

**Purificação e caracterização parcial
de uma toxina protéica presente na
alga *Vidalia obtusiloba* (Mertens ex
C. Agardh) J. Agardh**



Vidalia obtusiloba

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Conselho de Administração**

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria Executiva da Embrapa
Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifácio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores

Embrapa Meio-Norte

Maria Pinheiro Fernandes Corrêa
Chefe-Geral

Hoston Tomás Santos do Nascimento
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sérgio Luiz de Oliveira Vilela
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

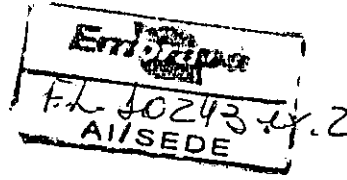
João Erivaldo Saraiva Serpa
Chefe-Adjunto Administrativo

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte
Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 0104-9046

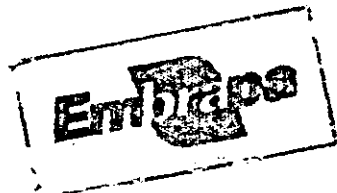
Dezembro, 2002



Documentos 72

**Purificação e caracterização
parcial de uma toxina
protéica presente na alga
Vidalia obtusiloba (Mertens
ex C. Agardh) J. Agardh**

Sandra Maria de Souza e Silva
Marjory L. Holanda
Ilka Maria Vasconcelos
Norma Maria Barros Benevides



Teresina, PI
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Endereço: Av. Duque de Caxias, 5650, Bairro Buenos Aires

Caixa Postal: 01

Fone: (86) 225-1141

Fax: (86) 225-1142

Home page: www.cpamn.embrapa.br

E-mail: sac@cpamn.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Valdenir Queiroz Ribeiro

Secretária-executiva: Ursula Maira Barros de Araujo

Membros: Expedito Aguiar Lopes, Maria do Perpétuo Socorro Cortez Bona do Nascimento, Edson Alves Bastos, Milton José Cardoso e João Avelar Magalhães

Supervisor editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira

Revisor de texto: Francisco de Assis David da Silva

Normalização bibliográfica: Orlane Maia Silva

Foto da capa: Sandra Maria de Souza e Silva

Editoração eletrônica: Luiz Elson de Araujo Fontenele

1ª edição

1ª impressão (2002): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio-Norte

Purificação e caracterização parcial de uma toxina protéica presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Mertens ex C. Agardh)

J. Agardh / Sandra Maria de Souza e Silva ... [et al.]. -

Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2002.

25 p. : il. ; 21 cm. - (Embrapa Meio-Norte. Documentos ; 72.)

1. Alga marinha. 2. Proteína tóxica. I. Silva, Sandra Maria de Souza e. II. Embrapa Meio-Norte. III. Série.

CDD 589.3 (21.ed.)

© Embrapa 2002

Autores

Sandra Maria de Souza e Silva

Bióloga, Mestre em Bioquímica Vegetal, Embrapa Meio-Norte. Av. Duque de Caxias, 5650. Cx. Postal 01, CEP: 64.006-220 Teresina, PI.

E-mail: smssilva@cpamn.embrapa.br

Marjory L. Holanda

Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, CEP: 60.451-970 Fortaleza, CE.

Ilka Maria Vasconcelos

Professora Adjunta, Doutora, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, CEP: 60.451-970 Fortaleza, CE.

Norma Maria Barros Benevides

Professora Adjunta, Doutora, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, CEP: 60.451-970 Fortaleza, CE.

Apresentação

Na busca de alternativas para aumentar a disponibilidade de alimentos para as populações, os cientistas têm explorado as mais diferentes áreas do conhecimento. Muito embora, bem conhecido pelos povos orientais, os povos dos países em desenvolvimento ainda carecem de melhores esclarecimentos com relação à utilização de fontes de recursos naturais como as algas, em suas dietas diárias. Desta maneira, torna-se necessário, a identificação do potencial das algas como fornecedoras de fontes não convencionais de proteína animal, tendo em vista, disponibilizar este nutriente para as populações de baixa renda a preços mais competitivos, melhorando assim a sua qualidade de vida.

