

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

TAYSA LUCENA DE VASCONCELOS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
FARMACOLÓGICA DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO MUCO DO
ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa)**

RECIFE, 2011

TAYSA LUCENA DE VASCONCELOS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
FARMACOLÓGICA DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO MUCO DO
ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa)**

Dissertação apresentada à Coordenação da Pós graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Carlos Daniel Perez

Co-orientador: Profa. Jeanne Claine Albuquerque Modesto

RECIFE, 2011

Vasconcelos, Taysa Lucena de

Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica das proteínas presentes no muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) / Taysa Lucena de Vasconcelos. – Recife: O Autor, 2011.

81 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Carlos Daniel Perez

Co-Orientadora: Jeanne Claine Albuquerque Modesto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Zoantídeos 2. Lectinas 3. Corais I. Título.

593.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-178

TAYSA LUCENA DE VASCONCELOS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS
PROTEÍNAS PRESENTES NO MUCO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum*
(Cnidaria, Anthozoa)**

Dissertação apresentada à Coordenação da Pós graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Biologia Animal, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Daniel Perez e co-orientação da Professora Dra. Jeanne Claine Albuquerque Modesto.

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Miriam Camargo Guarnieri
Departamento de Zoologia - UFPE

Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dra. Paula Braga Gomes
Departamento de Zoologia - UFRPE

Ao Deus da minha vida, dono de tudo que sou e de tudo que tenho; ao meu amado esposo, Anderson; ao meu querido baguncinha, Arthur; e ao bebezinho que vem chegando.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus todo poderoso, pelo imenso amor que tem por mim; a Ele sejam dadas toda a honra e toda a glória.

A Anderson, amor da minha vida, pelo apoio em todos os momentos. A Arthur, filho amado, pelos dois anos de mestrado em que me apoiou fazendo uma baguncinha em minha vida.

À minha mãe, que com muito amor e garra criou e educou a mim e as minhas irmãs. A Talitha, Taciana, Lucas e painho, pelo apoio e paciência nos momentos difíceis.

A tia Beta e tia Dith, pelo amor e dedicação. Aos tios Helder, Ana e Hilton, e minha avó Miriam (*in memorian*) pelo carinho.

A Carlos Perez e Claine Modesto pela orientação nesses dois anos, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho e pelo voto de confiança.

À querida Miriam Guarnieri, ex-orientadora, por me acolher na família LAPT_x e disponibilizar seu laboratório para desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora pela disponibilidade e atenção.

A todos os amigos do LAPT_x/UFPE e do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos/CAV/UFPE.

Aos amigos e professores da Pós Graduação em Biologia Animal por todos os momentos que passamos juntos.

Aos técnicos de laboratório do CAV, sempre dispostos a ajudar.

Ao CNPq pelos dois anos de suporte financeiro. À FACEPE, CNPq e FADE por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Porque eu bem sei que pensamentos tenho sobre vós, diz o Senhor; pensamentos de paz e não de mal, para vos dar o fim que esperais. Então me invocareis, e ireis, e orareis a mim, e eu vos ouvirei. E burcar-me-eis, e me achareis, quando me buscardes de todo o vosso coração.”

Jer. 29:11-13

RESUMO

Palythoa caribaeorum é um cnidário colonial, abundante no litoral pernambucano. Durante a maré baixa produz um muco que protege contra a dessecação. Embora seja conhecida a composição básica deste muco, nenhuma proteína até hoje foi isolada e caracterizada. Desta forma, este trabalho se propôs a desenvolver uma metodologia de processamento e purificação que permitisse a obtenção de uma amostra com relevante conteúdo protéico, baixa viscosidade e alta solubilidade, a qual fosse possível a sua aplicação em colunas cromatográficas comerciais, além de testar atividade farmacológica. Para isto, amostras foram coletadas nos meses de Março/09, Janeiro e Maio/10 na praia de Porto de Galinhas-PE. Mar/09 e Jan/10 foram submetidas à homogeneização mecânica enquanto Mai/10 passou por uma liquidificação. Após centrifugação, o sobrenadante de Jan/10 (Jan/10B) passou por uma diluição nas proporções 1/6 e 1/12. Mai/10 foi submetido à diluição 1/3 logo após liquidificação. Jan/10B e Jan/10^{1/12} passaram ainda por tratamento químico com uréia 6M e ácido acético 1%, e éter/etanol e clorofórmio/metanol, respectivamente. Por último, alíquotas de Mar/09B, Jan/10B e Mai/10^{1/3}, foram submetidas à precipitação protéica com sulfato de amônio. As frações obtidas em todos os procedimentos foram dialisadas. Em seguida, foram realizadas dosagem protéica, atividade hemaglutinante, eletroforeses, cromatografias, além de inibição das atividades hemaglutinante e hemorrágica. Os resultados mostraram que a metodologia mais eficaz na preparação da amostra foi a liquidificação seguida de diluição 1/3 e precipitação protéica em faixas curtas de concentração de sal. A partir da fração F3-Mai/10^{1/3}, obtida por esta metodologia, uma lectina de 34 KDa (PcmL-1) foi parcialmente purificada, através de uma cromatografia de afinidade em coluna Con A Sepharose 4B, seguida de cromatografia de troca aniônica em coluna Resource Q. Além disso, o muco de *P. caribaeorum* mostrou ser uma fonte importante de lectinas xilose e lactose-específicas, e possíveis inibidores de proteases.

Palavras-chave: *Palythoa caribaeorum*, lectina, purificação, hemaglutinação.

ABSTRACT

Palythoa caribaeorum is a colonial cnidarian, abundant on the coast of Pernambuco. During low tide produces a mucus that protects against drying. Although it is known the basic composition of this mucus, no protein to date has been isolated and characterized. Thus, this study proposes to develop a methodology that allows processing and purification to obtain a sample with significant protein content, low viscosity and high solubility, which was possible its application in commercial chromatographic columns, and to test pharmacological activity. For this, samples were collected during the months of March/09, January and Maio/10 on the beach of Porto de Galinhas-PE. Jan/10 and Mar/09 were subjected to mechanical homogenization while May/10 underwent blending. After centrifugation, the supernatant Jan/10 (Jan/10B) underwent dilution in the proportions 1/6 and 1/12. May/10 underwent dilution 1/3 immediately after blending. Jan/10B and Jan/10^{1/12} yet passed through chemical treatment with 6M urea and 1% acetic acid, and ether/ethanol and chloroform/methanol respectively. Finally, aliquots of Mar/09B, Jan/10B and Mai/10^{1/3} were subjected to protein precipitation with ammonium sulfate. The fractions obtained in all procedures were dialyzed. Then, were performed dosage of protein, hemagglutination activity, electrophoresis, chromatography, and inhibition of hemagglutinating activity and hemorrhagic. The results showed that the most effective methodology for sample preparation was the blending followed by a dilution 1/3 and protein precipitation in short tracks of salt concentration. From F3-Mai/10^{1/3} fraction obtained by this method, a 34-kDa lectin (PcmL-1) was partially purified by affinity chromatography on a Con A Sepharose 4B column followed by anion exchange chromatography on a Resource Q column. Furthermore, the mucus of *P. caribaeorum* proved to be an important source of lectins xylose and lactose-specific and protease inhibitors.

Key-words: *Palythoa caribaeorum*, lectin, purification, hemagglutination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Imagens de *P. caribaeorum*. (A)** Colônia fotografada durante a maré baixa. Por Carlos Pérez em 25/10/2007. **(B)** Colônia submersa. Por Alvaro Migotto. Endereço: <http://200.144.190.194/cbm/index.php/pt/component/rsgallery2/category/9/asInline.html?limit=1&start=22>.....17
- Figura 2 - Resumo esquemático da metodologia utilizada. (A)** Amostra coletada em Março/09 e, **(B)** amostra coletada em Janeiro/10.....34
- Figura 3 - Resumo esquemático da metodologia utilizada.** Amostra coletada em Maio/10.....35
- Figura 4 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% da fração F3-Mai/10^{1/3}.** SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). **P)** Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). **F3)** Bandas protéicas com massas moleculares estimadas, resultantes da análise da amostra F3-Mai/10^{1/3}.42
- Figura 5 - Cromatografia em coluna ConA Sepharose 4B do F3-Mai/10^{1/3}.** A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 20mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 0,6 ml/min), sendo o **NR** eluído com mesmo tampão (fluxo 0,4 ml/min) e o **R** eluído com Tris HCl 20mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,5 M e Metil- α -D-manopiranosídeo 0,5M (fluxo 0,2 ml/min). O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm44
- Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos NR e R.** Picos resultantes da cromatografia de F3-Mai/10^{1/3} em coluna ConA Sepharose 4B. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). **P)** Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). **NR)** e **R)** Material não ligado e com afinidade a coluna, respectivamente. Setas indicando as massas moleculares estimadas das bandas protéicas45

Figura 7 - Cromatografia em coluna Resource Q do pico NR. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, em fluxo de 0,5 ml/min. **NR-Q1** foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que **NR-Q2** e **NR-Q3** foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.....46

Figura 8 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos NR-Q1, NR-Q2 e NR-Q3. Picos resultantes da cromatografia de NR em coluna Resource Q. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). Setas indicando as massas moleculares estimadas das bandas protéicas.....46

Figura 9 - Cromatografia em coluna Resource Q do pico R. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, em fluxo de 0,5 ml/min. **R-Q1** foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que **R-Q2** e **R-Q3** foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.....47

Figura 10 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos R-Q1, R-Q2 e R-Q3. Picos resultantes da cromatografia de R em coluna Resource Q. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). Seta indicando a massa molecular estimada da única banda protéica visualizada em R-Q1.....48

Figura 11 - Inibição da atividade hemaglutinante das amostras de Mai/10. Atividade realizada com as amostras Mai/10B, Mai/10^{1/3} e F3-Mai/10^{1/3} (2mg/ml de proteínas), utilizando os carboidratos Xilose e Lactose (200mM) como inibidores e hemácias humanas glutarizadas do tipo AB+.....49

Figura 12 - Efeito inibitório das frações de muco de *Palythoa caribaeorum* sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops leucurus*.

Testes realizados em dorso de camundongos fêmeas (18 e 24g), utilizando diferentes frações de muco (50 µg de proteínas) pré-incubadas com a peçonha (10 µg) por 10 min. Os animais foram injetados com a mistura por via intradérmica e os halos hemorrágicos medidos após 1h.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dosagens protéicas do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* bruto e diluído, coletado nos meses de Janeiro e Maio/10. Realizadas em micro-placas de 96 poços, utilizando o método de Bradford (1976).....37

Tabela 2 - Atividade hemaglutinante do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* bruto e diluído, coletado nos meses de Janeiro e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml.....38

Tabela 3 - Dosagens protéicas do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* tratado quimicamente, coletado no mês de Janeiro/10. Realizadas em micro-placas de 96 poços, utilizando o método de Bradford (1976)..... 39

Tabela 4 - Atividade hemaglutinante do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* tratado quimicamente, coletado no mês de Janeiro/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml..... 40

Tabela 5 - Dosagem protéica das frações resultantes da precipitação protéica com sulfato de amônio do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, coletado nos meses de Março/09, Janeiro e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços utilizando o método de Bradford (1976).....41

Tabela 6 - Atividade hemaglutinante das frações resultantes do processo de precipitação com sulfato de amônio do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, coletado nos meses de Março/09 e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml42

Tabela 7 - Resumo comparativo da purificação parcial da primeira lectina encontrada no muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (PcmL-1).....48

Tabela 8 - Halos antihemorrágicos das amostras de muco de *Palythoa caribaeorum* utilizadas no teste de inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops leucurus*. Testes realizados em dorso de camundongos fêmeas (18 e 24g), utilizando diferentes frações de muco (50 µg de proteínas) pré-incubadas com a peçonha (10 µg) por 10 min, sendo a peçonha utilizada como controle positivo da hemorragia. Os animais foram injetados com a mistura por via intradérmica e os halos hemorrágicos medidos após 1h.....51

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1 - <i>Palythoa caribaeorum</i>	15
1.2 - MUCO.....	18
1.2.1 – Mucos de Corais.....	19
1.3 - LECTINAS.....	21
1.4 - INIBIDORES DE PROTEASES.....	22
1.5 - JUSTIFICATIVA.....	23
2 - OBJETIVOS.....	25
2.1 - GERAL.....	25
2.2 - ESPECÍFICOS.....	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 - COLETA DE MUCO.....	26
3.2 - PROCESSAMENTO DOS MUCOS.....	26
3.2.1 - Diluição dos Mucos.....	26
3.2.2 - Tratamentos Químicos.....	27
3.3 - DOSAGENS PROTÉICAS.....	28
3.4 - ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	28
3.4.1 - Fixação de Hemácias Humanas em Glutaraldeído.....	28
3.4.2 - Testes de Hemaglutinação	29
3.4.3 - Testes de Inibição da Atividade Hemaglutinante.....	29
3.5 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MUCO DE <i>P. Caribaeorum</i>	30
3.5.1 - Precipitação Protéica dos Mucos.....	30
3.5.2 - Análises Cromatográficas.....	31
3.5.2.1 - Cromatografia de afinidade manual.....	31
3.5.2.2 - Cromatografia de afinidade em sistema AKTA purifier.....	32
3.5.2.3 - Cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA purifier.....	32
3.5.2.4 - Cromatografia de troca iônica em sistema AKTA Purifier.....	32
3.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	33

3.7 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	33
3.8 - RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA UTILIZADA.....	34
4 - RESULTADOS.....	36
4.1 - COLETAS DE MUCO.....	36
4.2 - PROCESSAMENTO DOS MUCOS.....	36
4.2.1 - Homogeneização das Amostras.....	36
4.2.2 - Diluição das Amostras.....	36
4.2.3 - Dosagem Protéica e Atividade Hemaglutinante dos Mucos Diluídos.....	36
4.2.4 - Dosagem Protéica e Atividade Hemaglutinante dos Mucos Tratados Quimicamente.....	38
4.3 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MUCO DE <i>P. Caribaeorum</i>	40
4.3.1 - Precipitação com Sulfato de Amônio.....	40
4.3.2 - Análises Cromatográficas.....	43
4.3.2.1 - Cromatografia de afinidade (Sistema manual).....	43
4.3.2.2 - Cromatografia de troca iônica (AKTA purifier).....	45
4.4 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	49
4.5 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	50
5 - DISCUSSÃO.....	52
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE.....	74

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - *Palythoa caribaeorum*

Os zoantídeos são cnidários antozoários polipóides, coloniais, marinhos e habitantes de recifes costeiros (Soares et al., 2006). Zoantídeos do gênero *Palythoa* são abundantes em águas tropicais e subtropicais rasas em todo o mundo (Reimer et al., 2007), sendo a espécie *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti, 1860) amplamente distribuída em toda costa oeste do Oceano Atlântico (Castro e Pires, 2001). Os indivíduos desta espécie se caracterizam por apresentarem os pólipos inseridos numa massa de tecido espessa, o cenênquima (Pérez et al., 2005), além de incorporar grãos de sedimentos em sua parede corporal (Reimer et al., 2007).

