti et al., 2016).

2.6.2 LECTINA ANTI-A1 E A2

O Polimorfismo nos genes que codificam o sistema sanguíneo ABO pode diminuir a quantidade de antígenos A ou B em células sanguíneas vermelhas, dando origem aos subgrupos no sistema. A ocorrência de variantes devido à heterogeneidade dos alelos A e B dificultam a prática imunohematológica. Ademais, A1 e A2 são os principais subgrupos do grupo sanguíneo A e eles diferem um do outro, tanto qualitativa como quantitativamente. Subgrupos de A podem resultar em discrepâncias na tipagem sanguínea ABO (Shastri et al., 2010).

Diferentes níveis de expressão de antígenos A ou B nos eritrócitos podem ser encontrados, sendo chamados de subgrupos de A ou B, conforme a intensidade de aglutinação dos eritrócitos com os reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-A1 e anti-H. A reatividade do reagente anti-H com as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos ABO tende a ser: O>A2>B>A2B>A1>A1B (Henry, 2001).

O fenótipo A2, comum em caucasianos, é detectado, sorologicamente, por meio da capacidade desses eritrócitos aglutinarem na presença de soro anti-A e de não aglutinarem com o soro lectina anti-A1, diferentemente do fenótipo A1 cujas hemácias são aglutinadas na presença desse reagente. O alelo A2 (A201) é caracterizado pela substituição de uma única base e uma deleção (Svensson et al., 2009).

Atualmente, reconhece que o fenótipo A1 tem uma base genética com o fenótipo A2 sendo definida por uma transferase de A2 que é relativamente ineficiente em relação à transferase de A1 (Nardoza et al., 2010).

Estudos demonstram que os fenótipos A2 e A1 apresentam diferenças sorológicas (reação com lectinas anti-A1 e anti-H), químicas (um glicolípido A

ativo em células A1 está ausente em células A2) e enzimáticas (diferentes pH ótimos. (Reid et al., 2004)

Os dois principais alelos de A, A1 e A2 são diferenciados sorologicamente de acordo com a reatividade das células com a lectina de sementes de *Dolichos biflorus*. A lectina de *D. biflorus* reage especificamente com células do subgrupo A1; logo, aglutina hemácias A1, mas não A2 (Svensson et al., 2009).

A prevalência de subgrupos de A varia de acordo com o lugar e com a raça. As frequências observadas de A1 e A2 são geralmente compatíveis com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para a herança mendeliana dos genes alélicos A1 e A2 (Girello, Ana et al., 2007).

No entanto, em algumas populações, tais como negros e japoneses, a frequência do fenótipo A2B é significativamente mais elevada do que a frequência esperada com base na frequência do fenótipo A2 (Oliveira et al., 2003).

Dessa forma, o uso de outras fontes de lectinas no sistema ABO vem despertando interesse pelo fato que nossas células sanguíneas, são divididas nos grupos A, B, AB, O e alguns subgrupos desse sistema. Essa divisão é baseada em diferentes açúcares exibido na superfície das células, as lectinas são capazes de diferenciar essas células, identificando e auxiliar na compreensão da estrutura celular, fazendo se necessários mais estudos de novas lectinas. (Svensson, 2009).

2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS LECTINAS

As lectinas podem ser caracterizadas quanto à especificidade ao sistema ABO ou entre eritrócitos de animais, a inibição por carboidratos simples ou complexos ou glicoconjugados, em relação à dependência de íons e a influencia de diferentes pH e temperaturas. Ademais, estas proteínas contêm dois ou mais sítios de ligação a carboidrato e sua caracterização físico-química é importante para explicar seu comportamento em diferentes propriedades biológicas (Cavada et al., 1998; Machuka et al., 1999; Sacchetti et al., 2001; Sharon e Lis, 2001).

A dependência de íons ou não é muito importante, pois existe lectinas que necessitam destes para exercer sua atividade biológica (Sharon e Lis, 1990). Algumas lectinas são termo sensíveis, outras termoestáveis, isso significa que tais proteínas têm sua atividade otimizada em determinadas temperaturas. Algumas lectinas permanecem ativas até 55–65 °C então, com a elevação da temperatura, a AH decai até desaparecer e outras continuam até 100 °C (Oliveira et al., 2002).

Outra avaliação importante é a estabilidade em diferentes valores de pH, pois estas proteínas devem ser mantidas em solução que apresentem condições ideais à sua manutenção nativa e consequente utilização nos experimentos a que podem ser submetidas; pois elas podem sofrer desnaturação em pH desfavorável. O pH tem efeito variado sobre as lectinas, em alguns casos não afeta a atividade (Wititsuwannakul et al.,1998) em outros a lectina perde a atividade em determinada faixa de pH e outras ficam ativas em valores de pH que variam de 4–11. (Ngaie,2004).

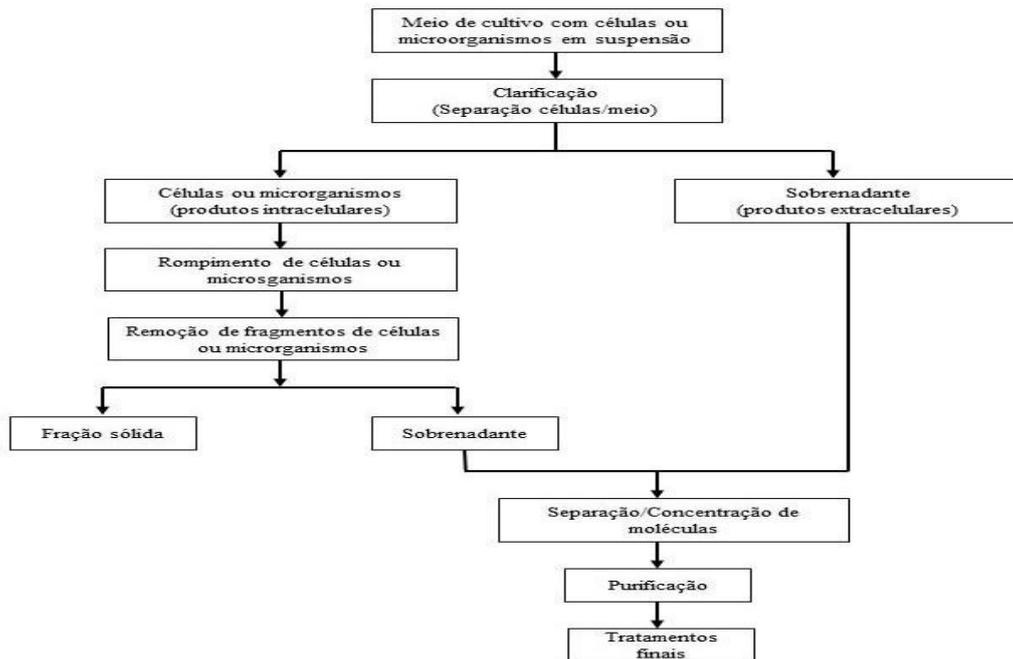
A AH da lectinas também pode ser avaliada em relação à ação de enzimas proteolíticas, pois estas podem alterar a AH ou não (Wititsuwannakuletal., 1998).

2.8. PURIFICAÇÃO DAS LECTINAS

Alguns métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. Na figura 10 os passos para a purificação de proteínas são apresentados.

A produção de biomoléculas geralmente envolve um meio de cultivo, no qual o produto alvo está diluído. Para a aplicação medicinal e farmacêutica, é necessário que o grau de pureza da molécula de interesse seja elevado. Por isso, durante a etapa downstream da produção, diversas operações unitárias são aplicadas para promover a purificação do produto. (Figura 8) (Pessoa Jret al., 2008).

Figura 8. Diagrama de um processo genérico de purificação de produtos biotecnológicos



Fonte: Pessoa Jr; Kilikian, (2008).

Todos esses processos de separação são baseados na diferença das características dos componentes da mistura. Para proteínas, a purificação da sua forma ativa pode ser baseada na sua solubilidade, tamanho da molécula e carga. No geral, elas sofrem um processo de concentração (por exemplo, por precipitação), seguida de uma remoção de impurezas (Thadathil & Velappan, 2014).

Na maioria dos casos, o número de etapas no processo inteiro de purificação vai aumentando tal como o grau de pureza necessário (Wilken & Nikolov, 2012).

Na preparação do extrato, o material é submetido à extração sob período específico de tempo e condições de temperatura estabelecidas, sob agitação constante. Dessa forma, as proteínas podem ser isoladas por alguns métodos, tais como o fracionamento de proteínas com sais. O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem (Delatorre et al., 2006).

As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento salino são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as

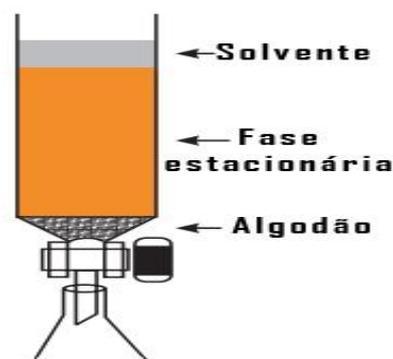
proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra, passam para a solução solvente (Thakur et al., 2007).

Lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de cromatografia de afinidade (Sun et al., 2007), cromatografia de troca iônica (Santi-Gadelha et al., 2006) ou cromatografia de gel filtração (Moura et al., 2006). O que pode ser modificado são, principalmente, as matrizes utilizadas nessas cromatografias, cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração).

A cromatografia de afinidade, técnica bastante utilizada no processo de purificação, tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídeos, através de ligações não-covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH, força iônica ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (Peumans & Van Damme, 1998).

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel peneira molecular é um método simples e baseia-se na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho (figura 9). A mistura proteica passa através de uma coluna contendo esferas de gel cujos poros, possuem intervalos de tamanhos relativamente estreitos. As moléculas maiores que não penetram nos poros do gel são diluídas primeiro, enquanto que as moléculas de tamanho menores capazes de penetrar no gel vão passando lentamente, de modo que a separação é de ordem decrescente de massa molar (Heu et al., 1995).

Figura9. Coluna cromatográfica de exclusão molecular.

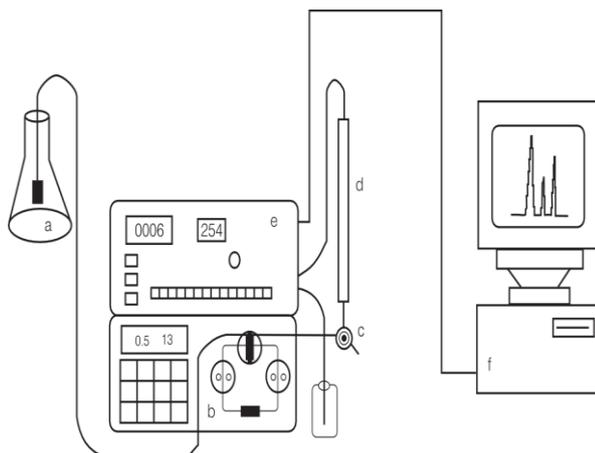


Fonte: SBQ: <http://qnint.s bq.org.br> (2014)

Este tipo de cromatografia é usado tanto para obter preparações homogêneas (Bezerra *et al.*, 2001), como para definir a massa molar da proteína nativa (Kawagishi *et al.*, 2001).

Estas cromatografias podem ser usadas em técnicas de alta resolução para purificação de lectinas em sistemas Comocromatografia líquida de rápida resolução (FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography), utilizando cromatografia de troca de íônicas sobre coluna de Mono Q ou Mono S (Mo *et al.*, 1993, Chung *et al.*, 2001), bem como, exclusão molecular (Jimbo *et al.*, 2000) ainda, (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução. (Figura 10).

Figura 10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.



- a. Reservatório da fase móvel
- b. Bomba de alta pressão
- c. Válvula de injeção
- d. Coluna
- e. Detector
- f. Registrador

Fonte: SBQ: <http://qnint.s bq.org.br> (2014).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar bioquimicamente lectinas obtidas a partir do extrato proteico de *Scenedesmus sp.*

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a melhor concentração de sulfato de amônio para a precipitação da lectina entre 0-60 e 60-80%;
- Estabelecer um protocolo de purificação da lectina;
- Estimar o peso molecular da lectina;
- Determinar a especificidade da lectina por carboidratos;
- Caracterizar físico-quimicamente a lectina;
- Determinar a atividade biológica da lectina em relação ao possível reconhecimento de antígenos do sistema ABO, subgrupo A1 e A2.

4. REFERÊNCIAS

- Alborés, S., Mora, P., Bustamante, M. J., Cerdeiras, M. P., & Fraguas, L. F. (2014). **Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis***. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 2081-2090.
- Barak, A.; Bechar, A; Weiss, H; Ben-Amtz, P. A; Ivery, E; Cohen, M; & Hadari, M. (s.d.). **Seambiotic**. Acesso em 25 de outubro de 2018, disponível em Seambiotic: <http://www.seambiotic.com>
- Becker, E. W. (1994). ***Microalgae: biotechnology and microbiology*** (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O'Keefe, B. R., Mori, T., ... & Currens, M. J. (1997). **Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(7), 1521-1530.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). **Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
- Cagliari, R., Kremer, F. S., & da Silva Pinto, L. (2018). **Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications**. *International journal of biological macromolecules*.
- Carvalho, E. V. M. M., Bezerra, R. F., de Souza Bezerra, R., de Araújo, J. M., Santos, A. J. G., dos Santos Correia, M. T., & Coelho, L. C. B. B. (2012). **Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum***. *Fisheries science*, 78(4), 879-887..
- Cavada, B. S., Madeira, S. V., Calvete, J. J., Souza, L. A., Bomfim, L. R., Dantas, A. R., ... & Leite, K. B. (2000). **Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosa* (Parkia discolor)**. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 30, p. 271-280
- Chen, H. H., & Jiang, J. G. (2017). **Lipid accumulation mechanisms in auto-and heterotrophic microalgae**. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(37), 8099-8110.
- Colla, L. M., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2004). **Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations**. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(1-2), 55-59.
- Coutiño-Rodríguez, R., Hernández-Cruz, P., & Giles-Ríos, H. (2001). **Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157: H7**. *Archives of Medical Research*, 32(4), 251-257.
- Dasgupta, C. N., Gilbert, J. J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S. A., Skjanes, K., & Das, D. (2010). **Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production**. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10218-10238.

Cavalcante, V.L..R; Porto. A. L. F; Brandão. Costa, R; M.P Bezerra, R.P. (2016) **Processo de extração de lectinas a partir de microorganismos fotossintetizantes**, BR 10 2016 025616 0.

Delatorre, P., Rocha, B. A., Gadelha, C. A., Santi-Gadelha, T., Cajazeiras, J. B., Souza, E. P., ... & Cavada, B. S. (2006). **Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins.** *Journal of structural biology*, 154(3), 280-286.

Derner, Roberto Bianchini E Cols. **Microalgas, produtos e aplicativos.** Cienc. Rural. Vol.36, no. 6, p.1959-1967. ISSN 0103-8478

Fenton-Navarro, B., Arreguín-L, B., Garcia-Hernández, E., Heimer, E., Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., & Arreguín-Espinosa, R. (2003). **Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*.** *Toxicon*, 42(5), 525-532.

Gabor, F., Klausegger, U., & Wirth, M. (2001). **The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145.** *International journal of pharmaceutics*, 221(1-2), 35-47.

Gamblin, S. J., Haire, L. F., Russell, R. J., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., ... & Wiley, D. C. (2004). **The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin.** *Science*, 303(5665), 1838-1842.

Gilljam, G. (1993). **Envelope glycoproteins of HIV-1, HIV-2, and SIV purified with *Galanthus nivalis* agglutinin induce strong immune responses.** *AIDS research and human retroviruses*, 9(5), 431-438.

Gomes, F. S; Prócopio, T. F., Napoleão; T. H., Coelho, L. C. B. B., & Paiva, P. M. G. (2013). **Antimicrobial lectin from *S chinus terebinthifolius* leaf.** *Journal of applied microbiology*, 114(3), 672-679.

Grobbelaar, J. U., & Bornman, C. H. (2004). **Algal biotechnology: real opportunities for Africa.** *South African Journal of Botany*, 70(1), 140-144.

Guillard, R.R.L.(1975) **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In: Smith, W.L.; Chanley, M.H. (Eds). *Culture of marine invertebrate animals*. New York: Plenum, . p.29-60.

Han, J. W., Jung, M. G., Kim, M. J., Yoon, K. S., Lee, K. P., & Kim, G. H. (2010). **Purification and characterization of a D- mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*.** *Phycological research*, 58(2), 143-150.

Hoek, C. Van Den.(1995) **Algae: an introduction to phycology.** London: Cambridge University, . 623 p.

Hwang, H. J., Han, J. W., Kim, G., & Han, J. (2018). **Functional expression and characterization of the recombinant N-acetyl-glucosamine/N-acetyl-galactosamine-specific marine algal lectin BPL3.** *Marine drugs*, 16(1), 13.

Imbert, D., Saur, E., Bonheme, I., & Roseau, V. (2004). **Traditional taro (*Colocasia esculenta*) cultivation in the swamp forest of Guadeloupe (FWI): Impact on forest structure and plant biodiversity.** *Revue d'écologie*.