Maria Pinheiro Fernandes Corrêa
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Sumário

Purificação e caracterização parcial de uma toxina protéica presente na alga <i>Vidalia obtusiloba</i> (Mertens ex C. Agardh) J. Agardh	9
Introdução	9
Metodologia	10
Coleta e armazenagem de algas	10
Preparação do extrato total e da fração 0/60 (F _{0/60})	10
Determinação de proteínas	13
Atividade hemaglutinante	13
Atividade Inibidora de tripsina	13
Atividade tóxica	14
Termoestabilidade das atividades hemaglutinantes e tóxicas	14
Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel	14
Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B	15
Cromatografia de exclusão molecular em coluna de superose - 12 HR acoplada ao sistema de FPLC	15
Eletroforese em gel de poliacrilamida	15

Caracterização parcial dos compostos bioativos de origem protéica	16
Atividades hemaglutinante, tóxica e antitriptica presentes no extrato total e na F ₀₆₀	16
Termoestabilidade das atividades hemaglutinante e tóxica ...	16
Separação das atividades tóxica e lectínica por cromatografia de troca iônica em Deae-Sephacel	18
Cromatografia de interação hidrofóbica	19
Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose-12 HR 10/30 (FPLC)	20
Determinação da massa molecular da proteína tóxica da alga <i>V. obtusiloba</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e b-mercaptoetanol	21
Considerações Finais ..	22
Referências Bibliográficas	22

Purificação e caracterização parcial de uma toxina protéica presente na alga *Vidalia obtusiloba* (Mertens ex C. Agardh) J. Agardh

Sandra Maria de Souza e Silva

Marjory L. Holanda

Ilka Maria Vasconcelos

Norma Maria Barros Benevides

Introdução

O culto ao naturalismo e a busca de um padrão de vida cada vez mais saudável têm impulsionado entidades governamentais e pesquisadores a procurarem e adotarem estratégias de utilização econômica dos recursos naturais para os mais diversos fins, principalmente aqueles com potencial medicinal e alimentar. É nesse contexto que algas marinhas, tradicionalmente exploradas pelos povos orientais sob o ponto de vista nutricional, farmacêutico e comercial, representam uma opção para a melhoria da qualidade de vida da população de baixa renda, principalmente nos países subdesenvolvidos.

De uma maneira geral, as algas marinhas são consideradas excelentes fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídio (Rao, 1965; Schönfeld-Leber, 1979; Harvey, 1988; Ito & Hori, 1989; Mabeau et al., 1992; Costa, 1995). Algumas espécies apresentam nas suas composições aminoacídicas elevadas quantidades de arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina e alanina (Mabeau et al., 1992). As algas também são fontes promissoras de alguns minerais requeridos pelo homem, por exemplo, o iodo, justificando assim a quase inexistência de "bócio" nos habitantes da costa da Ásia (Ericson & Lewis, 1953; Yamagata & Yamagata, 1972; Arasaki & Arasaki, 1983). Além disso, têm sido encontradas em alguns desses representantes quantidades apreciáveis de vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C e especialmente B12, ainda não detectada em vegetais (Chapman, 1970; Robinson, 1980; Darcy-Vryllon, 1993).

Em razão da importância nutricional e econômica das proteínas vegetais aos organismos animal e humano, diversos trabalhos sobre isolamento e caracterização protéica, bem como estudos sobre a toxicidade de algumas dessas proteínas para animais superiores, têm sido realizados nas últimas décadas (Pusztai et al., 1992; Oliveira et al., 1994; Vasconcelos et al., 1994; Sgarbieri, 1996). No entanto, embora o litoral brasileiro seja constituído por uma grande diversidade de espécies algais, não foram observados na literatura consultada trabalhos relatando a presença de proteínas tóxicas em algas marinhas, com exceção das lectinas, as quais são definidas como um grupo de proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1995).

Este trabalho teve como objetivo o isolamento, a purificação e a caracterização parcial de uma proteína tóxica detectada na alga *Vidalia obtusiloba*, após a realização de um "screening" de substâncias protéicas bioativas em dez espécies de algas marinhas vermelhas coletadas no litoral cearense.

Metodologia

Coleta e armazenagem de algas

Algas marinhas vermelhas pertencentes à espécie *Vidalia obtusiloba* foram coletadas durante marés baixas (Praia do Pacheco e do Farol, Estado do Ceará) e transportadas ao laboratório de bioquímica vegetal da Universidade Federal do Ceará. Após lavadas com água destilada para retirada das epifitas, foram estocadas em sacos plásticos a -10°C para posterior utilização.