P. caribaeorum abriga em suas células dinoflagelados simbiotes, conhecidos por zooxantelas (Zooxanthellae) (Kemp et al., 2006; Lin et al., 2000). As zooxantelas estão localizadas em vacúolos dentro das células endodermis (Glider et al., 1980).

Estas algas fotossintéticas conferem aos seus hospedeiros maior produtividade e sobrevivência, contribuindo significativamente para sua nutrição, transformando carbono inorgânico em carbono fixado fotossinteticamente (Muscatine, 1990). Em troca, as zooxantelas recebem altas concentrações de nitrogênio e carbono inorgânico e outros nutrientes (Cook et al., 1988), além de receberem proteção contra os predadores e contra os raios UV (Lesser e Shick, 1989). As zooxantelas são as principais responsáveis pela alta produtividade nos ambientes recifais, sendo a energia produzida por elas transferida para a cadeia alimentar recifal (Benson e Muscatine, 1974; Ducklow e Mitchell, 1979).

Segundo Lin et al. (2000), o estabelecimento da simbiose entre corais e zooxantelas requer um certo grau de especificidade para o hospedeiro selecionar o seu simbiote. Em seu trabalho, isolou e caracterizou glicoproteínas da parede celular de zooxantelas da anêmona marinha *Aiptasia pulchella*. Além disso, os grupos carboidratos destas glicoproteínas foram removidos por deglicosilação enzimática, a fim de testar a capacidade infectante das zooxantelas para a anêmona. Os resultados mostraram que a taxa de infecção algal declinou significativamente com o tratamento. Isto indicou que a integridade das

glicoproteínas da superfície zooxantelar está diretamente envolvida no sucesso do estabelecimento da relação entre algas simbióticas e hospedeiros cnidários.

Entretanto, o crescente aumento da temperatura global nas últimas décadas, e o aquecimento das águas oceânicas têm provocado impactos negativos nos ambientes recifais (Kemp et al., 2006), com a perda das algas endosimbióticas pelos corais, seu conseqüente branqueamento, e até a morte destes corais. Em águas rasas, onde habita *P. caribaeorum*, o branqueamento é induzido pela combinação das altas temperaturas e da alta irradiância (Brown, 1997; Kemp et al., 2006).

O fenômeno do branqueamento de corais ocorre devido à perda das algas endosimbióticas (Brown, 1997). De forma geral, o estresse causado pela temperatura provoca o descolamento e liberação das células endodermis contendo as zooxantelas. Após a liberação, estas células desintegram-se no ambiente (Gates et al., 1992). Acredita-se que o descolamento das células endodermis seja causado pela disfunção na adesão celular devido ao estresse termal (Quinn, 1989). Por outro lado, o estresse termal pode causar a desnaturação das proteínas envolvidas na adesão celular (Watson e Morris, 1987). Outro fator que pode causar a liberação das zooxantelas é a baixa salinidade, que provoca a lise celular por choque hiposmótico (Goreau, 1964).

O aumento na temperatura das águas superficiais marinhas, causado pelo aquecimento global, levou pesquisadores a predizer que os recifes de corais podem desaparecer dentro de 20 a 50 anos, visto que os corais não possuem a capacidade de se adaptar tão rapidamente às mudanças ambientais (Hoegh-Guldberg, 1999).

P. caribaeorum (Figura 1), uma espécie de coral mole abundante no litoral pernambucano, também sofre as conseqüências do aquecimento das águas marinhas, sendo possível encontrar diversas colônias branqueadas nos locais onde ocorre. As colônias de *P. caribaeorum* ocupam extensas áreas, formando grandes tapetes sobre os costões rochosos (Pérez et al., 2005), e durante a maré baixa produzem um muco que protege contra a dessecação, o que lhe confere o nome popular de “Baba de boi”.

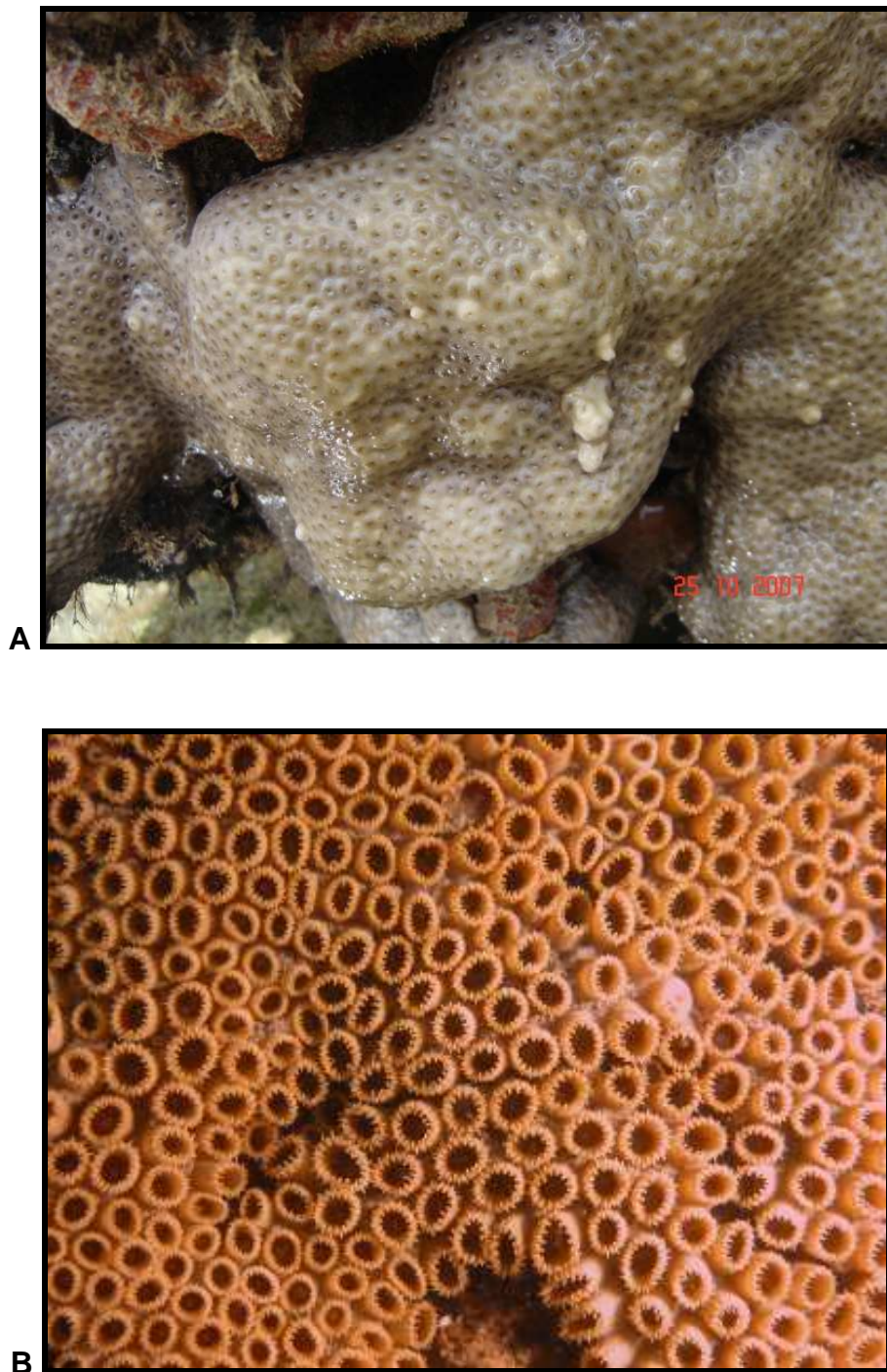


Figura 1 - Imagens de *P. caribaeorum*. (A) Colônia fotografada durante a maré baixa. Por Carlos Pérez em 25/10/2007. **(B)** Colônia submersa. Por Alvaro Migotto. Endereço: <http://200.144.190.194/cbm/index.php/pt/component/rsgallery2/category/9/asInline.html?limit=1&start=22>

1.2 – MUCOS

O muco é uma estrutura de origem fisiológica, que pode ser encontrado na forma de fluido ou gel, apresentando diferentes consistências, dependendo do organismo ou órgão que o produz.

Vários tipos de mucos já foram estudados e alguns tiveram proteínas purificadas e caracterizadas. Dentre aqueles provenientes de organismos vertebrados estão os mucos gástrico (Slomiany et al., 1983), cervical (Jeanloz et al., 1986; Moriyama et al., 1999; Ming et al., 2007), olfatório (Briand et al., 2002), bronquial (Slayter et al., 1984; Degroote et al., 2003) e intestinal (Mantle e Allen, 1981; Mall et al., 1987) humanos e de outros animais saudáveis ou doentes, além de mucos da pele de peixes (Nagashima et al., 2004; Okamoto et al., 2005; Yu et al., 2008; Subramanian et al., 2009), enguias (Muramoto et al., 1999; Sumi et al., 2004) e raias (Tsutsui et al., 2009). Em relação aos invertebrados, já foram estudados mucos de equinodermo (Bavington et al., 2004), platelminto (McGee et al., 1998), moluscos (Melo et al., 1998; Smith et al., 1999; Fountain e Campbell, 2002; Li e Graham, 2007; Guo et al., 2009) e corais moles e duros (Daumas e Thomassin, 1977; Daumas et al., 1981; Krupp, 1985; Kljajic et al., 1987; Meikle et al., 1987; Coffroth, 1990; Jatkar et al., 2010).

De forma geral, os mucos produzidos por órgãos animais desempenham funções protetivas, como uma barreira física contra microorganismos e injúria provocada por enzimas e substâncias químicas, prevenindo o estabelecimento de infecções. Algumas glicoproteínas (Mantle e Allen, 1981; Slomiany et al., 1983), oligossacarídeos (Degroote et al., 2003) e inibidor de protease (Ohlsson e Tegner, 1976) já foram isolados destes mucos. Em relação ao muco cervical humano, foram isolados peptídeos antimicrobianos (Ming et al., 2007) e um inibidor de protease (Moriyama et al., 1999).

O muco epidermal de peixes apresenta peptídeos antimicrobianos, os quais previnem a colonização de microorganismos (Nagashima et al., 2003; Subramanian et al., 2009); lectinas (Muramoto et al., 1999; Okamoto et al., 2005; Tsutsui et al., 2009) e inibidores de proteases (Nagashima et al., 2004), os quais funcionam como fatores do sistema imune inato; além de proteínas pigmentares (Yu et al., 2008).

Os mucos de invertebrados apresentam um espectro de funções bem mais

amplo do que o de vertebrados. Entre suas funções estão o revestimento, para defender contra predadores e contra a dessecação; a navegação, por conter substâncias que indicam direção de casa, acasalamento e predação; a alimentação, por ser uma importante fonte de nutrientes; a locomoção, a adesão e a excreção (Denny, 1989). Algumas proteínas já foram isoladas destes mucos, como uma lectina (Fountain e Campbell, 2002) e a epigramina (Li e Graham, 2007) ambas provenientes do muco de gastrópodes, glicoproteínas anti-adesivas do muco de equinodermos (Bavington et al., 2004), uma lectina manose específica da camada mucosa de um coral (Kljajic et al., 1987), uma glicoproteína (Meikle et al., 1987) e mucinas, ambas de mucos de corais (Jatkar et al., 2010).

A presença de lectinas nos mucos de alguns invertebrados marinhos indica os mucos como importantes fontes destas moléculas, no entanto, os inibidores de proteases estão entre as classes protéicas ainda não identificadas nos mucos de invertebrados marinhos.

1.2.1 – Mucos de Corais

O muco é o maior produto da secreção de corais (duros e moles) nos mares tropicais (Meikle et al., 1987), sendo produzido nas células glandulares ectodermas a partir do carbono fixado pelas zooxantelas, bem como dos compostos derivados da alimentação do coral (Trench, 1970). É um fluido viscoelástico altamente hidratado (Meikle et al., 1988) e corrente que quando liberado fica exposto ao ambiente marinho e é movido através das correntes ciliares na superfície do animal (Lewis e Price, 1976), onde fica sujeito a alterações químicas e físicas.