- Jena, J., Nayak, M., Panda, H. S., Pradhan, N., Sarika, C., Panda, P. K., ... & Sukla, L. B. (2012). **Microalgae of Odisha coast as a potential source for biodiesel production.** *World Environ*, 2(1), 12-17.
- Kabir, S. (1998). **Jacalin: A jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research.** *Journal of immunological methods*, 212(2), 193-211.
- Kennedy, B. K., Austriaco Jr, N. R., Zhang, J., & Guarente, L. (1995). **Mutation in the silencing gene *S/R4* can delay aging in *S. cerevisiae*.** *Cell*, 80(3), 485-496.
- Khan, F., Ahmad, A., & Khan, M. I. (2007). **Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity.** *Archives of biochemistry and biophysics*, 457(2), 243-251.
- Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). **Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions.** *Bioresource technology*, 144, 8-13.
- Kong, P., Wang, L., Zhang, H., Song, X., Zhou, Z., Yang, Song. J; Qiu, L; Wang, L; SONG, L. (2011). **A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (*AiCTL-7*) agglutinating fungi with mannose specificity.** *Fish & shellfish immunology*, 30(3), 836-844.
- Kumar, A. (2010) **.Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions.** *Trends in biotechnology*, 28, 371-380.
- Lauritano. C.; Andersen. J.H; Hansen. E; Albrigten. M; Escarela. L; Esposito. F; Helland. K; Hanssen. K; Romano.G; Lanora .A. (2016). **Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities.** *Frontiers in Marine Science*, 3, 68
- Leite, Y. F. M. M., Silva, L. M. C. M., das Neves Amorim, R. C., Freire, E. A., de Melo Jorge, D. M., Grangeiro, T. B., & Benevides, N. M. B. (2005). **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1724(1-2), 137-145.
- Leonidas, D. D; Swamy, B. M; Hatzopoulos, G. N; Gonchigar, S. J; Chachai, V. B; Inamdar, S.R; Spyros, E. Zografhos e Oikonomakos, N.G (2007). **Structural basis for the carbohydrate recognition of the *Sclerotium rolfsii* lectin.** *Journal of molecular biology* , 368(4), 1145-1161.
- Lohman, E. J.; Gardner, R. D.; Halverson, L. D.; Peyton, B. M.; & Gerlach, R. (2014). **Carbon partitioning in lipids synthesized by *Chlamydomonas reinhardtii* when cultured under three unique inorganic carbon regimes.** *Algal Research*, 5, 171-180.
- Lourenço, S.O. (2006) **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 606 p.
- Machuka, J. S; Okeola, O. G.; Els, J. V. D.; Chrispeels, M. J.; Van Leuven, F., & Peumans, W. J. (1999). **Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms.** *Phytochemistry*, 51(6), 721-728.

- Matsui, T; Hamako. J., Ozeki, Y., & Titani, K. (2001). **Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1525(1-2), 50-57.
- McHUGH, D.J. **A guide to the seaweed industry.** Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations, FAO Fisheries Technical Paper 441, 111 p., 2003.
- Mehlitz, T. H. (2009) **Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors.** San Luis Obispo, USA.
- Morais, M. G. de; Costa, J. A. V. (2008). **Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono.** *Ciência Agrônômica*, v.32, n.4.
- Moura, R.M., Queiroz, A. F., Fook, J. M., Dias, A. S., Monteiro, N. K., Ribeiro, J. K., ... & Sales, M. P. (2006). **CvL, a lectin from the marine sponge Cliona varians: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(4), 517-523.
- Muller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. **Non-Photochemical Quenching: A Response to Excess Light Energy.** *Plant Physiology*, p. 1558–1566, 2001.
- Neves, K. C. S., Porto, A. L. F., & Teixeira, M. F. S. (2006). **Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular.** *Acta Amazonica*, 36(3), 299-306.
- Dos Santos Nunes, E; DE Souza, M. A. A.; De Melo Vaz, A. F., De Sá Santana, G. M., Gomes, F. S., Coelho, L. C. B. B., ... & Guarnieri, M. C. (2011). **Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(1), 57-63.
- Olaizola, M. (2003). **Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace.** *Biomolecular Engineering*. v. 20, p. 459-466.
- Oliveira, J. T., Melo, V. M., Câmara, M. F., Vasconcelos, I. M., Beltramini, L. M., Machado, O. L., ... & Capistrano, G. G. (2002). **Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from Luetzelburgia auriculata.** *Phytochemistry*, 61(3), 301-310.
- Oliveira, L. C., & Cozac, A. P. C. (2003). **Reações transfusionais: diagnóstico e tratamento.** *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, 36(2/4), 431-438.
- Ourth, D. D., Narra, M. B., & Chung, K. T. (2005). **Isolation of mannose-binding C-type lectin from Heliothis virescens pupae.** *Biochemical and biophysical research communications*, 335(4), 1085-1089.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). **Lectins as plant defense proteins.** *Plant physiology*, 109(2), 347.
- Peumans, W. J., Rougé, P., & Van Damme, E. J. (2003). **The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker.** *Biochemical Journal*, 376(3), 717-724.

- Pinto, V., Debray, H., Dus, D., Teixeira, E. H., De Oliveira, T. M., Carneiro, V. A., ... & Sampaio, A. H. (2009). **Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells.** *Advances in pharmacological sciences*, 2009.
- Movafagh, A., Ghanati, K., Amani, D., Mahdavi, S. M., Hashemi, M., Abdolahi, D. Z., ... & Safari, S. (2013). **The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins.** *Journal of Paramedical Sciences*, 4.
- Povinel, K. L.; Finardi Filho, F. (2002). **The multiple functions of plant lectins.** *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition*, São Paulo, v. 24, p. 135.
- Pulz, O. & Gross, W. (2004). **Valuable products from biotechnology of microalgae.** *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). **Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production.** *Applied energy*, 103, 444-467.
- Rego, E. J. L.; Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J.C. (2002) **Lectins from seda of *Crotalaria pallida* (*Smoth rattlexbox*).** *Phytochemistry*, S.I. v. 60, n. 5, p. 441 – 446, July 2002.
- Richmond, A. (ed). 2004. **Handbook of microalgal culture: bio-technology and applied phycology.** Blackwell Science, Oxford, UK, 566pp
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum, New York, USA, p.29-60
- Rogers, D. J., & Hori, K. (1993). **Marine algal lectins: new developments.** *Hydrobiologia*, 260(1), 589-593.
- Sacchettini, J. C., Baum, L. G., & Brewer, C. F. (2001). **Multivalent protein-carbohydrate interactions. a new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction.** *Biochemistry*, 40(10), 3009-3015.
- Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A., Ei-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., & Jeon, B. H. (2017). **Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1189-1211.
- Santi-Gadelha, T., De Almeida Gadelha, C. A., Aragão, K. S., Mota, M. R. L., Gomes, R. C., de Freitas Pires, A., ... & Assreuy, A. M. S. (2006). **Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(4), 1050-1055.
- Sato, Y., Murakami, M., Miyazawa, K., & Hori, K. (2000). **Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 169-177.
- Sharon, N., & Lis, H. (2001). **The structural basis for carbohydrate recognition by lectins.** In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2* (pp. 1-16). Springer, Boston, MA.
- Silva, M. D., R. A., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Santos, N. D., Albuquerque, A. C., ... & Coelho, L. C. (2009). **Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin:**

Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 334-340.

Silva, C. D. C. (2012). **Purificação e caracterização parcial de uma lectina presente no soro do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*):** atividade imunomodulatória em esplenócitos de camundongos.

Silva, R. J. A. D. (2017). **Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia).**

Singh, R. S., Kaur, H. P., & Kennedy, J. F. (2017). **Modulation of immunocyte functions by a mucin-specific lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*.** *International journal of biological macromolecules*, 101, 172-178.

Singh, R. S., Walia, A. K., Kaur, J., Singh, D. P., & Rajput, A. (2018). **New cell surface bound lectins with complex carbohydrate specificity from members of green algae.**

Slade, R., & Bauen, A. (2013). **Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects.** *Biomass and bioenergy*, 53, 29-38.

Souza, M. A., Amâncio-Pereira, F., Cardoso, C. R. B., Silva, A. G. D., Silva, E. G., Andrade, L. R., ... & Afonso-Cardoso, S. R. (2005). **Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 705-716.

Souza, S. R.; Scherer.; Marisa, D.(2001) **Anovelmo delto characterize the double electriclayero flectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface.** *Carbohydrate Polymers*, v. 46, p. 191-193.

Stankiewicz, E. H.; Andrade, L. F.; Domingues, L. L. (1981). **Levantamento ficológico do Rio Iguaçu, algas unicelulares – I.** 1. Ed. Curitiba: surhema.

Stephenson, L. E.; Campbell. (2010). **Avaliação do ciclo de vida da produção potencial de biodiesel de algas no Reino Unido: uma comparação de pistas e biorreatores tubulares de elevação de ar.** *Energ Fuel* , 24, 7, p. 4062 – 4077.

Sun, J., & Simsek, H. (2017). **Bioavailability of wastewater derived dissolved organic nitrogen to green microalgae *Selenastrum capricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlorella vulgaris* with/without presence of bacteria.** *Journal of Environmental Sciences*, 57, 346-355.

Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). **Lectins: production and practical applications.** *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 45-55.

Takahashi, K. G., Kuroda, T., & Muroga, K. (2008). **Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 45-52.

Teixeira, E. H., Arruda, F. V. S., DO Nascimento, K. S., Carneiro, V. A., Nagno, C. S., Da Silva, B. R.,... & Cavada, B. S. (2012). **Biological applications of plants and algae lectins: an overview.** In *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. Intech Open.

Terada, T., Watanabe, Y., Tateno, H., Naganuma, T., Ogawa, T., Muramoto, K., & Kamiya, H. (2007). **Structural characterization of a rhamnose-binding**

glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(4), 617-629.

Trainor F. R. 91998). **Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity.** Nova Hedwigia, Beiheft.