Preparação do extrato total e da fração 0/60 ($F_{0/60}$)

Algas frescas foram maceradas em gral de porcelana na presença de nitrogênio líquido e deixadas em contato com Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5, na proporção de 1:3 (m/v); por 4 horas, sob agitação constante, a 4°C . As suspensões foram filtradas em tecido de nylon e centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C . Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes obtidos, denominados de extratos totais, foram dialisados contra o mesmo tampão de extração durante 24 horas.

O extrato total dialisado foi precipitado com sulfato de amônio até 60% de saturação e após 6 horas, o material foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi ressuspensão no tampão de extração e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão. A fração protéica assim obtida foi designada como Fração₀₆₀ (F₀₆₀), avaliada quanto ao teor protéico, atividade tóxica e hemaglutinante e utilizada nas etapas seguintes de isolamento da atividade tóxica (Fig. 1).

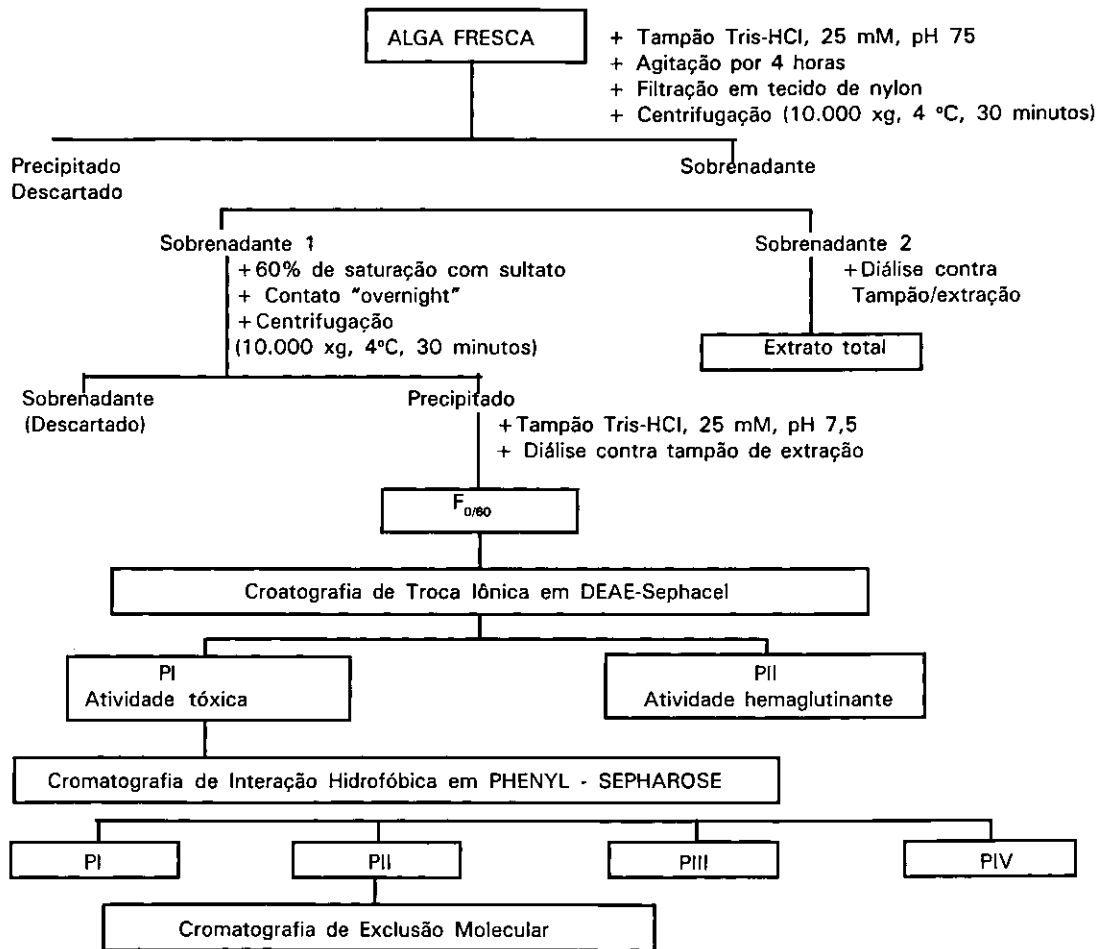


Fig. 1. Esquema geral de isolamento da proteína tóxica extraída da alga *Vidalia obtusiloba*.

Determinação de proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina.

Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada seguindo-se o método descrito por Benevides et al. (1996), usando hemácias humanas tipo O, não tratadas e tratadas enzimaticamente a 2% em NaCl. As amostras (0,20 ml) a serem dosadas foram diluídas seriadamente em tubos de ensaios (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.) em NaCl 0,15 M. A 0,20 ml de cada diluição, adicionou-se igual volume da suspensão de hemácias tipo O, tratadas com bromelaina. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado a 3.000 g por 30 segundos e a visualização dos aglutinados foi feita a olho nu. O título foi expresso em unidades de hemaglutinação (UH/ml), isto é, o inverso dá maior diluição ainda capaz de causar aglutinação visível.

Atividades inibidora de tripsina

Os inibidores de tripsina foram determinados pelo método originalmente descrito por Kakade (Hammerstrand *et al.*, 1981). Farinha (0,08 g) da alga foi suspensa em 1 ml de NaOH 0,01 M e deixada sob agitação por 3 horas. Após esse período, a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos sendo, em seguida, retirada uma alíquota de 0,5 ml dos sobrenadantes, que foram misturada dos com 0,5 ml de NaOH 0,01 M em tubos de centrifugação "Eppendorf". A solução resultante foi centrifugada a 14.000 g por 5 minutos. Após centrifugação, alíquota de 0,1 ml dessa solução foi retirada e incubada em um meio de reação que consistia de 1,6 ml de Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl_2 0,02 M, 0,1 ml de tripsina (solução estoque 0,4 mg em 10 ml de HCl 0,001 N) e o substrato Na-DL-arginil-p-nitroanilida. A reação foi interrompida com ácido acético 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. O resultado foi calculado considerando-se a curva padrão obtida com inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (Sigma, type I-S).

Atividade tóxica

Camundongos (4 a 6) pesando entre 20-25 g foram usados para avaliação da toxicidade intraperitoneal. A atividade tóxica foi definida como a mortalidade observada em camundongos durante 24 horas, após injeção intraperitoneal do extrato total e da fração O/60 da alga estudada. A DL_{50} foi calculada pelo método de Litchfield & Wilcoxon (1949).

Termoestabilidade das atividades hemaglutinante e tóxica

A estabilidade térmica da atividade tóxica na F_{060} foi determinada pela incubação da fração em banho-maria a temperaturas de 50, 70 e 90°C. Nos intervalos de 10, 20 e 30 minutos, alíquotas de 3 ml eram retiradas, centrifugadas e submetidas à dosagem de proteína, atividades hemaglutinante e tóxica.

Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

A F_{060} obtida por precipitação com sulfato de amônio foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel. A coluna medindo 13,5 x 1,6 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5. A F_{060} foi previamente dialisada contra o mesmo tampão, aplicada na coluna, e a eluição feita com o tampão de equilíbrio. Após a completa eluição da fração não retida na coluna, realizou-se a eluição da fração retida pela utilização de NaCl 1 M a pH 7,5. Durante a cromatografia, foi mantido um fluxo constante de 30 ml/hora, coletadas frações de 3 ml e as absorvâncias determinadas a 280 nm. As frações obtidas foram dialisadas contra tampão de extração, concentradas por liofilização parcial e usadas para a determinação das atividades hemaglutinante e tóxica, dosagem de proteínas solúveis, eletroforese e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B.

Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B

O primeiro pico obtido por cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. A coluna medindo 1,40 x 1,4 cm foi montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade e, em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M. Após a eluição da fração não retida no gel, foi aplicado à coluna tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5. Aliquotas foram retiradas para a determinação da atividade tóxica, dosagem de proteínas e para estudos de cromatografia de exclusão molecular.

Cromatografia de exclusão molecular em coluna de superose - 12 HR acoplada ao sistema de FPLC

A fração contendo atividade tóxica (50 ml) obtida por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B foi cromatografada em coluna de Superose 12 HR 10/30 acoplada a um sistema de FPLC. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0, contendo 0,04% de azida sódica. A eluição foi feita com o mesmo tampão de equilíbrio ao fluxo de 0,5 ml por minuto. Na calibração prévia da coluna, utilizaram-se os seguintes padrões protéicos: quimiotripsinogênio A (25 kDa.), ovalbumina (43 kDa.) e BSA (66 kDa.).

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS e b-mercaptoetanol foi realizada segundo o método de Laemmli (1970), sendo a técnica adaptada para o uso de placas medindo 12,0 x 17,0 cm. A corrida eletroforética realizou-se sob corrente contínua de 16 mA. O coramento das proteínas foi feito com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (4,0:0,7:5,3, v/v/v) e o descoramento com uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1,0:8,0, v/v/v). Como marcadores, utilizaram-se as seguintes proteínas: lactoalbumina, 14,4 kDa; inibidor de tripsina de soja, 20,1 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa e fosforilase b, 94,0 kDa.