O muco desempenha diversas funções, importantes para o coral que o produz bem como para a comunidade no qual ele está inserido. Protege contra o dessecação, durante a maré baixa, além de ser a maior fonte de nutrientes do ecossistema recifal (Benson e Muscatine, 1974; Coffroth, 1984; Meikle et al., 1987). Tem importante função na cadeia alimentar recifal, pois tanto a produção quanto o consumo do muco é um meio de transferência de energia potencial dos corais e suas algas simbiotas para os outros organismos que vivem no recife (Coles e Strathmann, 1973; Benson e Muscatine, 1974; Ducklow e Mitchell, 1979).

A produção de muco representa ainda uma propriedade altamente adaptativa

no caso de animais sésseis, nos quais são carentes de mecanismos comportamentais complexos para captura de presas e liberação de sedimentos do seu organismo (Hubbard e Pocock, 1972), além de ser uma resposta imediata e detectável para as mudanças nas condições ambientais (Brown e Bythell, 2005).

Além disso, o muco provê um importante substrato para a colonização de microorganismos. Frequentemente, o muco adere além de partículas de sedimentos, algas, protozoários, náuplios, diatomácias e bactérias, criando uma comunidade bastante heterogênea, o que demonstra o seu valor nutricional (Coles e Strathmann, 1973; Benson e Muscatine, 1974; Ducklow e Mitchell, 1979; Coffroth, 1990).

Em se tratando de quantidade de muco produzido, Wild et al., (2004) relata que o gênero dominante de corais duros da Grande Barreira de Corais da Austrália, *Acropora*, é capaz de liberar até 4,8 litros de muco por metro quadrado por dia. Além disso, entre 56 e 80% deste muco é liberado na coluna de água onde é dissolvido e rapidamente transporta energia e nutrientes para os organismos do recife.

O muco produzido por corais vêm sendo estudado há alguns anos quanto à sua composição bioquímica e representa uma mistura de componentes moleculares farmacologicamente ativos. É constituído basicamente de carboidratos, lipídeos e proteínas, havendo grande quantidade de glicoproteínas. Segundo literatura os valores relatados para o conteúdo de carboidratos podem variar de 25 a 67% do peso seco do muco (após liofilização), o conteúdo de proteínas pode alcançar valores de 1,6 a 72,7% e o conteúdo de lipídeos pode chegar a 93% (Daumas e Thomassin, 1977; Ducklow e Mitchell, 1979; Daumas et al., 1981; Meikle et al., 1988). Coffroth (1990), analisando o muco de corais poritídeos, demonstrou além da presença de glicoproteínas, a ocorrência de complexos polissacarídeos-glicoproteínas, típicos dos mucos de invertebrados.

No entanto, os trabalhos realizados com mucos de corais sempre deixaram dúvidas quanto à sua composição bioquímica real, devido a inconsistências atribuídas a contaminações por matéria particulada, bactérias, entre outros, que são facilmente removidos por métodos básicos, sendo necessário desenvolver um método capaz de apurar as análises bioquímicas com os mucos de corais (Krupp, 1985).

Recentemente Jatkar et al., (2010) mostrou que o muco de coral contém mucinas poliméricas de alto peso molecular, similares as que são encontradas nos

mucos de vertebrados e, que os corais são capazes de produzir dois diferentes tipos de mucos, dependendo da concentração destas mucinas.

Os estudos através dos anos mostraram que devido às diferenças encontradas, como a integridade e a viscosidade, as metodologias desenvolvidas são específicas para cada grupo de animais.

1.3 - LECTINAS

Lectinas são proteínas ligantes de açúcar e glicoproteínas, que reconhecem carboidratos específicos e são capazes de aglutinar vários tipos de células pela ligação a glicoconjugados da superfície celular. São de origem não imune e não enzimática, ou seja, não são anticorpos nem enzimas (Barondes, 1988; Sharon e Lis, 1989; Peumans e Van Damme, 1998; Kilpatrick, 2002).

Na ausência de um sistema imune mediado por anticorpos (Arason, 1996; Vasta e Ahmed, 1996), acredita-se que muitas lectinas mediem a interação entre hospedeiros invertebrados e microorganismos simbiotes (Muller et al., 1981; Jimbo et al., 2000), por estarem envolvidas em diversos processos de reconhecimento molecular (Kawabata e Iwanaga, 1999), podendo fornecer a primeira linha de defesa e desencadear um importante mecanismo efetor na eliminação de patógenos (Bayne et al., 1985; Kilpatrick, 2002).

As lectinas podem atuar reconhecendo moléculas no interior das células, na superfície celular ou até em fluidos fisiológicos (Sharon e Lis, 2004). A maioria das lectinas animais conhecidas são encontradas no interior do organismo, no entanto algumas lectinas são encontradas na superfície externa do corpo, como no muco que recobre a pele de peixes (Suzuki et al., 2003; Okamoto et al., 2005).

Várias lectinas tem sido purificadas e caracterizadas de tecidos e fluidos corporais de invertebrados marinhos (Barnejee et al., 2004), tais como ascídias (Molchanova et al., 2005), equinodermos (Giga, et al., 1987; Oseki et al., 1995; Kakiuchi et al., 2002; Gowda et al., 2008), anelídeos (Molchanova et al., 2007), crustáceos (Gokudan et al., 1999; Muramoto et al., 2001; Rittidach et al., 2007), moluscos (Gerlach et al., 2005; Naganuma et al., 2006; Kawsar et al., 2009; Alpuche et al., 2010) e esponjas (Kawsar et al., 2008).

No entanto, são poucas as lectinas isoladas de cnidários (Kljajic et al., 1987;

Goto et al., 1992; Goto-Nance et al., 1996; Jimbo et al., 2000; Fenton-Navarro et al., 2003; Imamichi e Yokoyama, 2010). Destas, quatro lectinas foram isoladas de corais, sendo uma delas D-manose específica, com 14.800 Da, com atividade mitogênica, isolada de um extrato feito a partir da mistura da camada mucosa encontrada em torno do coral juntamente com 1-2mm de massa tecidual localizada abaixo da camada mucosa (Kljajic et al., 1987); as outras lectinas de corais (Goto et al., 1992; Goto-Nance et al., 1996; Jimbo et al., 2000) foram purificadas de um extrato feito a partir da trituração da colônia.

1.4 – INIBIDORES DE PROTEASES

Muitas das proteínas envolvidas em algumas das principais vias fisiológicas são enzimas proteolíticas, sendo necessário um mecanismo para controlar sua atividade e evitar danos ao organismo (Travis e Salvesen, 1983). Desta forma, ocorreu a evolução de uma série de proteínas, denominadas inibidores de proteases, cuja função é diminuir a proteólise, atuando sobre classes específicas de proteases (Laskowski e Kato, 1980; Travis e Salvesen, 1983).

Inibidores de proteases são moléculas ubíquas. Apresentam-se de múltiplas formas em diversos tecidos e fluidos animais, bem como em plantas e microorganismos (Laskowski e Kato, 1980).

A grande maioria dos inibidores existentes nos fluidos biológicos regula a atividade de serinoproteases, entretanto quantidades significativas de inibidores de metaloproteases também estão presentes nestes fluidos (Travis e Salvesen, 1983).

A peçonha ofídica é uma importante fonte de metaloproteases, sendo estas as responsáveis pela atividade hemorrágica causada em decorrência do envenenamento (Fox e Serrano, 2005). Inibidores de metaloproteases podem ser encontrados na própria serpente, tanto no plasma quanto na peçonha (Chudzinski et al., 1989; Tanisaki et al., 1991; Cheung e Cushman, 1973), ou ainda no plasma de animais resistentes à peçonha que utiliza estes inibidores para neutralizar suas principais ações (Neves-Ferreira et al., 2000; Trento et al., 2001).

Em relação a invertebrados marinhos, dois inibidores de serinoproteases foram isolados do plasma de ostra (Xue et al., 2006) e lagosta (Liang et al., 1997). No entanto, nenhum inibidor de metaloprotease foi identificado até o momento. Em

se tratando de invertebrados de forma geral, foram isolados e caracterizados dois inibidores de metaloproteases da hemolinfa de duas espécies de moscas (Wedde et al., 1998; Pohar et al., 1999).

1.5 - JUSTIFICATIVA

Apesar da vasta presença de *Palythoa caribaeorum* nos mares tropicais e da sua ampla distribuição no litoral brasileiro, o seu muco é praticamente inexplorado. *P. caribaeorum* tem sido alvo de vários estudos ecológicos e comportamentais (Sebens, 1987; Acosta, et al., 2005; Francini-Filho e Moura, 2010), no entanto, os componentes bioativos do seu muco e o seu potencial farmacológico são quase desconhecidos, o que dificulta a execução de pesquisas científicas.

Poucos trabalhos têm dado importância às proteínas presentes nos mucos de corais. A maioria dos trabalhos bioquímicos realizada com zoantídeos baseia-se nas atividades biológicas de metabólitos secundários (terpenos, alcalóides, esteróides, peptídeos cíclicos, etc.) (Caballeira e Reyes, 1995; Babu et al., 1997; Shigemori et al., 1999), tendo sido a maioria destes metabólitos purificada diretamente de extratos celulares. A principal molécula e a mais estudada, isolada de zoantídeos do gênero *Palythoa* é a palitoxina, uma substância não protéica com aproximadamente 2600 Da, altamente tóxica e letal (Moore e Scheuer, 1971; Moore e Bartolini, 1981), a qual tem seu mecanismo de ação relacionado ao bloqueio da bomba Na^+/K^+ -ATPase (Frelin e Van Renterghem, 1995). Nenhum trabalho, no entanto, relata a purificação de proteínas do muco de zoantídeos, não havendo uma metodologia descrita.

Há cerca de quatro anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando o muco secretado por colônias de *Palythoa caribaeorum* coletadas nas praias de Suape e Guadalupe, litoral sul de Pernambuco. Os resultados obtidos mostraram ausência de atividade coagulante em plasma humano, fosfolipásica e citotóxica para hemácias e plaquetas humanas, e ainda a presença de atividade aglutinante sobre hemácias humanas e atividade inibitória da agregação plaquetária (Nobre et al., 2007). Além disso, foi verificada uma ação inibitória da atividade hemorrágica induzida pela peçonha da jararaca *Bothrops leucurus*, levantando a hipótese de existirem no muco potentes inibidores de proteases. As análises eletroforéticas revelaram componentes protéicos de alto, médio e baixo peso molecular, sendo este o primeiro relato da

presença de proteínas em secreção de zoantídeos (Nobre et al., 2008).

Desta forma, o presente trabalho se propôs a desenvolver uma metodologia para a purificação das proteínas do muco, a fim de obter a primeira proteína isolada do muco secretado pelo zoantídeo *P. caribaeorum*.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

Desenvolver uma metodologia para a purificação das proteínas do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*.

2.2 - ESPECÍFICOS

2.2.1 - Determinar um método para o processamento inicial do muco que permita a obtenção de uma amostra com relevante conteúdo protéico, baixa viscosidade, alta solubilidade e presença de atividade farmacológica;

2.2.2 - Desenvolver um protocolo para a purificação das proteínas presentes no material processado, utilizando colunas cromatográficas comerciais e sistema automatizado (Akta purifier).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - COLETAS DE MUCO

Amostras de muco de *P. caribaeorum* foram obtidas de colônias normais (sem processo de branqueamento visível) da praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco, nos meses de Março/2009, Janeiro/2010 e Maio/2010, durante a maré baixa. As amostras foram coletadas em tubos plásticos pela raspagem das colônias com o uso de luvas, sendo em seguida transportadas em gelo até o laboratório e mantidas a -20°C até o momento do uso.

3.2 - PROCESSAMENTO DOS MUCOS

Os mucos coletados foram submetidos a diferentes formas de processamento no intuito de se obter uma amostra com menor viscosidade, maior solubilidade e com maior conteúdo protéico para os testes farmacológicos e passos cromatográficos.

As amostras de muco passaram por duas formas de homogeneizações, a fim de verificar o melhor procedimento a ser utilizado. Inicialmente, os mucos descongelados de Março/2009 (Mar/09) e Janeiro/2010 (Jan/10) passaram por uma forte homogeneização manual, durante 10 min. O muco de Maio/10 (Mai/10) foi submetido à liquidificação também por 10 min. Em seguida, todo o muco de Mar/09 (devido ao baixo rendimento na coleta) e alíquotas dos mucos de Jan/10 e Mai/10 foram centrifugadas 2x a 20.000 x g, por 40 minutos, sendo os sobrenadantes resultantes coletados e denominados Mar/09B, Jan/10B e Mai/10B (amostras brutas, sem diluição), respectivamente.

3.2.1 - Diluição dos Mucos

Alíquotas de Jan/10 e Mai/10 (amostras apenas homogeneizadas e não centrifugadas) foram submetidas a processos de diluições adaptados da metodologia de Slayter et al. (1984). A fim de verificar a melhor diluição a ser utilizada, Jan/10 foi diluído nas proporções de 1/12 e 1/6, e Mai/10 na proporção de

1/3. Todo o processo de diluição foi realizado em água destilada e as amostras foram mantidas sob agitação constante a 4°C por 12 horas. Em seguida, os mucos diluídos foram centrifugados a 1.600 x g por 30 minutos e os sobrenadantes obtidos denominados Jan/10^{1/12}, Jan/10^{1/6} e Mai/10^{1/3}.

Alíquotas dos diferentes sobrenadantes, com e sem diluição, foram submetidas à diálise, utilizando membranas com limite de exclusão de 12000 Da (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, U.S.A) (utilizadas para todas as diálises realizadas durante o trabalho), por 24h a 4°C, contra água destilada, sendo a água substituída a cada 2h. Em seguida foram liofilizadas e mantidas a -20°C. Como controle de eficiência do processo de diluição, foram realizados testes comparativos de concentração protéica e aglutinação de hemácias, como descrito nos itens 3.3 e 3.4.2, respectivamente.