Van Buul, V. J., & Brouns, F. J. (2014). **Health effects of wheat lectins: A review.** *Journal of cereal science*, 59(2), 112-117.

Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., & Peumans, W. J. (1991). **Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex.** *Planta*, 183(2), 258-264.

Wittsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., & Sakulborirug, C. (1998). **A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*).** *Phytochemistry*, 47(2), 183-187.

Xu, W. T., Wang, X. W., Zhang, X. W., Zhao, X. F., Yu, X. Q., & Wang, J. X. (2010). **A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*.** *Amino Acids*, 39(5), 1227-1239.

5. ARTIGO SUBMETIDO (MARINE BIOTECHNOLOGY)

A microalga verde *Scenedesmus* sp. (= *Tetradesmus obliquus*) como fonte de lectina para o reconhecimento de sangue tipo ABO: purificação e caracterização

Silva, A. J^a; Cavalcanti, V.L.R^a; Porto, A.L.F^a; Gama, W.A^b; Brandão-Costa, R.M.P.^a; Bezerra, R.P^{a*}.

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife/PE, Brasil.

^bDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife/PE, Brasil.

*Autor correspondente:

Prof. Raquel Pedrosa Bezerra

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife/PE, Brasil. Tel: +55.81.3320-6345

Fax: +55.81.3320-6345

E-mail: rpbezerra@yahoo.com.br

RESUMO

Lectinas tem aplicações potenciais na agricultura, na medicina, na pesquisa biotecnológica e tem se tornado uma importante ferramenta na identificação de diferentes grupos sanguíneos. Pode ser obtida a partir de diferentes fontes, como microalgas. *Tetradismus obliquus* pertence a um grupo de microalgas verdes que produzem bioativos com alto valor agregado. Uma nova lectina foi purificada da microalga *Tetradismus obliquus* por cromatografia de troca iônica e caracterizada por determinação molecular de massa, reconhecimento de sangue humano e de coelho tipo ABO, inibição por carboidrato e glicoproteína, pH ideal e temperatura e sua estabilidade. Lectina foi efetivamente purificada com 2 a 3 vezes usando troca iônica. Ela aglutinou tipo humano O e eritrócitos de coelho, mas não eritrócitos humanos dos tipos A1, A2, A, B e AB. Lectina apresentou pH ideal entre 7.0 - 7.5 e estável por 90 minutos enquanto a temperatura ideal de 20-50 °C apresentou uma termo estabilidade muito boa. A lectina tem aparente massa molecular de 78 kDa, determinada por filtragem de gel e sua atividade foi diminuindo na presença de íons e inibida apenas pelas glicoproteínas azoalbumina, azocaseína e albumina, características que indicam que a lectina da *Tetradismus obliquus* é única entre lectinas de microalgas.

Palavras-chave: tipo ABO, caracterização bioquímica, Chlorophyceae Haemagglutinins, isolamento.

1. INTRODUÇÃO

Lectina ou hemaglutininas são proteínas/glicoproteínas vinculadoras de carboidrato reversivelmente de origem não-imune com múltiplos potenciais de aplicação na agricultura, medicina e pesquisa biotecnológica. Tem sido bem documentado que lectinas desempenham papéis importantes em reconhecimento celular e molecular e vem sendo explorada como portadora de agentes quimioterapêuticos, biomarcadora de microorganismos específicos, potenciais reagentes diagnósticos, e drogas anticâncer, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória e atividade larvicida (Coelho et al. 2017).

Além disso, lectinas parecem comparáveis a anticorpos em sua sensibilidade e essa propriedade é útil em campos clínicos. Demonstra alta reação específica a diferentes carboidratos que estão presentes na superfície da membrana dos eritrócitos, vincula-se a glicoproteínas ou glicolipídios, especifica grupos sanguíneos ABO ou MN. Recentemente, um número limitado de lectinas tem sido usadas no reconhecimento de grupos sanguíneos. No grupo sanguíneo ABO especialmente, lectinas de *Dolichos biflorus*, *Vicia craca*, *Phaseolus limensis*, *Otola lactea* and *Crotolaria striata* potencialmente reconhecem grupo sanguíneo substância-A (Khan et al. 2002), mas apenas lectinas de *Dolichos biflorus* são consideradas comercialmente Anti-A1.

Lectinas são difundidas na distribuição e tem sido isoladas de vírus, bactéria, fungo, insetos, plantas, algas e vertebrados. Lectinas purificadas em diferentes espécies ou até as mesmas espécies podem mostrar diferenças nas estruturas, no tamanho molecular e especificidade de carboidrato, resultando em diferentes propriedades biológicas.

Lectinas de plantas foram intensamente estudadas, especialmente de *Canavalia* spp. Contudo, lectinas extraídas de microorganismos fotossintéticos são pouco conhecidos. Na literatura, existem registros de lectinas extraídas dos microorganismos fotossintéticos *Nostoc*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Scytonema*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus* e *Chlorococcum*. Apesar de um progresso considerável ter sido feito em entender a distribuição e característica bioquímica de lectinas em microalgas, muito menos é sabido sobre as lectinas de algas do que daquelas derivadas de plantas. Isso significa que a utilização de lectinas de algas não é tão avançado quanto a de lectinas de outras fontes.

Tetradismus obliquus é uma microalga verde recentemente taxonomicamente rearranjada, com algumas espécies dos gêneros *Acutodesmus* e *Scenedesmus* genero incluindo *Scenedesmus acutus* (detalhes em Wynne e Hallan, 2016). Esse grupo de microalgas (Chlorophyceae Scenedesmaceae) podem ser uma fonte promissora de lectinas, pois já mostrou produzir uma grande variedade de produtos bioativos com valores comerciais potenciais, como lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas, aminoácidos e betacaroteno que são usados como matéria prima para produção de energia, aditivos alimentícios, alimentos, cosméticos e medicina (Ishaq et al. 2016). Além disso, bioprocessos de microalgas tem sido destacados porque não competem com cultivos de alimentos, que requerem terra arável e podem usar restos como nutrientes para o seu desenvolvimento.

No presente estudo, uma lectina de microalga *Tetradismus obliquus* foi purificada, caracterizada e avaliada por seu potencial e aglutinação da diferença em grupo sanguíneo.

2. MATERAIS E MÉTODOS

2.1. MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Tetradismus obliquus (A5F5402) foi isolado do Açude de Apipucos (Recife, Pernambuco, Brasil, coordenadas 8° 1'13.08"S; 34°55'56.51"W) e cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 ml, cada um contendo 50ml de líquido médio BG-1, temperatura de 30 ± 1°C, intensidade de luz contínua de 52 ± 4 μmol fótons m⁻² s⁻¹, sob constante arejamento por 15 dias, quando alcançado no fim da fase de crescimento logarítmico. Então as células foram removidas por filtragem, secas e usadas para análise adicional.

2.2. EXTRAÇÃO DE LECTINA

A biomassa seca foi homogeneizada na concentração de 100 mg mL⁻¹ em uma solução tampão salina Tris-HCl (0.2 M, pH 7.2), usando um homogeneizador magnético por 9 horas a 4 °C (CHU et al. 2006). O homogeneizado foi centrifugado a 10 000 xg por 8 minutos a 4 °C. O fluante foi o extrato bruto da microalga *Tetradismus obliquus*.

2.3. PASSO DE PRECIPITAÇÃO

O extrato bruto foi precipitado adicionando sulfato de amônia lentamente ao extrato celular clarificado com mexidas gentis a 4 °C até que a solução estivesse saturada a concentração de 0-60% e 60 – 80% (w/v). A proteína precipitada por centrifugação (8000xg por 30 minutos) foi dissolvida em 10 mM Tris-HCl de solução tampão (pH 7.5) e dialisado com a mesma solução por 18h a 4 °C. Depois da diálise, a atividade hemaglutinante e o conteúdo proteico de cada fração foram estimados.

2.4. PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *SCENEDESMUS* SP. (= *TETRADESMUS OBLIQUUS*)

A lectina *T. obliquus* foi purificada usando cromatografia de troca iônica de uma etapa. O flutuante (extrato bruto) de *T. obliquus* precipitado foi carregado em cromatografia de troca aniônica usando uma coluna de DEAE Sephadex A-50 (1.6 cm x 10 cm) pre equilibrado com 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.2. A fração não absorvida foi eluída com a solução tampão equilibradora. Eluição foi mantida numa taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ e a absorção foi monitorada a 280 nm. O pico foi pooled, concentrado e atividade hemaglutinante foi determinada.

2.5. DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRÁFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NUMA COLUNA FPLC-SUPERDEX G-75

Massa molecular da lectina *T. obliquus* purificada foi determinada por filtração em gel. Brevemente, depois de usar cromatografia aniônica em DEAE-sephadex, frações exibindo atividade hemaglutinante foram agrupadas, concentradas, e injetadas em uma coluna de fluxo rápido FPLC- Superdex G-75 HR10/300GL (1.0 cm x 80 cm) (AKTATM avant 25, Uppsala, Suécia) pré-equilibrada com solução tampão de 10 mM Tris-HCl (pH 7.0). A taxa de eluição foi 1 mL min⁻¹ e a absorção determinada a 280 nm. Picos foram usados para determinar a atividade hemaglutinante. Determinações de peso foram alcançadas usando o kit de marcadores de filtração em gel para peso de proteína molecular 6,500-66,000 da Sigma-Aldrich.