Caracterização parcial dos compostos bioativos de origem protéica

Atividades hemaglutinante, tóxica e antitriptica presentes no extrato total e na F_{060}

Na Tabela 1, observam-se as atividades hemaglutinante e tóxica obtidas no extrato total de *V. obtusiloba*. Após a administração intraperitoneal do extrato total e da F_{060} (1 ml), 25% e 100% dos camundongos, respectivamente, morreram em um período de 24 horas. Esse resultado indicou a presença de proteínas biologicamente ativas na alga, possuindo atividades hemaglutinante e tóxicas

Tabela 1. Atividades hemaglutinante e tóxica no extrato bruto e na F_{060} da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba*, coletada no litoral cearense.

Alga	Proteína	Atividade	hemaglutinante	Atividade	DL ₅₀ ⁽¹⁾
	mg/ml	UH/ml	UH/mgP	tóxica ⁽¹⁾	
Extrato total	0,17	32	188,2	+	nd ⁽²⁾
F 0/60	0,48	512	1.066,6	+	3,9

(1) Atividade tóxica (n = 4) foi expressa em percentual de animais mortos após injeção i.p. do extrato total e da fração 0/60. 100% (+ +), 25 (+), 50% dos animais testados.
(2) DL₅₀ - Concentração protéica dada em mg/kg de peso corpóreo capaz de matar 50% dos animais testados.
(3) nd - Não determinado.

No extrato total, analisou-se a ação antitriptica e o resultado obtido mostrou ausência de atividade nas amostras estudadas. Isso indica que a toxicidade intraperitoneal para camundongos, encontrada no extrato total de alga, não está associada ao inibidor de tripsina.

Termoestabilidade das atividades hemaglutinante e tóxica

A atividade hemaglutinante presente na F_{060} foi estável à temperatura de 50°C por 30 minutos. No entanto, a 70°C houve uma redução de 94% de atividade

durante 30 minutos, tornando-se totalmente inativa a 90° C após o mesmo período de tempo (Fig. 2).

Entretanto, a atividade tóxica detectada na mesma fração protéica manteve-se até 70°C por 20 minutos, desaparecendo, no entanto, após 30 minutos (Tabela 2).

A atividade tóxica mostrou-se também estável à temperatura de -20°C e ao procedimento de liofilização.

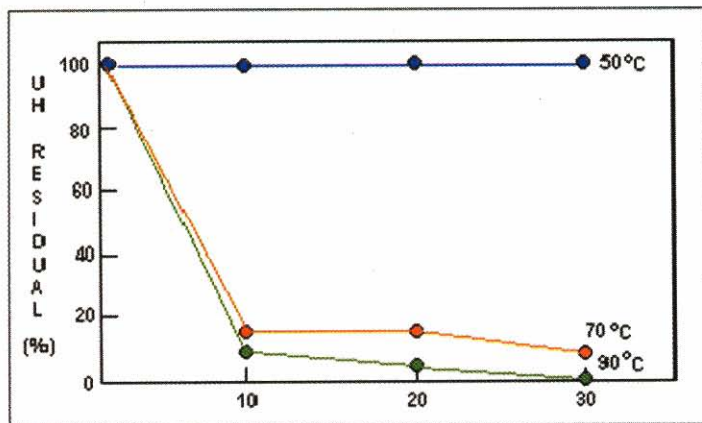


Fig. 2. Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante presente na F_{0/60} de *Vidalia obtusiloba*.

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre a atividade tóxica presente na F 0/60 de *Vidalia obtusiloba*.

Temperatura	Tempo (min.)	Atividade tóxica ⁽¹⁾
50° C	10	+
	20	+
	30	+
70° C	10	+
	20	+
	30	-
90° C	10	-
	20	-
	30	-

⁽¹⁾Atividade tóxica (n=4) foi expressa em porcentagem de animais mortos após injeção ip. de 1 ml dos extratos totais. 100% (++++); 75 % (+++); 50% (++) e 25% (+).