3.2.2 - Tratamentos Químicos

Buscando a melhor metodologia para a obtenção de um concentrado de proteínas do muco, enriquecendo assim a amostra a ser purificada, foram realizados testes com quatro compostos químicos diferentes. As amostras Jan/10B e Jan/10^{1/12} foram submetidas aos seguintes tratamentos:

1) Tratamento com uréia 6M segundo a metodologia de Paszkiewicz-Godek (1995): a fim de desagregar as moléculas presentes no muco (devido à sua ação caotrópica), uréia sólida foi adicionada lentamente a 20 ml da amostra Jan/10B, para uma concentração final de 6M, sendo a suspensão agitada por 6 h a 4°C. Em seguida foi centrifugada a 20.000 x g por 30 min a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C.

2) Tratamento com ácido acético como descrito por Ming et al. (2007): ainda com o objetivo de desagregar as biomoléculas do muco, 20 ml da amostra Jan/10B foram misturados a ácido acético numa concentração final de 1%, sendo submetido à forte agitação mecânica por aproximadamente 2 min. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 30 min a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C.

3) Precipitação de lipídeos com clorofórmio/metanol segundo Bligh e Dyer (1959): 1 ml da amostra Jan/10^{1/12} foi misturada a uma solução contendo clorofórmio/metanol na proporção de 2:1 (v/v), formando dupla camada. A camada

contendo clorofórmio foi coletada e a camada contendo o metanol foi tratada com 2,5 ml de clorofórmio. O precipitado, contendo lipídeos foi descartado. A solução sobrenadante foi armazenada a -20°C.

4) Precipitação de lipídeos com éter/etanol de acordo com Nalbone et al. (1980): a amostra Jan/10^{1/12} foi diluída em 2 volumes de éter/etanol (1:3, v/v), ficando por 1h a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g por 15 min e o precipitado submetido a 2 centrifugações com a mesma solução, sendo o precipitado lipídico descartado, o sobrenadante de cada centrifugação combinado e armazenado a -20°C.

O material obtido de cada tratamento foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24h, sendo a água substituída a cada 2h, e mantido a -20°C até o momento do uso. A eficiência das metodologias foi comparada através de dosagem protéica e testes de hemaglutinação como descrito nos itens 3.3 e 3.4.2, respectivamente.

3.3 - DOSAGENS PROTÉICAS

As dosagens protéicas foram realizadas em micro-placas segundo o método de Bradford (1976), misturando-se 5µl das diferentes amostras com 250 µl do reagente de Bradford (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, U.S.A.). Após incubação por 15 minutos, as amostras foram lidas a 595 nm em leitor de placas (BIORAD, Hércules, CA, U.S.A.). As concentrações protéicas das amostras foram estimadas através de uma curva padrão de albumina de soro bovino (0,0625 a 0,5 mg/ml).

3.4 - ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

3.4.1 - Fixação de Hemácias Humanas em Glutaraldeído

Para a atividade hemaglutinante foram utilizadas hemácias tratadas com glutaraldeído, segundo Bing et al. (1967). Sangue humano dos tipos A+, B+, AB+ e O+ foi coletado em solução Alsever (Bukantz et al., 1963), na proporção 1/1,6. O sangue foi centrifugado (1.300 x g, 15 min), sendo as hemácias lavadas três vezes em NaCl 0,15M. Em seguida, 1,5% de hemácias (v/v) foram incubadas a 4°C por 30 min (com agitação branda a intervalos de 5 min) em glutaraldeído 1% (v/v) diluído

em uma solução contendo tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 8,2 (um volume), NaCl 0,15 M (nove volumes) e água destilada (cinco volumes). Por fim, esta solução foi centrifugada a 1.300 x g, por 10 min. As hemácias “glutarizadas” foram ressuspensas em NaCl 0,15 M a 2,5% (v/v) e armazenadas a 4°C por até 3 meses.

3.4.2 - Testes de Hemaglutinação

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando amostras a uma concentração protéica de 2mg/ml.

Para o teste, inicialmente foram pipetados 50µl de NaCl 0,15M nos 18 primeiros poços da microplaca. Em seguida, foram adicionados ao 2º poço 50 µl das amostras (100 µg de proteínas), sendo realizada diluição seriada na proporção de 1:2, até o 18º poço. Posteriormente, foram adicionados 50µl da solução de hemácias 2,5% em cada poço e a placa incubada por 1h em superfície plana. Neste ensaio, o resultado positivo é caracterizado pela formação de um véu de hemácias, contrastando com o resultado negativo onde se evidencia a formação de um botão compacto no fundo da placa.

O título de hemaglutinação, definido como o inverso da maior diluição que exibiu hemaglutinação, foi reconhecido como a unidade de hemaglutinação (UH). A atividade específica é representada pelo número de UH por mg de proteína (Liu *et al.*, 2006; Imamiche & Yokoyama, 2010). A dose mínima hemaglutinante (DMHg) foi reconhecida como a concentração protéica da maior diluição com atividade hemaglutinante (Fenton-Navarro *et al.*, 2003).

3.4.3 - Testes de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Para os testes de inibição, soluções de D-Glicose, D-Manose, Metil-α-D-Manopiranosídeo, D-Galactose, D-Frutose, Lactose, Sacarose, D-Xilose e D-acetilglicosamina foram preparadas para uma concentração de 200 mM em NaCl 0,15M. Separadamente, estas soluções foram testadas em microplacas de 96 poços, adicionando-se se 50µl de solução de inibição até o 18º poço, com exceção do segundo, em substituição ao NaCl 0,15M utilizado na atividade hemaglutinante. No segundo poço foram colocados 50µl da solução inibidora com o dobro da

concentração. Em seguida, adicionou-se ao segundo poço 50µl da amostra (100µg de proteínas), sendo realizada diluição seriada na proporção de 1:2, até o 18^o poço. A amostra foi incubada com a solução inibidora por 15 min, sendo em seguida adicionados aos 18 poços 50µl da solução de hemácias 2,5%. A placa foi incubada por 1h em superfície plana.

A inibição da atividade hemaglutinante do muco de *P. caribaeorum* por açúcares foi expressa pela porcentagem da diminuição do título de hemaglutinação, tendo como 100% o maior título com atividade hemaglutinante da amostra.

3.5 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MUCO DE *P. caribaeorum*

3.5.1 - Precipitação Protéica dos Mucos

Inicialmente, as amostras Mar/09B e Jan/10B foram submetidas à precipitação com sulfato de amônio de acordo com Green e Hughens (1955), nas faixas de concentração 0-45% e 45-90%. Devido ao baixo rendimento na coleta do muco de Mar/09, toda esta amostra foi utilizada na precipitação. Para obtenção da primeira fração protéica (F1), sulfato de amônio foi adicionado a cada amostra até uma concentração de 45% e a suspensão mantida sob agitação constante a 4°C por aproximadamente 24h. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 11500 x g por 10 min e o precipitado resultante denominado F1-Mar/09 e F1-Jan/10, de acordo com a amostra inicial utilizada. Aos sobrenadantes resultantes, foi adicionado sulfato de amônio até a concentração final de 90%, para a obtenção da segunda fração protéica (F2). A suspensão permaneceu sob agitação constante a 4°C por aproximadamente 24 horas, sendo posteriormente centrifugada a 11500 x g por 10 minutos. Os precipitados foram denominados F2-Mar/09 e F2-Jan/10. Os sobrenadantes finais foram nomeados de SF-Mar/09 e SF-Jan/10.

No intuito de tentar separar melhor as proteínas e glicoproteínas de outras biomoléculas presentes no muco, além de obter uma amostra menos viscosa que facilitasse a sua aplicação em colunas cromatográficas, o muco de Mai/10 foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, após passar pelo processo de diluição 1/3, em faixas de concentração mais curtas (0-25%, 25-50%, 50-75% e 75-

100%), resultando em cinco frações protéicas denominadas: F1-, F2-, F3-, F4- e SF-Mai/10^{1/3}, respectivamente.

Todas as frações obtidas em ambos os processos de precipitação foram ressuspensas em água destilada, dialisadas contra a mesma a 4°C por 24h, sendo a água substituída a cada 2 h, liofilizadas e mantida a -20°C até o momento do uso. Posteriormente, as frações foram submetidas à dosagem protéica e testes de hemaglutinação de acordo com os itens 3.3 e 3.4.2, respectivamente.

3.5.2 - Análises Cromatográficas

Diferentes colunas cromatográficas foram testadas na tentativa de se obter uma metodologia específica para o muco de *P. caribaeorum*, já que não foram encontradas na literatura metodologias para a purificação de proteínas de amostras com características similares. Os passos cromatográficos foram realizados com amostra submetida ao processo de diluição e diferentes frações protéicas, resultantes das 3 amostras de muco submetidas à precipitação por sulfato de amônio, preferencialmente as que apresentaram atividade hemaglutinante, maior solubilidade, menor viscosidade e maior concentração protéica.

3.5.2.1 - Cromatografia de afinidade manual

Cromatografias de afinidade para lectinas foram realizadas em coluna ConA Sepharose 4B (4 ml, GE Healthcare, Suécia), montada e equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,5M, mesmo tampão utilizado para diluir as amostras. A amostra (1mg/ml de proteínas), previamente centrifugada a 5.000 x g por 10 min, foi aplicada à coluna, sendo esta incubada a 4°C por 12 horas, para maior tempo de interação das moléculas da amostra com os ligantes da coluna. O material não retido foi eluído com 12 ml do tampão de equilíbrio e o material com afinidade à coluna foi eluído com 12 ml de tampão PBS 50 mM pH 4,5 contendo NaCl 0,5 M, ou com Tris-HCl 20mM pH 7,4 contendo NaCl 0,5M e Metil- α -D-Manopiranosídeo 0,5M, em fluxo de 0,2 ml/min. O conteúdo protéico das frações coletadas foi monitorado a 280 nm. Em seguida, as frações foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C por 24 h e liofilizadas, sendo posteriormente

submetidas à dosagem protéica, testes de hemaglutinação e SDS-PAGE como descrito nos itens 3.3, 3.4.2 e 3.6, respectivamente.

Ao final de cada cromatografia a coluna foi lavada com 12 ml de NaCl 1 M para a retirada do material que não foi eluído com o tampão de eluição, seguida por 12 ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,5M, MnCl₂ 1mM e CaCl₂ 1mM, para o restabelecimento dos íons necessários para o bom funcionamento da resina.

3.5.2.2 - Cromatografia de afinidade em sistema AKTA purifier

Visando maior rapidez e praticidade nas análises, amostras (1 mg/ml de proteína) foram cromatografadas em coluna HiTrap ConA (1ml, GE Healthcare, Suécia) conectada ao sistema AKTA Purifier (GE Healthcare, Suécia). A preparação das amostras, o equilíbrio da coluna e a eluição das frações foram realizados utilizando os tampões descritos para a cromatografia de afinidade em sistema manual. Após a entrada da amostra na coluna, a corrida foi suspensa por 10 min para incubação da amostra com a resina, sendo então reiniciada a cromatografia. O fluxo de ligação foi de 0,1 ml/min e o de eluição de 0,5 ml/min, sendo coletadas frações de 1ml. O conteúdo protéico foi monitorado a 280 nm.

3.5.2.3 - Cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA purifier

As cromatografias foram realizadas em coluna Superdex 200 (24 ml, GE Healthcare, Suécia), conectada ao sistema AKTA Purifier (GE Healthcare, Suécia) e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Amostras de 1 ml (5 mg/ml de proteínas), previamente diluídas no tampão inicial e centrifugadas a 5000 x g por 10 min, foram aplicadas a coluna e as frações (2ml) eluídas com o tampão de equilíbrio a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. O conteúdo protéico foi monitorado a 280 nm.

3.5.2.4 - Cromatografia de troca iônica em sistema AKTA Purifier

Cromatografias de troca iônica foram realizadas em coluna Resource Q (1ml, GE Healthcare, Suécia), previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM pH

8,0, a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. Após centrifugação a 5000 x g por 10 min e sonicação do sobrenadante por 15 min, amostras de 1 ml (1mg/ml de proteínas), previamente diluídas e dialisadas (a 4°C por 12 horas) contra o tampão de equilíbrio, foram aplicadas à coluna. O conteúdo não ligado à coluna foi eluído com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, enquanto as moléculas aniônicas ligadas à coluna foram eluídas com o mesmo tampão contendo NaCl, em gradiente linear de 0-1M, a um fluxo de 0,5 ml/min. As frações resultantes foram dialisadas contra água destilada por 24h a 4°C e concentradas com polietilenoglicol (PEG) 35000 Da para os testes de hemaglutinação e análise por SDS-PAGE.

3.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Eletroforeses foram realizadas segundo o método de Laemmli (1970), na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). Utilizou-se gel de empilhamento 5% em tampão Tris/HCl 0,5M pH 6,8, géis de resolução 10% ou 12,5% em tampão Tris/HCl 1,5M pH 8,75, tampão de corrida Tris 0,025M glicina 0,192M contendo SDS 0,1% pH 8,3 e padrões de massa molecular de 14 a 97 KDa (LMW-SDS Marker Kit, GE Healthcare, New Jersey, U.S.A.). As eletroforeses foram processadas a 100 V, por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram corados por AgNO₃ segundo o método de Blum et al., (1987).

3.7 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA

O ensaio de inibição da atividade hemorrágica, induzida pela peçonha de *B. leucurus*, pelo muco de *P. caribaeorum* foi realizado utilizando grupos (n=3) de camundongos fêmeas, pesando entre 18 e 24 g, com o dorso previamente depilado.