2.6. TESTE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante em eritrócitos tratados com glutaraldeído foi realizada usando o método relatado por Correia e Coelho (1995). Duas diluições seriadas da amostra (50 µL) foram misturadas com 2.5% (v/v) de solução tampão de eritrócitos (50 µL) a 25 °C numa placa de microtitulação de 96 poços. Salina foi usada como controle branco e os resultados foram registrados depois de incubação a 25 °C por 45 minutos. A atividade da lectina foi determinada por sua

habilidade em aglutinar eritrócitos. A hemaglutinação foi registrada visualmente e a formação de tapete indicou a presença da atividade da lectina, enquanto a formação de botões no fundo da cavidade mostrou a ausência da atividade da lectina. O número máximo de uma diluição serial de duas vezes da amostra mostrando atividade hemaglutinante foi definida como a titulação hemaglutinante (U).

2.7. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração total de proteína foi mensurada pelo método de Smith et al. (1985), usando albumina de sêrum bovino como a proteína padrão de acordo com o procedimento do fabricante (Pierce, Rockford, IL, EUA).

2.8. AMOSTRA DE ERITRÓCITOS

Os eritrócitos foram obtidos de amostras de sangue de coelho e humano dos grupos A, B, AB, O e os subgrupos A1 e A2. O sangue foi misturado com 1/10 volume de 3.7% Na-citrato e centrifugado a 8000 xg por 20 minutos e reservado até o uso. Todas as amostras de sangue humano coletadas usadas no laboratório foram aprovadas pelo Institutional Animal Ethics Committee (IAEC), Brasil, diretrizes (CAAE NUMBER.70381317.0.0000.5207).

O reconhecimento do subgrupo A1 foi realizado usando a técnica de tubo da empresa (Lorne Laboratories LTD, 2017). A uma suspensão de células vermelhas (eritrócitos) de 2-3% foi lavada 3 vezes em solução PBS e adicionado o reagente Lorne lectina Anti-A1 (*Dolichos biflorus*) em um teste de tubo como controle positivo.

2.9. INIBIÇÃO HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES E GLICOPRETEÍNAS

Sacarídeos com alta afinidade pela lectina poderiam bloquear o binding site da lectina de glicoproteínas/glicolipídios de células sanguíneas vermelhas, inibindo a hemaglutinação. A análise da inibição do açúcar foi realizada de maneira análoga ao teste de hemaglutinação. Diluições seriadas de duas series de 25 µl de vários açúcares (20 mM) ou amostras de glicoproteínas (1%) foram preparadas em uma placa de microtitulação em forma de U de 96 alvéolos. Depois disso, 25 µl de amostra de lectina com 2048 unidades hemaglutinantes foram adicionadas a solução. A lâmina foi encubada em temperatura ambiente por 40 min seguida da adição de 50 µl de 2.5% suspensão de eritrócitos de coelho a cada alvéolo. O número de alvéolos que mostraram hemaglutinação foi contabilizado e comparado para controle, no qual PBS foi adicionado ao invés de açúcar ou solução de glicoproteína. Açúcares utilizados incluíram ramnose, arabinose, frutose, glucose, sucrose, galactose, rafinose; e glicoproteínas foram lactoferrina, azalbumina, azocaseína, lisozima e albumina. A atividade residual foi determinada sob condições de análise padrão e expressada em porcentagem atividade relativa comparada a amostras de controle.

2.10. EFEITO DE ÍONS NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A lectina purificada foi pré-incubada em temperatura ambiente por 30 min com 10 mM de vários íons como ZnSO₄, ZnCl₂, FeCl₃, FeCl₂, MnSO₄, CaCl₂, CuSO₄, MgSO₄, Na₂S₂O₃ e K₂S₂O₅. Então, 2.5% de eritrócitos de sistema de coelho (v/v) foram adicionados e as amostras foram incubadas em um banho de água a 37 °C por 120 min. Depois da incubação, a atividade hemaglutinante foi analisada como descrito anteriormente.

2.10.1. EFEITO DE pH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A influência do pH na atividade hemaglutinante foi determinada incubando lectina purificada a 25 °C por 30 min em soluções tampão 10 mM de pHs diferentes: fosfato de citrato (pH 4.0 – 7.5) e Tris-HCl (pH 7.0 – 9.0), glicina-NaOH (10.0). Para determinar estabilidade de pH, a lectina purificada (50 µl) foi incubada com buffers (50 µl) a 25 °C de vários pHs e depois as amostras foram neutralizadas e a atividade foi examinada após 30 min, 60 min e 90 min para elucidar a estabilidade do pH da lectina em pHs variados. A atividade residual foi determinada sob condições de análise padrão.

Para determinar a temperatura ideal, a atividade hemaglutinante foi mensurada a temperaturas que variaram entre 20 e 100 °C. A estabilidade térmica foi examinada com pré-incubação da lectina purificada a temperaturas determinadas depois de 30, 60 e 90 min de incubação e analisada para hemaglutinação sob condições de análise padrão.

3. RESULTADOS

O extrato de *T. obliquus* aglutinou eritrócitos de coelho obtidos titer mais altos do que 2^{24} (Tabela 1) e foi usado para etapas de purificação. A lectina do *T. obliquus* foi purificada por etapas de cromatografia, a saber cromatografia de troca iônica com coluna DEAE-sephadex, que revelou uma forte atividade de adglutinação (Tabela 1). A primeira etapa da purificação foi a precipitação do sulfato de amônia. O extrato bruto obtido do *T. obliquus* foi submetido a precipitação em sulfato de amônia em duas frações com valores de saturação crescentes, 0-60% e 60-80% para determinar em qual fração precipitada haveria maior concentração de atividade hemaglutinante. Foi observado que fração saturada de 60-80% apresentou uma atividade hemaglutinante mais alta (Tabela 1), sendo selecionada para a purificação por cromatografia. Contudo, a fração de 0-60% também teve uma concentração significativa de proteína com baixa atividade hemaglutinante.

A precipitação obtida com uma saturação de sulfato de amônia 60-80% foi dessalgada por diálise e então aplicada a uma coluna de cromatografia de troca aniônica. O perfil de eluição da cromatografia DEAE-sephadex é mostrado na (Figura 1). A lectina foi eluída em apenas uma fração (0-10) foi coletada e agrupada e a titulação foi de 1,536.0 com atividade específica de 493,494.0 titulação mg^{-1} . Um sumário do processo de purificação da lectina é mostrado na Tabela 1. A lectina foi purificada 2.8-fold com uma produção no geral de 37%.

A fração coletada da DEAE-sephadex foi concentrada por liofilização seguido por cromatografia de exclusão molecular com a coluna Sephadex G-50, obtendo dois picos (Fração I e Fração II, Figura 2). Apenas o primeiro pico apresenta atividade com valor de 119,070 titulação mg^{-1} e massa molecular estimada de 78 kDa.

A atividade hemaglutinante da lectina purificada foi testada com eritrócitos humanos tipo A1, A2, B, AB e O. A tabela 2 resume os resultados das titulações da hemaglutinação. Entre os eritrócitos analisados (sangue humano dos grupos A1, A2, B, AB e O), a lectina do *T. obliquus* demonstrou uma preferência apenas pelos eritrócitos do grupo sanguíneo humano O.

A atividade hemaglutinante da lectina purificada do *T. obliquus* não foi inibida por nenhum dos monossacarídeos, dissacarídeo de sacarose, lisozima, glicoproteína da lactoferrina, enquanto que foi inibida pelas glicoproteínas da azalbumina, azocaseína e albumina (Tabela 4). A lectina de *T. obliquus* apresentou atividade ideal a um pH 7.0 -7.5 e temperatura entre 20 – 50 °C. Estabilidade térmica foi determinada incubando a lectina a 25 – 100 °C em um banho de água por 0 – 90 min. A lectina não foi afetada pela exposição a uma temperatura de 50 °C por 90 min, mas diminuiu rapidamente, alcançando 6.25% do valor de controle, quando aquecida a 60 °C por 30 min. A atividade hemaglutinante foi totalmente anulada quando a lectina foi aquecida a 70 °C por 30 min. A lectina apresentou estabilidade térmica mantendo 100% de atividade a 50 °C mesmo depois de 60 min, e manteve atividade de 50% do valor de controle por 90 min, enquanto a atividade da lectina se mostrou perdida a temperaturas superiores a 70 °C.

A presença de íons afetou a atividade da hemaglutinante causada pela lectina de *T. obliquus*. Todos os íons avaliados reduziram a atividade hemaglutinante em mais de 90% e a maior inibição foi com CaCl₂, quando ela foi completamente inibida.