Separação das atividades tóxica e lectínica por cromatografia de troca iônica em Deae-Sephacel

O perfil cromatográfico, obtido por aplicação da F_{060} em cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, mostrou a existência de dois picos pigmentados. Um primeiro pico (PI) de coloração marrom, não retido na coluna contendo atividade tóxica e livre de atividade hemaglutinante, e um segundo pico (PII), eluído com Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 com NaCl 1M, de coloração vermelha, com atividade hemaglutinante, porém, atóxica (Fig. 3). A lectina semi-purificada apresentou uma atividade específica de 3.413,3 UH/mgP e uma purificação de 18 vezes em relação ao extrato total. O PI, correspondente a 15,6% das proteínas introduzidas na coluna, mostrou-se tóxico para camundongo quando injetado intraperitonealmente, enquanto o PII (lectina semipurificada), correspondendo a 40% das proteínas introduzidas, apresentou-se destituído de atividade tóxica (Tabela 3). Esses dados sugerem, portanto, a inexistência de toxicidade intraperitoneal da lectina e comprovam a presença de uma proteína com toxicidade intraperitoneal na alga *V. obtusiloba*.

Tabela 3. Separação das atividades hemaglutinante e tóxica na alga *Vidalia obtusiloba*.

Fração	Proteína total(mg)	Rendim. (%)	Atividade UH total	Hemaglutinante UH/mgP	Purific. (x)	Ativ.Tóxica ⁽¹⁾ (+/-)
EXTRATO	193,8	100,0	36480,0	188,2	1	+
F 0/ 60	18,00	9,3	10240,0	568,8	3	+
PI (DEAE)	2,80	1,5	-	-	-	+
PII (DEAE)	7,20	3,7	24576,0	3413,3	18	-
PII (Phenyl)	0,20	0,1	-	-	-	+

⁽¹⁾ Presença ou ausência de atividade tóxica.

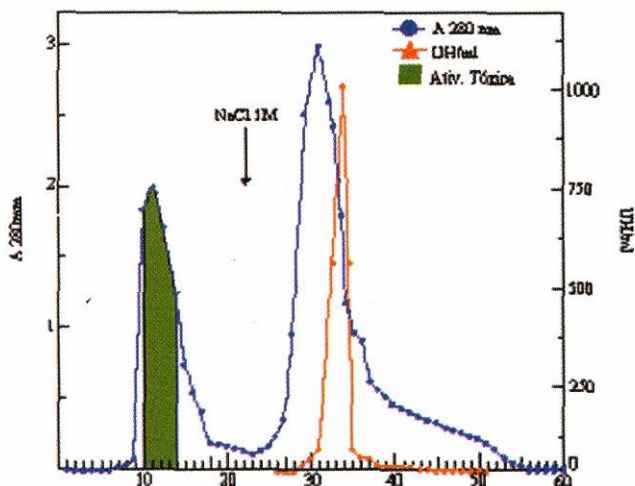


Fig. 3. Cromatografia de troca iônica da $F_{0.160}$ em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5. O primeiro pico (PI-DEAE) eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII-DEAE) eluído com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 1M.

Cromatografia de interação hidrofóbica

A proteína tóxica, semipurificada por cromatografia de troca iônica (PI), ao ser submetida à cromatografia de interação hidrofóbica, apresentou um perfil cromatográfico contendo três picos protéicos livres de atividade tóxica (PI, PIII e PIV) e um pico protéico (PII) contendo atividade tóxica (Fig. 4). O rendimento da toxina foi de 0,1 x quando comparado com o teor de proteínas solúveis no extrato total. Apesar de o índice de purificação não ter sido calculado em virtude da baixa concentração de proteínas, observa-se a purificação da toxina (14 vezes) ao longo do processo, quando se analisa o teor protéico e atividade tóxica dos picos PI-DEAE e PII-Phenyl (Tabela 3).