Inicialmente, como controle positivo da hemorragia, um grupo de animais foi inoculado com 50 µl de peçonha (10 µg), por via intradérmica. Uma hora após o inóculo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a pele do dorso retirada para a medição do halo hemorrágico. Utilizando um paquímetro, a medição foi realizada traçando uma cruz, a partir do centro do halo, pegando a maior distância. Para os testes de inibição, as amostras (50 µg de proteínas) foram pré-incubadas com a peçonha (10 µg), por 10 minutos a temperatura ambiente, e em

seguida a mistura foi testada no dorso de camundongos como descrito acima. Como controles negativos, grupos de animais foram inoculados ou com 50 μ l de solução salina 0,85% ou com 50 μ l das amostras de *P. caribaeorum* (50 μ g de proteínas).

A inibição da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops leucurus* pelo muco de *P. caribaeorum* foi expressa pela porcentagem de diminuição do halo hemorrágico, considerando-se o halo hemorrágico provocado pela peçonha (controle positivo) como 100%.

3.8 – RESUMO ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA UTILIZADA

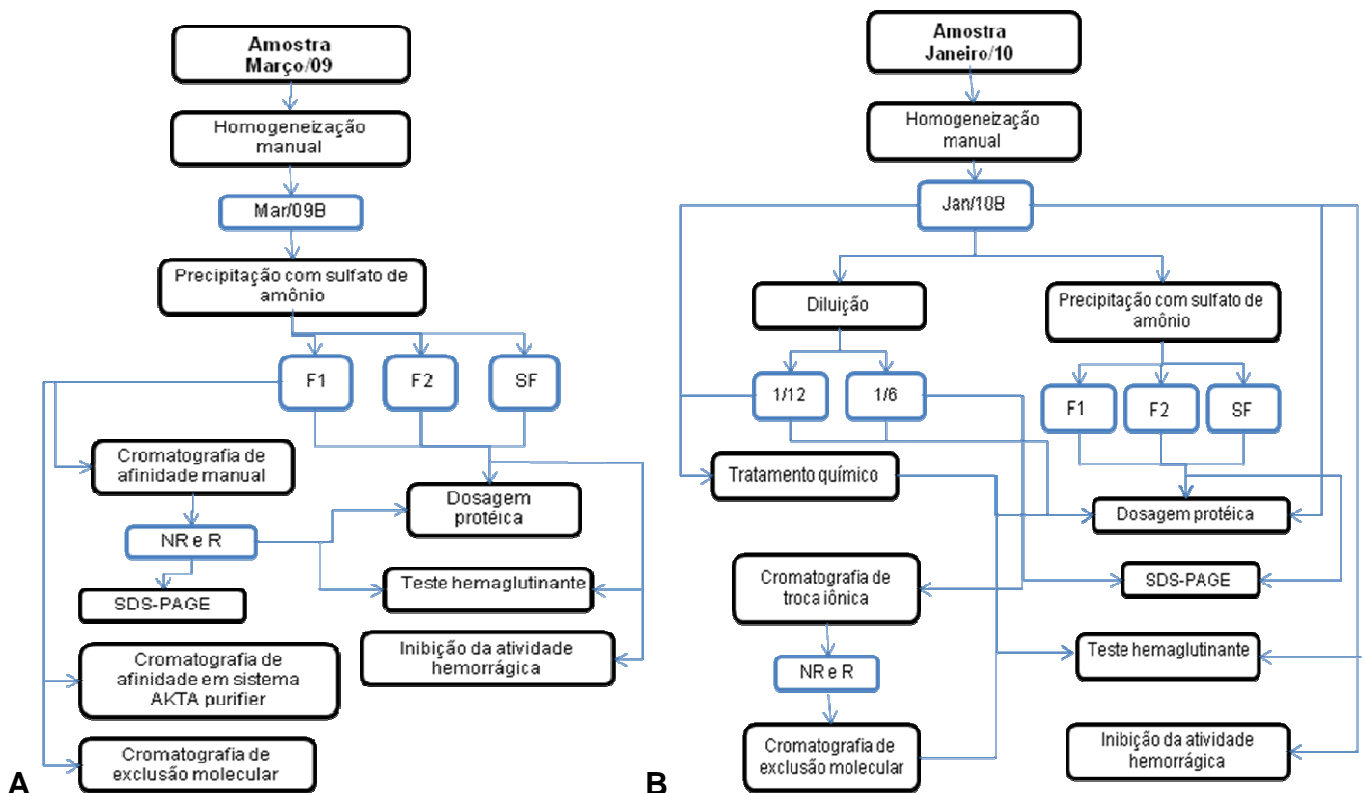


Figura 2 - Resumo esquemático da metodologia utilizada. (A) Amostra coletada em Março/09 e, **(B)** amostra coletada em Janeiro/10.

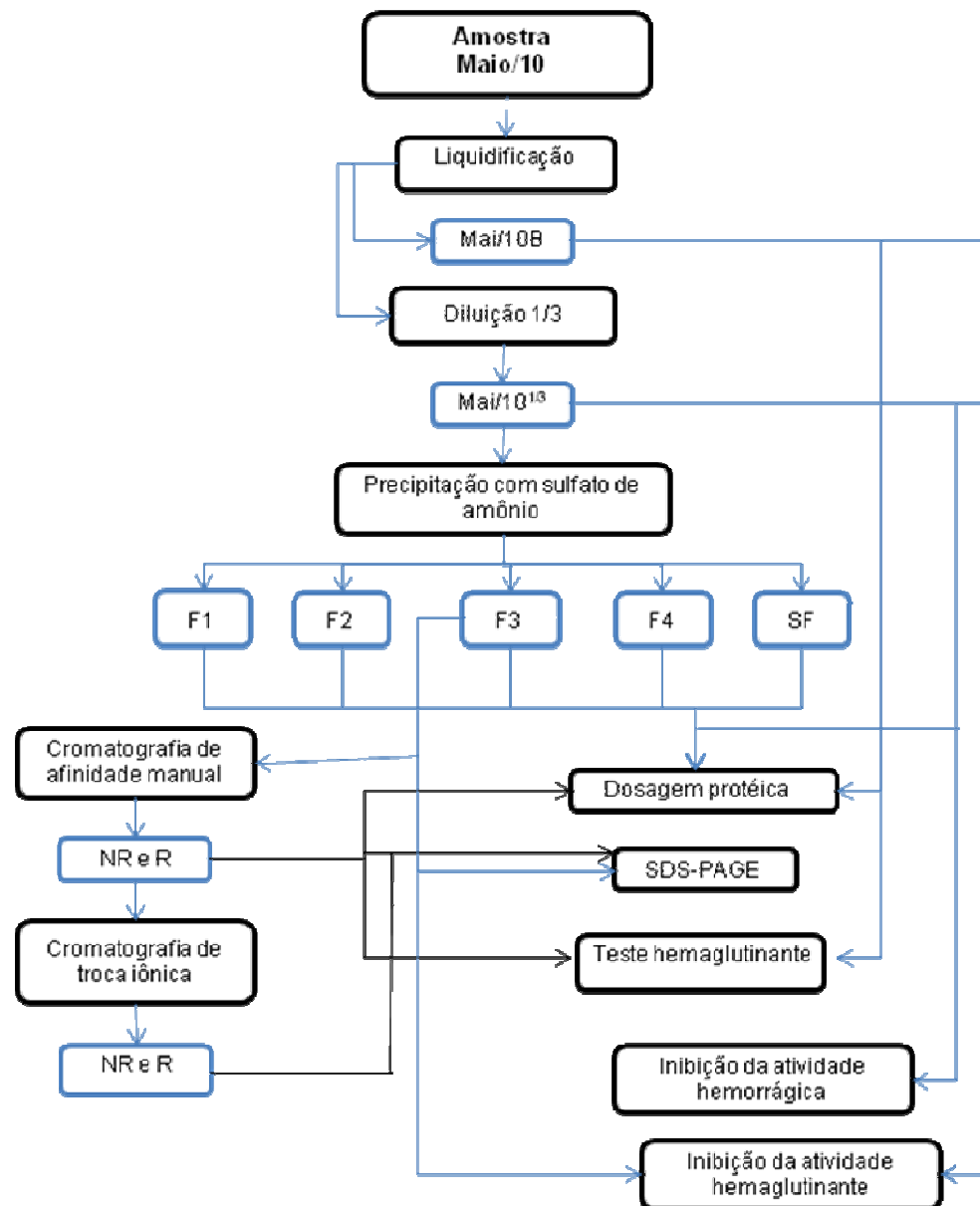


Figura 3 - Resumo esquemático da metodologia utilizada. Amostra coletada em Maio/10.

4 - RESULTADOS

4.1 - COLETAS DE MUCO

Foram obtidos da coleta de Março/09 apenas 0,2 L de muco. Apesar de haver quatro coletores trabalhando, o tempo de coleta foi de aproximadamente 20 min., devido a um atraso na chegada ao costão rochoso e conseqüente subida da maré. A coleta de Janeiro/10 rendeu 1,6 L de muco, obtidos em aproximadamente 2 horas, por cinco coletores. A coleta de Maio/10 rendeu 1,5 L de muco, obtidos em aproximadamente 3 horas por apenas um coletor.

4.2 - PROCESSAMENTO DOS MUCOS

4.2.1 - Homogeneização das Amostras

Das duas formas de homogeneizações testadas, a liquidificação da amostra se mostrou a mais eficaz. Enquanto a homogeneização manual não misturou a amostra, deixando a parte compacta do muco separada da parte líquida, provocando assim bastante perda de material na hora da centrifugação pela não separação da parte compacta, a liquidificação homogeneizou a amostra por completo ocorrendo completa separação na centrifugação e alto aproveitamento da amostra.

4.2.2 - Diluição das Amostras

Devido à escassez da amostra Março/09, apenas as amostras de Janeiro e Maio/10 foram utilizadas. Inicialmente a diluição foi realizada na proporção 1/12 segundo a metodologia utilizada. Em seguida foi verificado que não havia diferenças significantes entre os mucos diluídos 1/6 e 1/12. Desta forma preferiu-se diminuir ainda mais a proporção da diluição utilizada (1/3), a fim de se trabalhar com menores quantidades de amostras e facilitar o andamento da pesquisa.

4.2.3 - Dosagem Protéica e Atividade Hemaglutinante dos Mucos Diluídos

As dosagens protéicas resultantes dos processamentos dos mucos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Dosagens protéicas do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* bruto e diluído, coletado nos meses de Janeiro e Maio/10. Realizadas em micro-placas de 96 poços, utilizando o método de Bradford (1976).

AMOSTRAS	Jan/10	Mai/10
	Concentração Protéica (mg/ml)	
B**	0,186 ± 0,008	0,196 ± 0,002
1/3	*	0,189 ± 0,008
1/6	0,186 ± 0,016	*
1/12	0,186 ± 0,002	*

*Não determinado

**Amostras iniciais: Jan/10B e Mai/10B

Comparando as amostras Jan/10B e Mai/10B, verificou-se uma semelhança entre os valores obtidos para o teor protéico, correspondendo ambos a menos de 20% dos constituintes da amostra. Os valores obtidos nas dosagens protéicas das amostras diluídas demonstraram que o processo de diluição não influenciou positiva ou negativamente na quantidade de proteínas.

Os resultados referentes à atividade hemaglutinante das amostras iniciais e diluídas estão apresentados na Tabela 2. Comparando-se as amostras Jan/10B e Mai/10B, observou-se que, embora tenham apresentado dosagens protéicas bastante semelhantes, os maiores títulos de hemaglutinação foram obtidos por Jan/10B sobre hemácias do tipo O+ (2048 U.H.) e AB+ (256 U.H.), apresentando atividade hemaglutinante específica (AHE) de 11010,7 e 1376,3 e dose mínima hemaglutinante (DMHg) de 0,98 e 7,8 ng/ml de proteínas, respectivamente, enquanto que Mai/10B apresentou título de 128 U.H. para hemácias A+ e AB+, com AHE de 653,1 e DMHg de 10 ng/ml.

Quando as amostras de Janeiro e Maio/10 foram submetidas ao processo de diluição, as frações resultantes tiveram sua atividade hemaglutinante bastante diminuída. Jan/10^{1/12} e Jan/10^{1/6} apresentaram títulos de 8 e 32 U.H., AHE de 43,0 e 172,0 e DMHg de 250 e 60 ng/ml, respectivamente, sobre hemácias do tipo O+. Mai/10^{1/3} apresentou 16 U.H., AHE de 84,6 e DMHg de 120 ng/ml, enquanto a

amostra inicial Mai/10B apresentou 128 U.H., AHE de 653,1 e DMHg de 10 ng/ml sobre hemácias AB+. A maior atividade hemaglutinante de Mai/10^{1/3} foi sobre hemácias do tipo O+ com 32 U.H., AHE de 169,3 e DMHg de 60 ng/ml.

Apesar do processo de diluição das amostras não ter melhorado a concentração de proteínas e ainda ter diminuído a atividade hemaglutinante, o mesmo foi bastante efetivo na diminuição da viscosidade, facilitando as etapas posteriores.

Tabela 2 - Atividade hemaglutinante do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* bruto e diluído, coletado nos meses de Janeiro e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml.