4. DISCUSSÃO

A atividade hemaglutinante do extrato de *T. obliquus* foi mais alta do que a de diferentes extratos de microalgas. Entre dezoito espécies de *Chlorella*, dezesseis espécies de *Chlamydomonas*, três espécies de *Spirulina*, duas espécies de *Scenedesmus* e uma espécie de cada uma das seguintes: *Synechococcus*, *Selenstrum*, *Monoraphidium*, *Coelastrum* e *Eutetramorus*. Espécies *Scenedesmus* obtiveram um valor alto de 2^8 usando 20% de etanol e acetona (1:10, w/v) para extrair a preparação (Chu et al. 2004). Essa diferença de titulação deve ser devido ao solvente e/ou método de extração usado para obter o extrato com atividade hemaglutinante. Singh et al. (2018) relata que microalgas *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum infusiformi*, *Desmodesmus subspicatus* e *Desmodesmus dimorphus* têm superfície celular que vincula a atividade da lectina. Portanto, a extração usando agitação magnética na solução tampão Tris-HCl pH 7.0 deve ter fornecido altos valores de atividade hemaglutinante nos extratos de *T. obliquus*.

Ademais, a alta atividade hemaglutinante no extrato de *T. obliquus* também pode se justificar pela presença de polifenóis que causam falsa atividade hemaglutinante. Estudos anteriores mostraram que os gêneros *Scenedesmus* contem altas concentrações de polifenóis, que imitam a hemaglutinação mediada pela lectina (Shetty et al. 2015; Strejckova et al. 2016; Hamed et al. 2017). Nesse contexto, a purificação da proteína com atividade hemaglutinante se torna necessária para indicar a presença da lectina nos extratos de *T. obliquus*.

O isolamento de lectinas pode ser alcançado por uma combinação de várias etapas de purificação. Ácidos (ex.: ácido acético; Naeem et al. 2007), solvente orgânico (ex.: acetona; Medeiros et al. 2010) ou sal (ex.: sulfato de amônia) podem ser usados para precipitar lectinas. Precipitação com sulfato de amônia com concentração de 60-70% é a mais amplamente usada, como relatado por Raja et al. (2011) usando 60% para precipitar lectina de fruta *Aegle marmelos*; Abreu et al. (2018) usando 70% para precipitar a lectina da *Solieria filiformis* (SfL); Yi et al. (2003) usando 75% para precipitar a lectina da *Chlorella pyrenoidosa*. Corroborando com o presente trabalho, que apresentou atividade hemaglutinante mais alta na fração 60-80% (Tabela 1). Por outro lado, frações mais baixas de

sulfato de amônia (0-60%) também podem precipitar proteína com fraca atividade hemaglutinante (Tabela 10), como observado na lectina da cianobactéria *Oscillatoria agardhii* que foi precipitada com 20-60% de sulfato de amônia (Sato et al. 2000).

A lectina da *T. obliquus* foi purificada usando apenas uma coluna de cromatografia de troca aniônica DEAE-sephandex. Outras lectinas de microalgas têm sido purificadas usando abordagens cromatográficas convencionais (Sato et al. 2000; Melo et al. 2004). A maioria dos relatos de atividade da lectina de outras microalgas e cianobactéria revelam protocolos de purificação com múltiplas etapas. A purificação de uma etapa da lectina demonstra a eficiência do procedimento.

A maioria das proteínas isoladas de algas, microalgas e cianobactérias são proteínas de baixo peso molecular, com valores entre 3.5 kDa e 57 kDa. Portanto, a massa molecular original de 78 kDa estimada para a lectina da *T. obliquus* com filtragem em gel foi considerada alta quando comparada com lectinas isoladas da maioria das espécies de microalgas e cianobactérias, como a cianobactéria *Spirogyra* spp (56 kDa; Oliveira et al. 2017), *Microcystis aeruginosa* (57 kDa, Yamaguchi et al. 1998), *Microcystis viridis* (12.2 kDa; Yamaguchi et al. 1999); *Nostoc* (11kDa); *Oscillatoria agardhii* (13 kDa, Sato et al. 2000); *Scytonema varium* (9.7 kDa; Bokesch et al. 2003); *Chlorella pyrenoidosa* (15 kDa; Yi et al. 2003).

A lectina da *T. obliquus* was specificity para eritrócitos humanos tipo O. Sangue humano do tipo O possui ácidos siálicos em quantidade mais baixa quando comparados a outros tipos de sangue humano (Bulai et. al 2003) e eritrócitos de coelho têm sido anteriormente relatados como apresentando baixa quantidade de ácido siálico na superfície (Munksgaard et a. 2014; Ish et al. 1993). Logo, a lectina da *T. obliquus* identifica eritrócitos pobres em ácido siálico. Resultados similares foram observados por hemaglutinantes de Chlorophyceae *Ankistrodesmus* sp. (titulação = 2^{25}) e *Chlorella ellipsoidea* (titulação = 2^3) (Liao-Huang et al. 2000). Chu et al. (2004) relatou que os extratos de *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus ecornis* aglutinaram o tipo O mais fortemente do que tipos sanguíneos humanos A ou B e que a lectina da *C. pyrenoidosa* aglutinou eritrócitos de coelho, ovelha e pombo mas não de pato,

galinha e humanos com grupos de células sanguíneas A, B ou O com atividade mais alta que eritrócitos de coelho (Hung et al. 2012). Este estudo é consistente com outros relatos sobre a atividade de microalgas hemaglutinantes de eritrócitos O de humano e de coelho (Chu et al. 2004; Liao e Huang 2000; Hung et al. 2012).

A lectina da *T. obliquus* não aglutinou eritrócitos subtipos A1 e A2. Tal constatação pode ser justificada pela presença de algumas glicoproteínas presentes da superfície dos eritrócitos que promovem uma inibição da vinculação da lectina para carboidratos na superfície da célula sanguínea. Na literatura, poucas lectinas diferenciam subgrupos A1 e A2. *Dolichos biflorus* é a mais conhecida em sorologia de rotina imunohematologia de grupos sanguíneos por reconhecer apenas eritrócitos A1. Essa lectina é amplamente utilizada em bancos de sangue para identificação dos subgrupos A1 e A2 nos casos discrepância do sistema ABO. As lectinas da *Vicia cracca*, *Phaseolus limensi* e *Crotolaria striata* também têm se mostrado potentes em atividade anti-A (Renkonen 1948; Khang et al. 1990; Khan et al. 2002).

Apenas glicoproteínas azoalbumin, azocasein e albumin inibiram a atividade hemaglutinante da lectina de *T. obliquus* purificada. Isso sugere que as lectinas da *T. obliquus* provavelmente têm uma especificidade de carboidratos complexa. Essas propriedades também são características de muitas lectinas de macroalgas marinhas, como a *Chlorophyta* (Hung et al. 2012) e da lectina da *Oscillatoria cyanobacterium* (Sato et al. 2000).

A lectina purificada da *T. obliquus* mostrou atividade ideal com pH 7.0 – 7.5 e ficou estável após 90 min, perdendo sua atividade fora dessa faixa. A mudança no estado de ionização de uma molécula afetada pelo pH determina efeito vinculativo entre a membrana da lectina e do eritrócito, levando a uma perda de atividade. 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. Anteriormente, uma lectina de alga das algas vermelhas *Acrocystis nanae* *Tichocarpus crinitus* também foram relatadas como mantendo sua máxima atividade hemaglutinante dentro de uma faixa de pH entre 6.0 - 7.0 e 7.0 – 8.0, respectivamente (Anam et al. 2017; Molchanova et al. 2010).

A lectina de *T. obliquus* demonstrou a temperatura ideal 20 – 50 °C e ficou estável quando exposta a uma temperatura de 50 °C por 90 min. Resultados similares foram observados em lectinas com alta massa molecular como a lectina

da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* (Melo et al. 2004). Por outro lado, a lectina da *Chlorella pyrenoidosa* (14- 15 kDa) foi tolerante a alta temperatura e sua atividade pôde ser mantida até quando a solução de lectina foi aquecida a 90 °C por 10 min (Yi et al. 2003). Normalmente, a lectina com baixa massa molecular é mais termoestável devido a estrutura tridimensional da proteína e a presença de cisteínas formando ligações de dissulfeto (Nagano et al. 2002; Nascimento et al. 2006).

A adição de íons influenciou a atividade hemaglutinante. Como visto em muitas lectinas de algas, a maioria das lectinas foram não-dependentes de cátions divalentes (Chaves et al. 2018; Alvarez-Hernández et al. 1999), como a lectina da alga *Amansia mulifida* (Costa et al. 1999), *Bryothamnion triquetrum* (Calyete et al., 2000), *Hypnea musciformis* (Nagano et al. 2002) e *Tichocarpus crinitus* (Molchanova et al. 2010).

Em suma, nós documentamos a purificação e caracterização de um novo tipo de lectina isolado do *T. obliquus* que é facilmente massivamente cultivada em laboratório, tornando fácil fornecer lectina efetiva. Ela tem características únicas como um alto peso molecular, inibição por diferentes íons, especificidade por eritrócitos pobres de ácido siálico, carboidrato complexo e não aglutinação de sangue humano tipos A, B e AB. Desta forma, essa lectina pode ser considerada uma alternativa para aplicabilidade em diversas áreas da biotecnologia, além de informações construtivas sobre lectinas de microalgas.

5. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Esse estudo foi financiado como parte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código Financiador 001.

7. CONCLUSÃO

A lectina da microalga *Scenedesmus* sp.(=*Tetradadesmus obliquus*), foi cultivada, extraída e purificada. Apresenta característica distinta comparada às demais lectinas. A lectina deste micro-organismo fotossintetizante é uma fonte protéica relevante podendo contribuir em estudos posteriores. Os resultados obtidos desmosntra atividade térmica entre 20 a 50 °C, pH ótimo de 7,0 a 7,5, além de manter-se ativa na presença de monos e dissacarídeos. Estes resultados indicam que a microalga *Scenedesmus* sp. apresenta grande potencial biotecnológico, bem como uma fonte, nova e alternativa, para obtenção de lectinas que pode ser utilizadas em setores industriais, como farmacêutico e biomédico.

8. REFERÊNCIAS

Abreu TM, Monteiro VS, Martins ABS, Teles FB, Rivanor RLC, Mota EF, Macedo DS, Vasconcelos SMM, Júnio JERH, Benedive, NMB (2018) Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. *Int J Biol Macromol* 111:534–541.

Alvarez-Hernández S, De Lara-Isassi G, Arreguín-Espinoza R, Arreguín B, Hernández-Santoyo A, Rodríguez-Romero A (1999) Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. *Bot Mar* 42:573-580.

Anam C, Praseptiangga D, Nugraheni MA, Nurhayati T, Fajarningsih ND, Zilda DS, Chasanah E, Yunus A (2017) Preliminary Characterization of Crude Lectin Fraction of the Red Alga, *Acrocystis nana* from Wediombo Beach of the Southern Coast of Java Island, Gunung Kidul, Yogyakarta, Indonesia. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng Article ID 1234567890* 193;

Bokesch HR, O'Keefe BR, McKee TC, Pannell LK, Patterson GM, Gardella RS, Sowder RC 2nd, Turpin J, Watson K, Buckheit RW Jr, Boyd MR (2003) A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. *Biochemistry* 42:2578-2584.

Bulai T, Bratosin D, Pons A, Montreuil J, Zanetta JP (2003) Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acids in relation with blood groups. *FEBS Letters* 534:185-189.

Calvete JJ, Costa FHF, Saker-Sampio S, Murciano MPM, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Jr CB, Silveira SB, Freitas BT, Sampio AH (2000) The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine algae *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol Life Sci* 57:343–350

Chaves RP, Silva SR, Silva JPF, Carneiro RF, Sousa BL, Abreu JO, Carvalho FCT, Rocha CRC, Farias WR, Sousa OV, Silva ALC, Sampaio AH, Nagano CS (2018) *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family. *J Appl Phycol* 30:2629–2638.

Chu CY, Liao WR, Huang R, Lin LP (2004) Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalga. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 817–825.

Chu CY, Huang R, Lin LP (2007) Analysis of the agglutinating activity from unicellular algae. *J Appl Phycol* 19:401–408

Chu CY, Huang R, Lin LP (2006) Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:967–973.

Correa MTS, Coelho LCBB (1995) Purification of glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* (camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol* 55:261-273.

Coelho LCBB, Silva PMS, Lima VLM, Pontual EV, Paiva PMG, Napoleão TH, Correia MTS (2017) Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* Article ID 1594074:1-22.

Goldstein IJ, Poretz RD (1986) Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins, in: Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ (eds.), *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, Orlando, pp. 33–247.

Ishaq AG, Matias-Peralta HM, Basri H (2016) Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika J Trop Agric Sci* 39:1–16.

Hamed SM, Samy S, Klöck G, AbdElgawade H (2017) Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses *Ecotox Environ Safe* 144:19–25.

Hung LD, Ly BM, Trang VTD, Ngoc NTD, Hoa LT, Trinh PTH (2012) A new screening for hemagglutinins from Vietnamese marine macroalgae. *J Appl Phycol* 24:227–235.

Ish C, Ong GL, Desai N, Mattes MJ (1993) The specificity of alternative complement pathway-mediated lysis of erythrocytes: a survey of complement and target cells from 25 species. *Scand. J. Immunol.* 38:113–122.

Khan F, Khan RH, Sherwani A (2002) Mohmood S, Azfer MA Lectins as markers for blood grouping. *Med Sci Monit* 8:RA293–RA300.

Khang NQ, JeanLuc G, Hoebeke J (1990) Blood group A specific Lectin from the seeds of *Crotolaria striata*. *Biochem Biophys Acta*, 1033: 210-213

Liao WR, Huang R (2000) Agglutination of human and animal erythrocytes in marine unicellular algae. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:262–266

Medeiros DS, Medeiros TL, Ribeiro JKC, Monteiro NKV, Migliolo L, Uchoa AF, Vasconcelos IM, Oliveira AS, de Sales MP, Santos EA (2010) A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 155:211–216.

Melo F, Benevides NMB, Pereira MG, Holanda ML, Mendes FNP, Oliveira SRM, Freitas ALP, Silva LMCM (2004) Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. *Revista Brasil Bot* 27:263-269.

Molchanova V, Chernikov O, Chikalovets I, Lukyanov P (2010) Purification and partial characterization of the lectin from the marine alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr (Rhodophyta). *Bot Mar* 53:69–78.

Munksgaard PS, Skals M, Reinholdt J, Poulsen K, Jensen MR, Yang C, Leipziger J, Vorup-Jenses T, Praetorius HA (2014) Sialic Acid Residues Are Essential for Cell Lysis Mediated by Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 82:2219–2228.

Nagano CS, Moreno FBMB, Bloch C Jr, Prates MV, Calvete JJ, Saker-Sampaio S, Farias WRL, Tavares TD, Nascimento KS, Grangeiro TB, Cavada BS, Sampaio AH (2002) Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. *Prot Pept Lett* 9:159–165

Nascimento KS, Nagano CS, Nunes EV, Rodrigues GV, Calvete JJ, Saker S, Sampaio WRL, Farias SAH (2006) Isolation and characterization of a new agglutinin from red marine alga *Hypnea cervicornis* J Agardh. *Biochem Cell Biol* 84:49–54

Norton TA, Melkonian M, Andersen RA. (1996) Algal biodiversity. *Phycologia* 35:308–326.

Oliveira AS, Lóssio CF, Rangel AJ, Martins MGQ, Nascimento FEP, Andrade MLL, Cavada BS, Lacerda SR, Nascimento KS (2017) Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp. *An Acad Bras Cienc* 89:2113-2117.

Raja SB, Murali MR, Kumar NK, Devaraj SN, (2011) Isolation and partial characterisation of a novel lectin from *Aegle marmelos* fruit and its effect on adherence and invasion of Shigellae to HT29 Cells. *PLoS ONE* 6:1-9.

Renkonen KO (1948) Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae. *Ann Med Exp Biol Fenn* 26: 66-72.

Sato Y, Murakami M, Miyazawa K, Hori K (2000) Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comp Biochem Physiol B* 125:169–177.

Sharon N, Lis H (1995) Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem.* 30:59-75.

Shetty V, Sibi G (2015) Relationship Between Total Phenolics Content and Antioxidant Activities of Microalgae Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth. *J Food Resource Sci* 4:1-9.

Singh RS, Walia AK (2018) Lectins from red algae and their biomedical potential. *J Appl Phycol* 30:1833–1858.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.

Strejckova A, Dorak M, Hynstova V, Hedbavny J, Ridoskova A, Klejdus B, Huska D (2016) Effect of copper on secondary metabolism of microalgae *Scenedesmus quadricauda*. *Mendelnet*1017-1021.

Yamaguchi M, Jimbo M, Sakai R, Muramoto K, Kamiya H (1998) Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. *Comp Biochem Physiol B* 119:593–597.

Yamaguchi M, Ogawa T, Muramoto K, Kamio Y, Jimbo M, Kamiya H (1999) Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. *Biochem Biophys Res Commun*265:703-708.

Tabela 1. Sumário da purificação da *Tetrademus obliquus*

Step	Tiitulação total	Prot (mg mL ⁻¹)	Specific activity (titer/mg)	Yield (%)	Fold purification
Crude	16,777,216.0 ^a	1.02	- ^a	-	-
Precipitate 0-60%	24,567.0	0.40	61,440.0	-	-
Precipitate 60-80%	131,072	0.63	209,715.0	100	1.0
DEAE	40,960.0	0.08	493,494.0	31.3	2.4

^a Activity higher than 1,677,216 (>2²⁴)

^bIt was no possible calculate

Tabela 2. Especificidade de grupo sanguíneos da lectinas de *Tetrademus obliquus*

Especificidade de grupo sanguíneo	Atividade hemaglutinante
A1	0.00
A2	0.00
B	0.00
AB	0.00
O	2048
Coelho	2048

Tabela 3. Efeitos de vários carboidratos e glicoproteínas da lectina purificada (atividade hemaglutinante inicial: 2048 U).

Carboidrato (20 mM)	Atividade residual (%)
L-rhaminose	100
L-arabinose	100
D-sucarose	100
D-glucose	100
D-galactose	100
D-raffinose	100
Glicoproteína (1.0 %)	
Lactoferrina	100
Azoalbumina	0.00
Azocaseína	0.00
Lisozina	100
Albumina	0.00

Tabela 4. Efeitos de íons metálicos na lectina (Atividade hemaglutinante inicial 2048U).