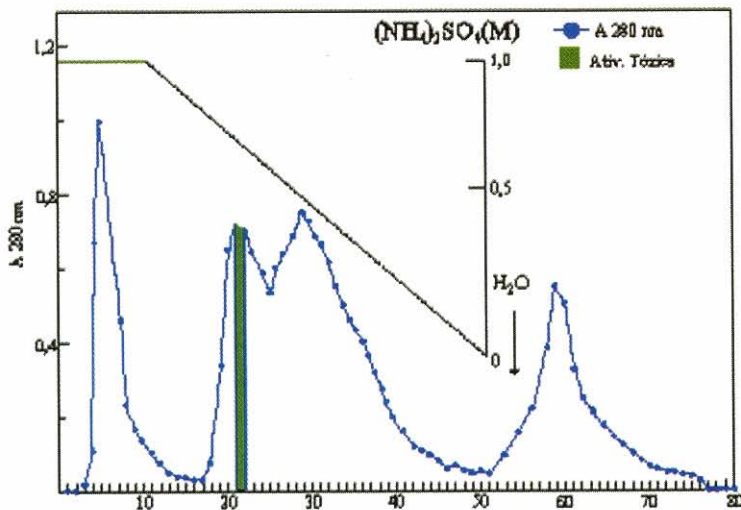


Fig. 4. Cromatografia de interação hidrofóbica do PI-DEAE em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B equilibrada com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 contendo $(NH_4)_2SO_4$. O primeiro pico (PI-Phenyl) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo e terceiro picos (PII e PIII-Phenyl) foram eluídos num gradiente de $(NH_4)_2SO_4$ de 1 a 0 M. O quarto pico (PIV-Phenyl) foi eluído com água destilada.

Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose-12 HR 10/30 (FPLC)

A Fig. 5 mostra o perfil cromatográfico obtido em coluna de Superose-12 HR em ausência e presença de galactose 0,2 M do PII-Phenyl. A proteína tóxica (PIII da cromatografia de exclusão molecular) corresponde a 88,9% do total de proteína eluída, comprovando assim o alto grau de pureza. Quando se determinou a massa molecular aparente, encontrou-se um valor extremamente baixo, indicando que, mesmo em presença de D-galactose 0,2%, a toxina provavelmente ainda estava interagindo com a coluna, a qual continha agarose na sua matriz.

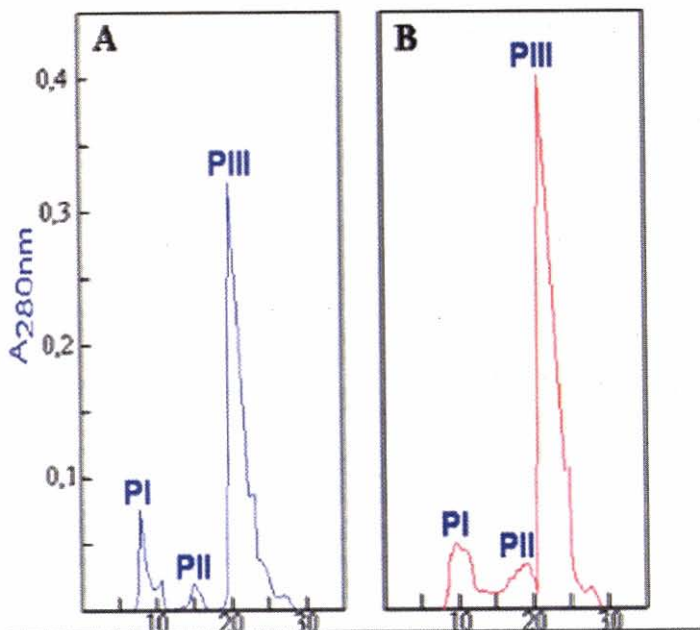


Fig. 5. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose-12 HR 10/30, acoplada a um sistema de FPLC. A - Equilibrada e eluída com Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M e azida sódica 0,04%. B - Equilibrada e eluída com Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M e azida sódica 0,04% e galactose 0,2 M.

Determinação da massa molecular da proteína tóxica da alga *V. obtusiloba* por eletroforese em gel de poliácridamida em presença de SDS e b-mercaptoetanol

A Fig. 6 mostra os perfis eletroforéticos de diferentes amostras obtidas ao longo do procedimento de purificação da proteína tóxica da alga *V. obtusiloba*, analisados em PAGE-SDS na presença de b-mercaptoetanol. Os resultados obtidos apresentaram ao longo de todo o procedimento uma intensa banda de massa molecular aparente de 40 kDa correspondente à proteína tóxica, além de uma banda com pouca intensidade de massa molecular aparente de 14 kDa. É provável que esta última banda seja a contaminação da toxina, como foi verificado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose-12 HR (FPLC).