AMOSTRAS	TÍTULO DE HEMAGLUTINAÇÃO (U.H.)**				ATIVIDADE ESPECÍFICA (AHE)***				DMHg**** (ng/ml de proteína)			
	Hemácias				Hemácias				Hemácias			
	A+	B+	AB+	O+	A+	B+	AB+	O+	A+	B+	AB+	O+
Jan/10B	64	32	256	2048	344,1	172,0	1376,3	11010,7	30	60	7,8	0,98
Jan/10 ^{1/6}	*	*	*	32	*	*	*	172,0	*	*	*	60
Jan/10 ^{1/12}	*	*	*	8	*	*	*	43,0	*	*	*	250
Mai/10B	128	*	128	*	653,1	*	653,1	*	10	*	10	*
Mai/10 ^{1/3}	4	4	16	32	21,2	21,2	84,6	169,3	500	500	120	60

*Não determinado

**Unidade de Hemaglutinação

***Atividade Específica: UH/mg proteína

****Dose Mínima Hemaglutinante

4.2.4 - Dosagem Protéica e Atividade Hemaglutinante dos Mucos Tratados Quimicamente

Analisando os resultados da dosagem protéica dos mucos quimicamente tratados (Tabela 3), podem ser observadas maiores concentrações nas amostras tratadas com uréia 6M e ácido acético 1%, em relação à amostra inicial Jan/10B. O muco tratado com uréia 6M apresentou a maior dosagem protéica (0,254 mg/ml).

Em relação aos mucos tratados com clorofórmio/metanol e éter/etanol, tendo como amostra inicial Jan/10^{1/12}, não foi observada diferença significativa no teor protéico da amostra submetida ao primeiro tratamento, enquanto que o segundo atuou diminuindo a concentração de proteínas.

Tabela 3 - Dosagens protéicas do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* tratado quimicamente, coletado no mês de Janeiro/10. Realizadas em micro-placas de 96 poços, utilizando o método de Bradford (1976).

AMOSTRAS	Concentração Protéica (mg/ml)
Jan/10B	0,186 ± 0,008
Jan/10B / Uréia 6M	0,254 ± 0,04
Jan/10B / Ácido Acético 1%	0,202 ± 0,01
Jan/10 ^{1/12}	0,186 ± 0,002
Jan/10 ^{1/12} / Clorofórmio/Metanol	0,184 ± 0,03
Jan/10 ^{1/12} / Éter/Etanol	0,108 ± 0,016

Em relação à atividade hemaglutinante dos mucos quimicamente tratados, os resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Os testes realizados nas amostras tratadas com uréia 6M e ácido acético 1% revelaram altos títulos de hemaglutinação, sendo o título da amostra tratada com uréia 6M igual ao título da amostra inicial Jan/10B (2048 U.H. e DMHg de 0,98 ng/ml), entretanto, as atividades específicas foram significativamente diferentes (8063 a AHE do muco tratado com uréia 6M e 11010,75 a AHE do muco inicial). Por outro lado, as amostras tratadas com Clorofórmio/metanol e Éter/etanol não mostraram atividade quando testadas sobre hemácias do tipo O+.

Embora os tratamentos com uréia e ácido acético tenham aumentado o conteúdo protéico e mantido a atividade hemaglutinante sobre hemácias do tipo O+, os mesmos não foram eficazes na diminuição da viscosidade da amostra, dificultando o seu uso em testes farmacológicos e etapas de purificação.

Tabela 4 - Atividade hemaglutinante do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* tratado quimicamente, coletado no mês de Janeiro/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml.

AMOSTRAS	TÍTULO DE HEMAGLUTINAÇÃO (U.H.)*	ATIVIDADE ESPECÍFICA (AHE)**	DMHg*** (ng/ml de proteína)
Hemácias O+			
Jan/10B	2048	11010,75	0,98
Jan/10B / Uréia 6M	2048	8063	0,98
Jan/10B / Ácido Acético 1%	512	2534,65	3,9
Jan/10 ^{1/12}	8	43,01	250
Jan/10 ^{1/12} / Clorofórmio/Metanol	0	0	0
Jan/10 ^{1/12} / Éter/Etanol	0	0	0

*Unidade de Hemaglutinação

**Atividade Específica: UH/mg proteína

***Dose Mínima Hemaglutinante

4.3 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MUCO DE *P. caribaeorum*

4.3.1 - Precipitação com Sulfato de Amônio

A Tabela 5 apresenta as concentrações protéicas das frações obtidas na precipitação das amostras Mar/09B, Jan/10B e Mai/10^{1/3} com sulfato de amônio.

De forma geral, comparando as concentrações protéicas das amostras dos três diferentes meses, foram verificadas maiores concentrações nas amostras de Mar/09B. De acordo com os resultados encontrados, as frações F1 das amostras de Mar/09B e Jan/10B, submetidas ao mesmo processo de precipitação, apresentaram a maior concentração protéica, sendo elas de 0,572 e 0,185 mg/ml, respectivamente. Com relação à amostra de Mai/10^{1/3}, fracionada em quatro etapas, o maior conteúdo protéico foi encontrado na fração F3 (0,363 mg/ml).

Tabela 5 - Dosagem protéica das frações resultantes da precipitação protéica com sulfato de amônio do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, coletado nos meses de Março/09, Janeiro e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços utilizando o método de Bradford (1976).

AMOSTRAS	Mar/09	Jan/10	Mai/10 ^{1/3}
Concentração Protéica (mg/ml)			
F1 (0 - 45%)	0,572 ± 0,04	0,185 ± 0,02	*
F2 (45 - 90%)	0,509 ± 0,012	0,146 ± 0,016	*
F1 (0 - 25%)	*	*	0,050 ± 0,003
F2 (25 - 50%)	*	*	0,214 ± 0,02
F3 (50 - 75%)	*	*	0,363 ± 0,027
F4 (75 - 100%)	*	*	0,144 ± 0,025
SF**	0,491 ± 0,006	0,028 ± 0,008	0,047 ± 0,022
B***	*	0,186 ± 0,008	0,196 ± 0,002

*Não determinado

**Sobrenadante Final

***Amostras iniciais: Mar/09B, Jan/10B e Mai/10^{1/3}

Com relação à atividade hemaglutinante (Tabela 6), apenas as frações obtidas das precipitações de Mar/09B e Mai/10^{1/3} foram submetidas aos testes.

De acordo com os resultados obtidos nas frações de Mar/09B, F1 apresentou maior atividade sobre hemácias O+ (128 U.H., AHE de 223,8 e DMHg de 10 ng/ml), enquanto F2 foi mais ativo sobre hemácias A+ (32 U.H., AHE de 62,9 e DMHg de 60 ng/ml). O SF não apresentou ação hemaglutinante sobre nenhum tipo de hemácias testadas.

Com relação às frações de Mai/10^{1/3}, todas apresentaram atividade hemaglutinante, inclusive o SF. A fração F1 apresentou a maior atividade sobre todos os tipos de hemácias testadas (64 U.H., AHE de 1280 e DMHg de 30 ng/ml), enquanto que o F3 apresentou maior atividade sobre hemácias AB+ e O+ (32 U.H., AHE de 88,1 e DMHg de 60 ng/ml). Apesar de sua menor atividade hemaglutinante, F3-Mai/10^{1/3} foi escolhido para dar continuidade ao processo de purificação das proteínas, já que foi a amostra que apresentou maior dosagem protéica, baixa viscosidade e boa solubilidade. Neste intuito, a fração F3-Mai/10^{1/3} foi analisada por SDS-PAGE 10%, mostrando seis bandas protéicas, com pesos moleculares estimados em 158, 115, 63, 53, 34 e 32 KDa aproximadamente (Figura 4).

Tabela 6 - Atividade hemaglutinante das frações resultantes do processo de precipitação com sulfato de amônio do muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, coletado nos meses de Março/09 e Maio/10. Realizada em micro-placas de 96 poços, utilizando hemácias humanas glutarizadas e amostras em concentração protéica inicial 2mg/ml.

AMOSTRAS	TÍTULO DE HEMAGLUTINAÇÃO (U.H.)**				ATIVIDADE ESPECÍFICA (AHE)***				DMHg **** (ng/ml de proteína)			
	Hemácias				Hemácias				Hemácias			
	A+	B+	AB+	O+	A+	B+	AB+	O+	A+	B+	AB+	O+
F1-Mar/09	64	64	*	128	111,9	111,9	*	223,8	30	30	*	10
F2-Mar/09	32	16	*	16	62,9	31,4	*	31,4	60	120	*	120
SF-Mar/09	0	0	*	0	0	0	*	0	0	0	*	0
F1-Mai/10^{1/3}	64	64	64	64	1280	1280	1280	1280	30	30	30	30
F2-Mai/10^{1/3}	32	32	64	64	149,5	149,5	299,1	299,1	60	60	30	30
F3-Mai/10^{1/3}	16	16	32	32	44,1	44,1	88,1	88,1	120	120	60	60
F4-Mai/10^{1/3}	2	2	4	8	13,9	13,9	27,8	55,5	1000	1000	500	250
SF-Mai/10^{1/3}	4	4	16	32	85,1	85,1	340,4	680,8	500	500	120	60

*Não determinado

**Unidade de Hemaglutinação

***Atividade Específica: UH/mg proteína

****Dose Mínima Hemaglutinante

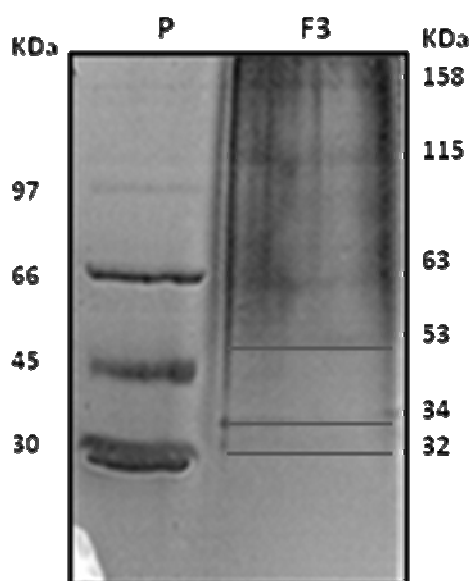


Figura 4 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% da fração F3-Mai/10^{1/3}. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). F3) Bandas protéicas com massas moleculares estimadas, resultantes da análise da amostra F3-Mai/10^{1/3}.

4.3.2 - Análises Cromatográficas

Com o objetivo de obter uma seqüência de passos cromatográficos no qual fosse possível isolar uma proteína do muco de *P. caribaeorum*, diversas cromatografias foram realizadas variando as amostras utilizadas, a concentração das amostras, os sistemas de purificação, as colunas cromatográficas, as taxas de fluxo e os tampões utilizados para a eluição. Alguns dos resultados para estas tentativas podem ser visualizados no apêndice deste trabalho.

A seguir será apresentada a metodologia que se mostrou mais eficaz para a obtenção de proteínas do muco de *P. caribaeorum*. A amostra escolhida para estas análises foi a fração F3-Mai/10^{1/3}, resultante do processo de diluição do muco na proporção 1/3, seguida pela precipitação por sulfato de amônio entre 50 e 75% de sal. A escolha se baseou no fato desta amostra ter apresentado maior dosagem protéica, menor viscosidade e alta solubilidade, além de ter apresentado uma atividade hemaglutinante intermediária.

4.3.2.1 - Cromatografia de afinidade (Sistema manual)

Alíquotas de 4ml (1mg/ml de proteínas) de F3-Mai/10^{1/3} foram submetidas à doze cromatografias de afinidade em coluna ConA Sepharose 4B, realizadas de acordo com o item 3.5.2.1 tendo sido o material ligado a coluna eluído com tampão contendo Metil- α -D-manopiranosídeo 0,5M. O perfil cromatográfico (Figura 5) exibiu dois picos, denominados NR (material não ligado à resina) e R (material com afinidade à resina). Depois de dialisados e liofilizados, os pools NR e R foram ressuspensos e submetidos à dosagem protéica, apresentando concentrações de 1,141 mg/ml e 0,551 mg/ml, respectivamente.

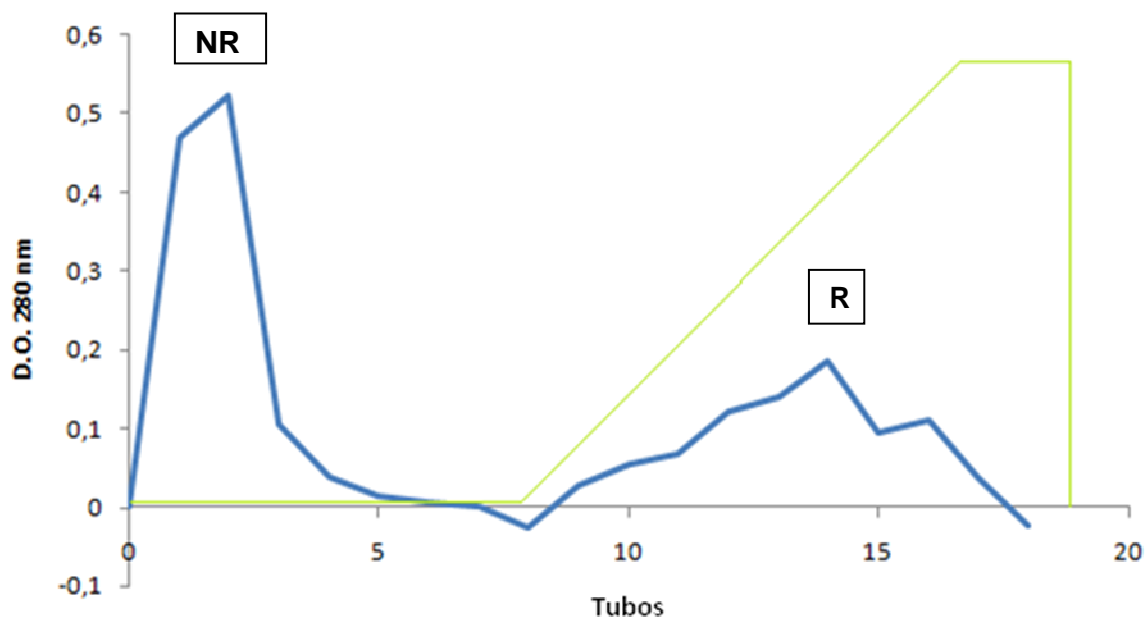


Figura 5 - Cromatografia em coluna ConA Sepharose 4B do F3-Mai/10^{1/3}. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 20mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 0,6 ml/min), sendo o **NR** eluído com mesmo tampão (fluxo 0,4 ml/min) e o **R** eluído com Tris HCl 20mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,5 M e Metil- α -D-manopiranosídeo 0,5M (fluxo 0,2 ml/min). O conteúdo proteico das frações foi monitorado a 280 nm.