Íons	Atividade residual (%)
ZnSO ₄	0.59
ZnCl ₂	0.59
FeCl ₃	6.25
FeCl ₂	2.64
MnSO ₄	0.29
CaCl ₂	0.00
CuSO ₄	4.15
MgSO ₄	0.59
Na ₂ S ₂ O ₃	2.54
K ₂ S ₂ O ₅	2.05

Legendas das figuras

Fig. 1. Padrão de eluição da lectina durante cromatografia de troca aniônica no DEAE- sephadex.

Fig. 2. Cromatografia de exclusão de tamanho da lectina do *Tetradismus obliquus* na FPLC- Sephadex G-50 Column. Fração I mostrou título hemaglutinante.

Fig. 3. Efeito do pH (●) e estabilidade por 90 min (■) na atividade da lectina do *Tetradismus obliquus*.

Fig. 4. Efeito da temperatura (●) e estabilidade por 90 min (■) na atividade da lectina do *Tetradismus obliquus*.

Figura 1.

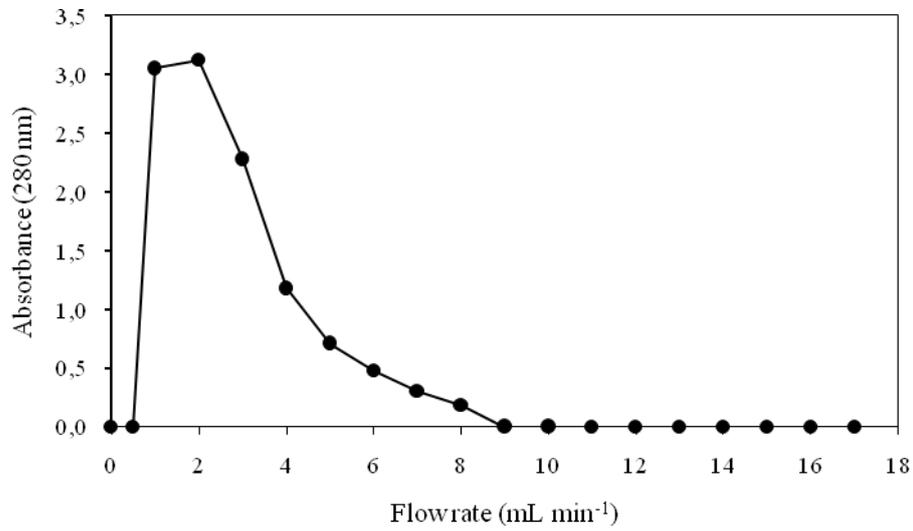


Figura 2

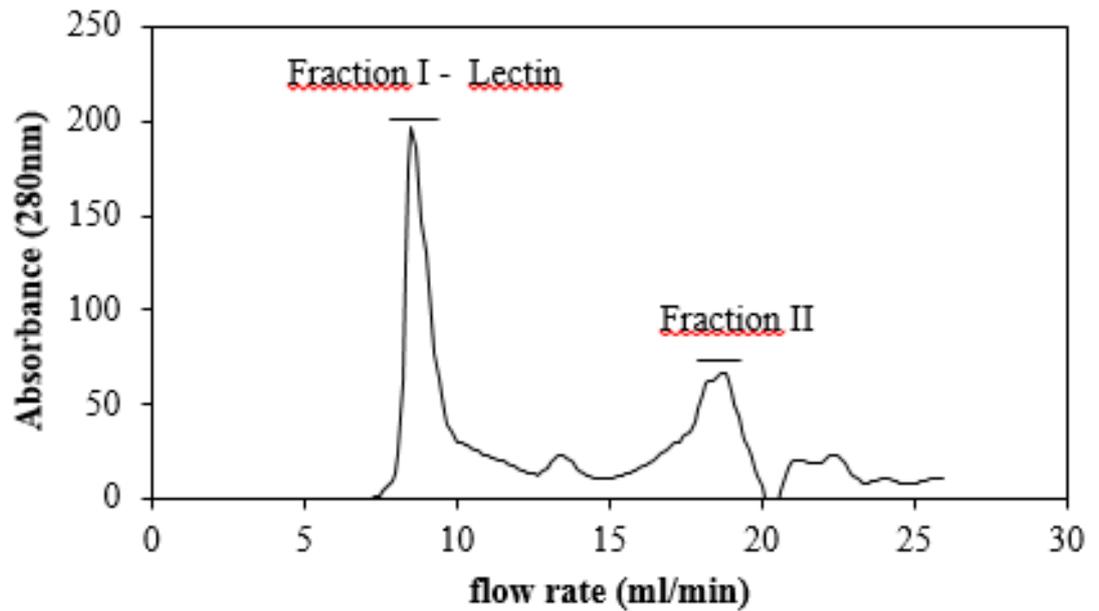


Figura 3

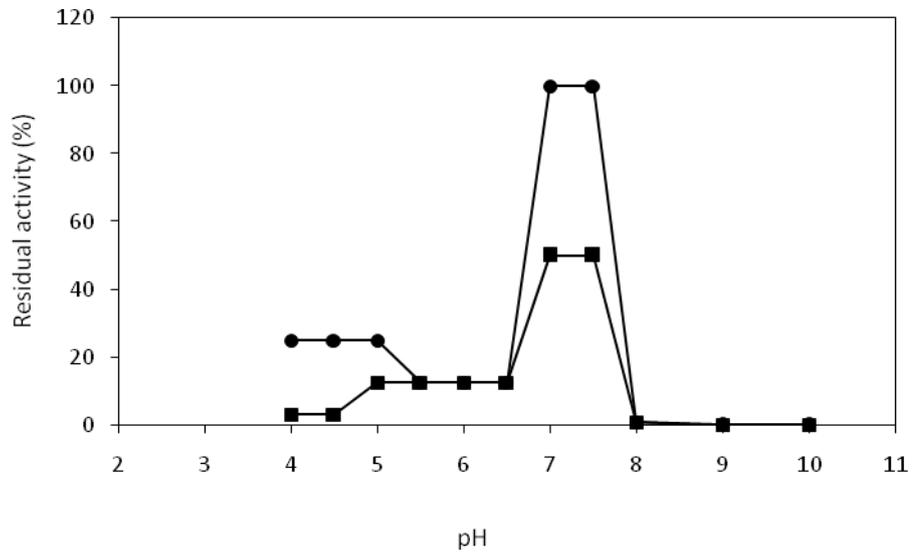
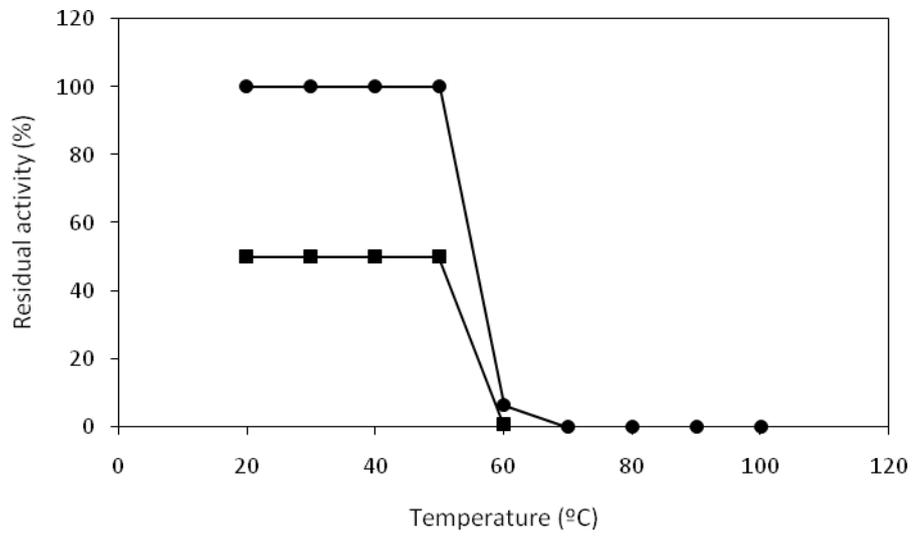


Figura 4



9. Anexos

9.1. Anexo 1

UNIVERSIDADE DE
PERNAMBUCO/ PROPEGE/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Purificação e Caracterização de enzimas fibrinolíticas e lectinas produzidas por micro-organismos

Pesquisador: RAQUEL PEDROSA BEZERRA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 70381317.0.0000.5207

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.362.590

9.2. Anexo 2



Ministério do Meio Ambiente

CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A5F5402

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: Usuário:

CPF/CNPJ:

Objeto do Acesso:

A5F5402

UFRPE

24.416.174/0001-06

Patrimônio Genético/CTA

Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Scenedesmus sp.

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Bioativos extraídos da biomassa de *Scenedesmus* sp.**

Equipe **Raquel Pedrosa Bezerra**
UFRPE

Data do Cadastro: **25/05/2018 06:07:52**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **6:08** de **25/05/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**