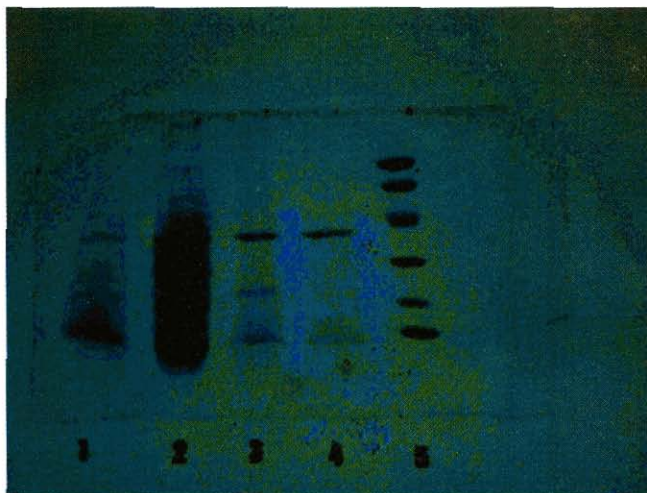


Fig. 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e b-mercaptoetanol das amostras obtidas durante o processo de separação das atividades tóxica e lectínica presentes na alga *Vidalia obtusiloba*: 1 - Extratos, 2 - F 0/60, 3 - PI-DEAE, 4 - PII-Phenyl, 5- marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa; albumina sérica bovina, 67,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; lactoalbumina, 14,4 kDa).

Considerações Finais

O princípio tóxico detectado na alga *V. obtusiloba* é de natureza protéica, termolábil, solúvel em água e soluções salinas diluídas e estável ao procedimento de liofilização com massa molecular aparente de 40 kDa. A fração tóxica é destituída de atividade hemaglutinante e inibidora de tripsina, constituindo-se, portanto, numa nova proteína.

Referências Bibliográficas

ARASAKI, S.; ARASAKI, T. Low calorie, high nutrition vegetables from the sea. Japan Publication, Inc. Tokio Boserbooks Inc. Limmastrasse III p.86-193, Zurich, 1983.

BAETHGEM, W.E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant. Kjeldahl digest Communication in Soil Science, v.20, p.961-969, 1989.

BENEVIDES, N.M.B., LEITE, A.M.; FREITAS, A.L.P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v, 8 Nº 2, p. 117-122, 1996.

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

CHAPMAN, V.J. **Seaweeds and their uses**. London: Methuen, 1970.

COSTA, F.H.F. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina mitogênica presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida* Lamouroux**. Fortaleza: UFC, 1995, Dissertação de Mestrado.

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

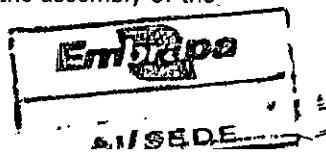
ERICSON, L.E.; LEWIS, L. On the vitamina B12 factors in marine algae. *Ark. Kemi.*, v.6, p.427-442, 1953.

HAMESTRAND, G.E.; BLACK, L.T. & GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. *Coreal Chemistry*, v.58, p. 42-45, 1981.

HARVEY, W. Cracking open marine algae, Biological Treasure Chest. *Biotechnology*, v.6, n.5, p.487-490, 492, 1988.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed chemical composition and potencial food uses. *Food Reviews International*, v.5, n.1, p.101-144, 1989.

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



LITCHFIELD, J. T., JR.; WILCOXON, F. A simplifical method for evolution of dose-effect experiments. **Journal. Pharmacol. Exp. Ther.** v.96, p. 99-104, 1949.

MABEAU, S.; CAVALOC, E.; FLEURENCE, J. & HAYE, M. la. New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingrediente**, n.3, p. 38-44. 1992.

OLIVEIRA, J.T.A., VASCONCELOS, I.M., GONDIM, M.J.L., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., SANTOS, C.F. & MOREIRA, L.I.M. Canavalia brasiliensis seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of Science of Food and agriculture**,V, 64, p. 417-424, 1994.

PEUMANS, W.J.; DAMME, E.J.M. van. Lectins: as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

PUSZTAI, A., EWEN, W.B. CARVALHO, A. de F.F.U., GRANT, G., STEWART, T.J.D. & BARDOCZ, S. Dietary kidney bean lectin modulates the concentration of insulin in blood circulation and controls body metabolism. **Proceedings of the Fifth Flair Meeting on Lectin Research**, p. 52-55, 1992.

RAO, G. N. S. Uses of seaweed directly as human food. **Indo-Pacific Fisheries Council Regional Studies**, v.2, p. 1-32, 1965.

ROBISON, R.K. Algae as a crop. **World Crops**, p. 9-15, 1980.

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

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

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

YAMAGATA, N. & YAMAGATA, N. Iodine content of thyroid glands of normal Japanese. *Journal of Radiation Research*, v.13, p.81-90, 1972.



**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**