Para determinar a atividade hemaglutinante dos pools NR e R foram utilizadas hemácias do tipo A+. Apesar da alta dosagem protéica obtida pelo pool R, este apresentou moderada ação hemaglutinante (16 U.H., AHE de 29,04 e DMHg de 120 ng/ml). Não foi observada atividade hemaglutinante no NR.

O perfil eletroforético dos dois picos cromatográficos (Figura 6), mostrou 3 bandas protéicas majoritárias em NR, com massas moleculares estimadas em 87, 53 e 34 KDa, e 1 banda protéica em R, com massa molecular estimada em 34 KDa.

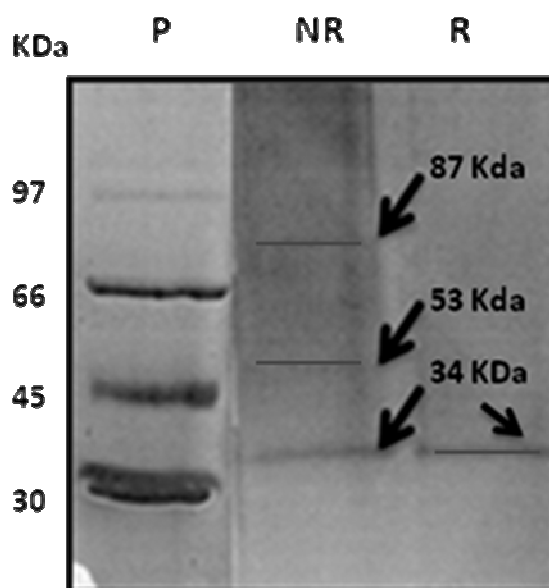


Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos NR e R. Picos resultantes da cromatografia de F3-Mai/10^{1/3} em coluna ConA Sepharose 4B. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). NR) e R) Material não ligado e com afinidade a coluna, respectivamente. Setas indicando as massas moleculares estimadas das bandas protéicas.

4.3.2.2 - Cromatografia de troca iônica (AKTA purifier)

Os pools NR e R, obtidos da cromatografia de afinidade de F3-Mai/10^{1/3}, foram submetidos separadamente a cromatografias em coluna Resource Q.

O perfil cromatográfico do NR mostrou três picos (Figura 7). O primeiro, contendo as proteínas neutras e com cargas positivas, correspondeu à fração não ligada à coluna e foi denominado NR-Q1. Quando analisado por eletroforese (Figura 8), este pico apresentou duas bandas protéicas majoritárias, de massas moleculares estimadas em 34 e 19 KDa. O segundo e o terceiro picos da Resource Q, contendo proteínas carregadas negativamente, foram denominados NR-Q2 e NR-Q3, respectivamente. No seu perfil eletroforético, nenhuma banda protéica foi visualizada em NR-Q2, enquanto que em NR-Q3 foi observada uma banda de massa molecular estimada em 35 KDa. Como esperado, não houve atividade hemaglutinante para NR-Q1, NR-Q2 e NR-Q3.

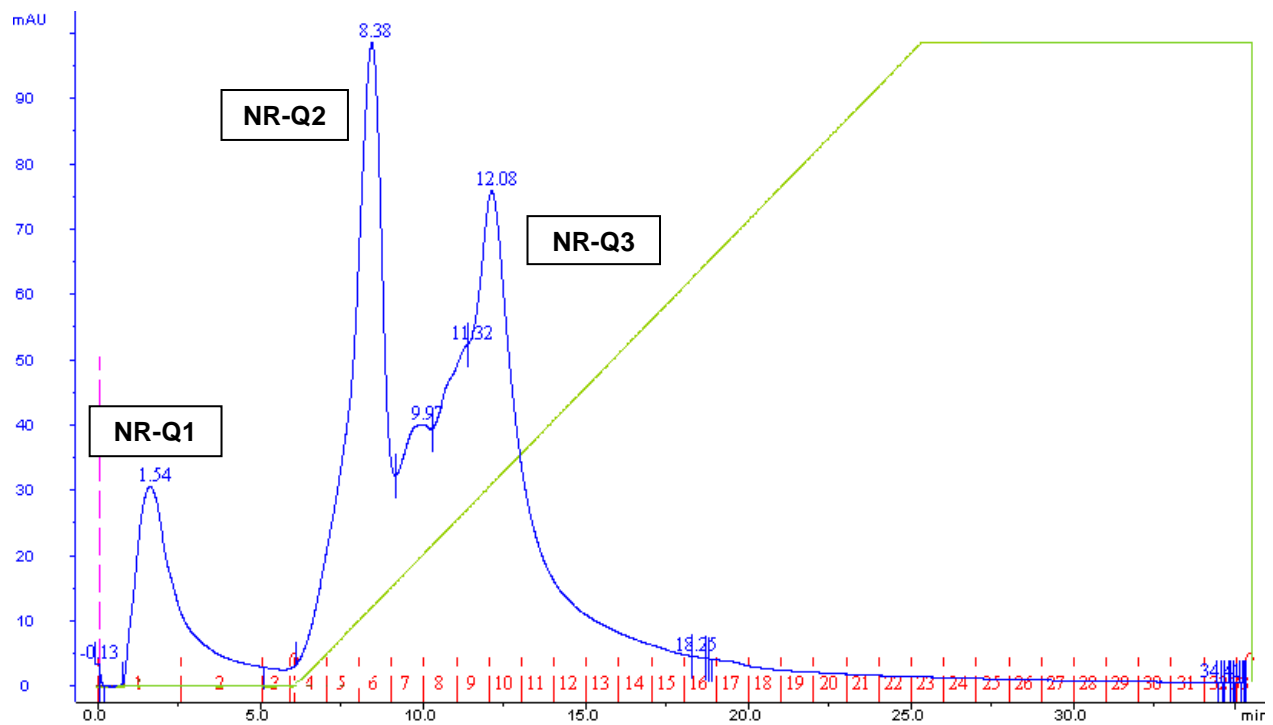


Figura 7 - Cromatografia em coluna Resource Q do pico NR. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, em fluxo de 0,5 ml/min. **NR-Q1** foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que **NR-Q2** e **NR-Q3** foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

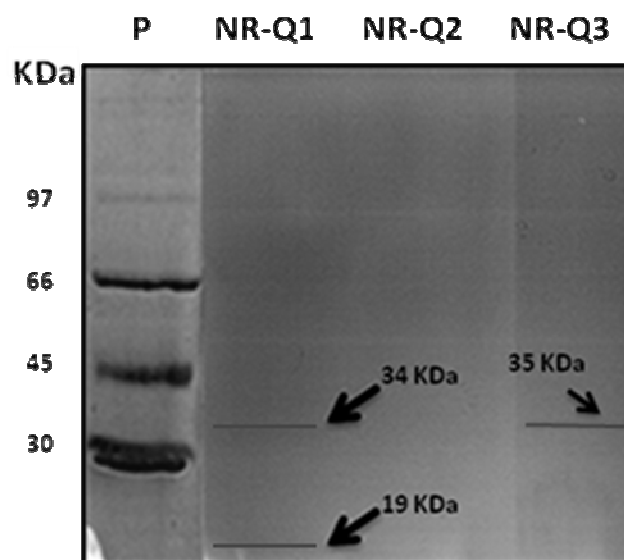


Figura 8 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos NR-Q1, NR-Q2 e NR-Q3. Picos resultantes da cromatografia de NR em coluna Resource Q. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). Setas indicando as massas moleculares estimadas das bandas protéicas.

A cromatografia em coluna Resource Q da fração R, obtida também da cromatografia de afinidade, mostrou perfil muito similar ao encontrado para o pico NR. Na Figura 9, três picos majoritários podem ser visualizados, tendo sido denominados R-Q1, R-Q2 e R-Q3. A análise eletroforética destes picos (Figura 10) mostrou a presença de uma banda protéica em R-Q1 de peso molecular estimado em 34 KDa. Por outro lado, perfil protéico de R-Q2 e R-Q3 não foi visualizado.

Quando submetidos a testes de hemaglutinação, sobre hemácias tipo A+, apenas o pico R-Q1 apresentou atividade (2 U.H.). Devido ao baixo rendimento da purificação não foi possível determinar a atividade específica desta lectina, bem como a inibição da atividade hemaglutinante. A primeira lectina parcialmente purificada do muco de *Palythoa caribaeorum* foi então denominada **PcmL-1** (*Palythoa caribaeorum* mucus Lectin).

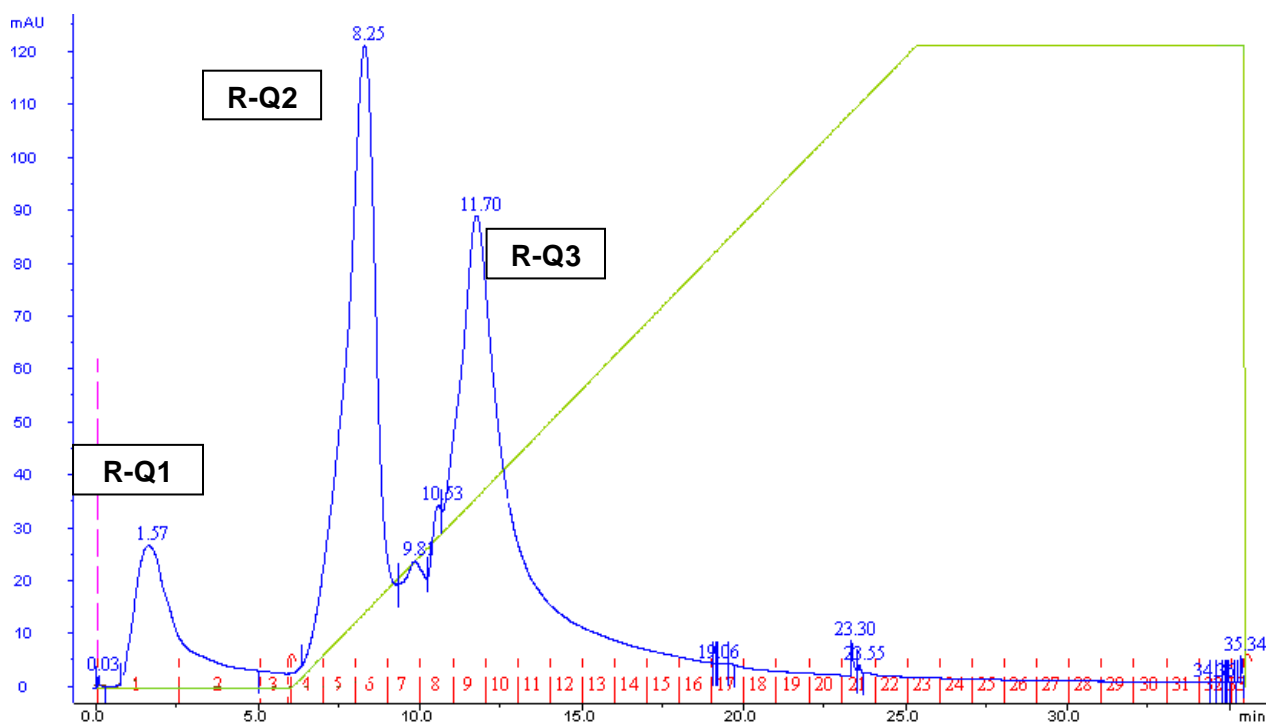


Figura 9 - Cromatografia em coluna Resource Q do pico R. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, em fluxo de 0,5 ml/min. R-Q1 foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que R-Q2 e R-Q3 foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

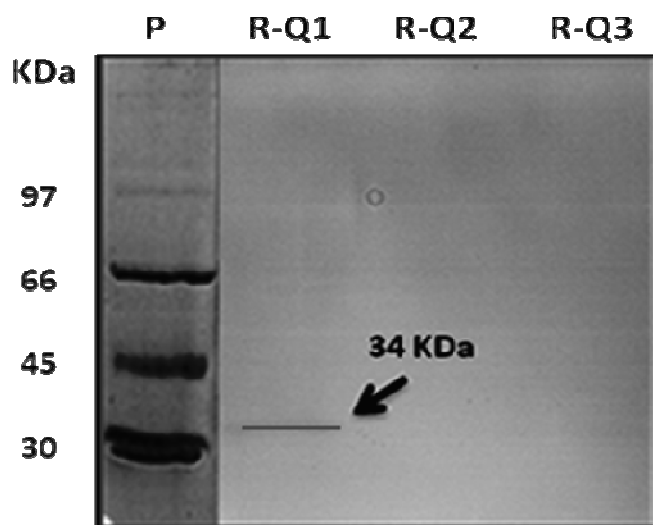


Figura 10 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% dos picos R-Q1, R-Q2 e R-Q3. Picos resultantes da cromatografia de R em coluna Resource Q. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO_3 de acordo com Blum *et al.* (1987). P) Padrões de massa molecular (30 a 97 KDa). Seta indicando a massa molecular estimada da única banda protéica visualizada em R-Q1.

Na Tabela 7 é possível visualizar o resumo da purificação de PcmL-1, comparando-se todos os resultados obtidos utilizando hemácias do tipo A+. Vale ressaltar que as amostras de muco apresentaram melhor afinidade para hemácias do tipo O+ e AB+. Isto sugere que se, nos testes realizados com as frações purificadas, fossem utilizadas hemácias O+ e AB+, os resultados seriam melhores do que o obtido com hemácias A+.

Tabela 7 - Resumo comparativo da purificação parcial da primeira lectina encontrada no muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (PcmL-1).

AMOSTRAS	HEMÁCIAS	TÍTULO (U.H.)**	AHE***	DMHg (ng/ml)****
Mai/10	A+	128	653,1	10
Mai/10 ^{1/3}	A+	4	21,2	500
F3 Mai/10 ^{1/3}	A+	16	44,1	120
Retido (Con A)	A+	16	29,04	120
PcmL-1	A+	2	*	*

*Não determinado

**Unidade de Hemaglutinação

***Atividade Específica: UH/mg proteína

****Dose Mínima Hemaglutinante

4.4 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Inicialmente, os açúcares D-Glicose, D-Manose, Metil- α -D-Manopiranosídeo, D-Galactose, D-Frutose, Lactose, Sacarose, D-Xilose ou D-acetil-glicosamina foram testados sobre a amostra F3-Mai/10^{1/3} a fim de identificar aqueles com maior especificidade na inibição da atividade hemaglutinante sobre hemácias do tipo AB+. Como resultado, apenas xilose e lactose foram capazes de inibir a hemaglutinação induzida pela amostra.

Testes de inibição da atividade hemaglutinante foram repetidos então utilizando xilose e lactose como inibidores e as seguintes amostras de Mai/10: Mai/10B, Mai/10^{1/3} e F3-Mai/10^{1/3}. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 11.

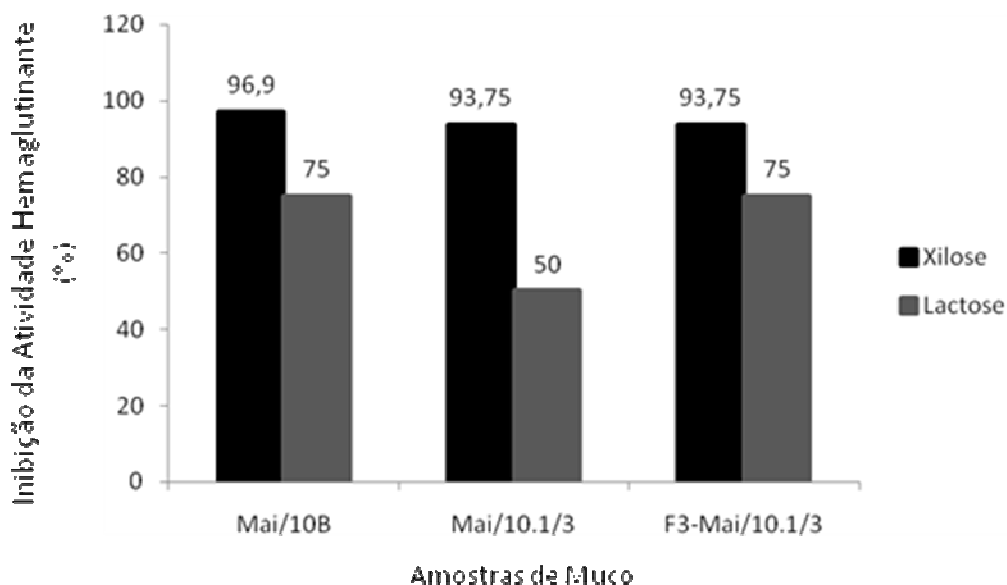


Figura 11 - Inibição da atividade hemaglutinante das amostras de Mai/10. Atividade realizada com as amostras Mai/10B, Mai/10^{1/3} e F3-Mai/10^{1/3} (2mg/ml de proteínas), utilizando os carboidratos Xilose e Lactose (200mM) como inibidores e hemácias humanas glutarizadas do tipo AB+.

De acordo com os resultados, a xilose mostrou alta especificidade para as amostras testadas, sendo mais específica para a amostra Mai/10B, a qual foi inibida em 96,9%. Já a Lactose foi menos ativa, sendo mais específica para as amostras F3-Mai/10^{1/3} e Mai/10B, as quais foram inibidas em 75%.

4.5 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Ensaio de inibição da atividade hemorrágica, induzida pela peçonha de *B. leucurus*, foram realizadas utilizando as amostras Jan/10B e Mai/10^{1/3}, as frações F1, F2 e SF-Mar/09, além de F1, F2, F3, F4 e SF-Mai/10^{1/3}.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram uma maior ação inibitória para a amostra de Jan/10B, chegando a inibir 84% do halo hemorrágico provocado pela peçonha. Altas porcentagens de inibição foram encontradas também quando testadas as frações F2-Mai/10^{1/3} (cerca de 60% de inibição) e F4-Mai/10^{1/3}, (59% de inibição), sendo estas taxas superiores à apresentada pela amostra inicial Mai/10^{1/3} (cerca de 31%). A fração F3-Mai/10^{1/3}, utilizada nos processos de purificação, foi capaz de inibir 47% da hemorragia provocada pela peçonha. As frações de Mar/09 foram as menos potentes em inibir a hemorragia, com taxas de inibição de 25%, 14,6% e 6,7% para F1, F2 e SF-Mar/09, respectivamente.

As medidas dos halos antihemorrágicos das amostras utilizadas podem ser visualizados na Tabela 8.

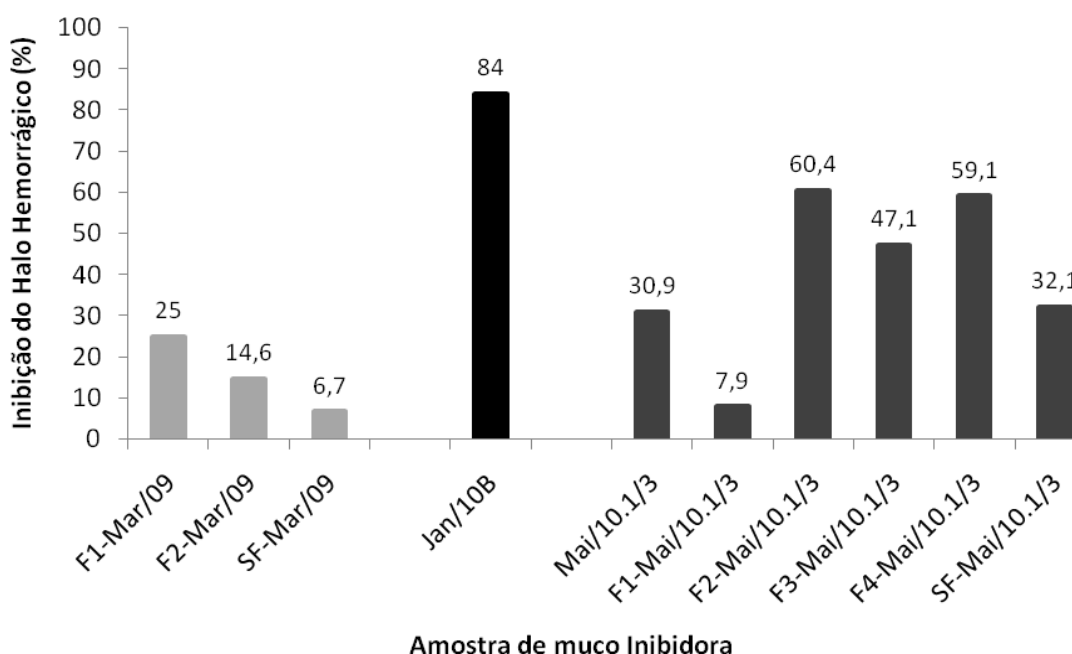


Figura 12 – Efeito inibitório das frações de muco de *Palythoa caribaeorum* sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops leucurus*. Testes realizados em dorso de camundongos fêmeas (18 e 24g), utilizando diferentes frações de muco (50 µg de proteínas) pré-incubadas com a peçonha (10 µg) por 10 min. Os animais foram injetados com a mistura por via intradérmica e os halos hemorrágicos medidos após 1h.

Tabela 8 – Halos antihemorrágicos das amostras de muco de *Palythoa caribaeorum* utilizadas no teste de inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops leucurus*. Testes realizados em dorso de camundongos fêmeas (18 e 24g), utilizando diferentes frações de muco (50 µg de proteínas) pré-incubadas com a peçonha (10 µg) por 10 min, sendo a peçonha utilizada como controle positivo da hemorragia. Os animais foram injetados com a mistura por via intradérmica e os halos hemorrágicos medidos após 1h.

AMOSTRAS DE MUCO INIBIDORAS	MEDIDAS DOS HALOS (cm)
F1 Mar/09	1,8 ± 0,4
F2 Mar/09	2,05 ± 0,05
SF Mar/09	2,24 ± 0,11
Peçonha (controle positivo da hemorragia)	2,4 ± 0,24
Jan/10B	0,47 ± 0,16
Mai/10 ^{1/3}	2,02 ± 0,22
F1 Mai/10 ^{1/3}	2,7 ± 0,36
F2 Mai/10 ^{1/3}	1,16 ± 0,16
F3 Mai/10 ^{1/3}	1,55 ± 0,27
F4 Mai/10 ^{1/3}	1,2 ± 0,05
SF Mai/10 ^{1/3}	1,99 ± 0,04
Peçonha (controle positivo da hemorragia)	2,93 ± 0,4

5 - DISCUSSÃO

O muco de *P. caribaeorum* é um fluido transparente, altamente viscoso (Meikle et al., 1988), contendo grande quantidade de sedimentos, que são liberados pelo seu organismo (Hubbard e Pocock, 1972; Haywick e Mueller, 1996).

Sua viscosidade característica pode ser atribuída à grande quantidade de glicoproteínas presentes e representa um fator limitante para o processo de purificação de proteínas. Devido à sua viscosidade, se faz necessária a realização de uma série de procedimentos antes da aplicação das amostras em colunas cromatográficas, a fim de quebrar a viscosidade destas amostras e evitar o entupimento das colunas, que em geral são bastante caras. Já em 1977, Daumas e Tomassin mencionaram certa dificuldade de trabalhar com este muco, devido a sua viscosidade e ainda pelo fato de após liofilização tornar-se de difícil solubilização.

O muco de *P. caribaeorum* normalmente apresenta uma consistência de um fluido compacto, com grande quantidade de material particulado que dificilmente é separado da parte líquida, mesmo após sofrer forte agitação mecânica e centrifugação.

A melhor forma de processamento encontrada foi a de liquidificação do muco, seguida por diluição sob agitação prolongada e centrifugação. Dessa forma, se obteve a parte líquida do muco totalmente separada da matéria particulada, o que conferiu a amostra uma considerável diminuição da viscosidade. Este processo de diluição e homogeneização prolongada do muco, antes da centrifugação, foi adaptado de um trabalho com muco bronquial humano (Slayter et al., 1984). Segundo os autores, a diluição acompanhada pela agitação da amostra por várias horas, permite uma melhor separação das moléculas, obtendo-se assim uma amostra mais livre de matéria não protéica, após centrifugação e diálise do material obtido.

Utilizando o método de liquidificação e diluição seguido de centrifugação, obteve-se a quebra da viscosidade do muco. Embora o processo de diluição não tenha alterado o conteúdo protéico das amostras e tenha prejudicado sua atividade hemaglutinante, os resultados obtidos sugerem que o método de diluição utilizado separou os complexos protéicos presentes na amostra de muco, o que levou a uma amostra menos viscosa, sendo esta a metodologia mais viável. A baixa da atividade

hemaglutinante na amostra diluída, no entanto, poderia ser explicada pela ausência de um sistema tamponado, contendo sal, no processo de diluição. A diluição foi realizada em água destilada, não em solução tampão, e por um longo tempo. Por ser de origem marinha, a manutenção de determinada concentração de sal na amostra pode ser limitante para o bom funcionamento das biomoléculas presentes no muco.

Entre um procedimento e outro utilizado na preparação das amostras, estas passaram por diversas diálises. A diálise foi um passo importante que permitiu retirar os sais e pequenas moléculas presentes no muco antes de a amostra ser liofilizada. Segundo Krupp (1985) há muitas inconsistências nos trabalhos que focam a composição bioquímica de mucos de corais, devido à contaminação da amostra com diferentes compostos, como material particulado, íons, sais, entre outros. Entretanto, ao ser utilizada, a amostra era sempre ressolubilizada em solução salina ou solução tampão, dependendo do procedimento a ser realizado (dosagem protéica, eletroforese, cromatografia, etc.).

Para acompanhar o processo de purificação de proteínas do muco de *P. caribaeorum*, foi escolhida a atividade hemaglutinante devido aos relatos na literatura da presença de lectinas em extrato de coral, anêmona e até medusa (Jimbo et al. 2000; Fenton-Navarro et al., 2003; Imamichi e Yokoyama, 2010). Neste trabalho, foi confirmada a presença de atividade hemaglutinante nas 3 amostras de muco testadas, bem como nas frações submetidas a processos de diálises, embora nestas últimas a atividade tenha sido reduzida.

Como primeiro passo de purificação foi escolhido o método de precipitação gradual de proteínas por sulfato de amônio. Este método foi necessário para a obtenção de amostras com maior conteúdo protéico, e porque embora o processo de diluição tenha diminuído significativamente a viscosidade das amostras, estas ainda não se apresentavam líquidas o suficiente para a realização de etapas cromatográficas.

A análise do conteúdo protéico das amostras precipitadas, bem como das amostras iniciais, resultou em dados interessante quanto à variabilidade do muco de *P. caribaeorum*. De acordo com os resultados, as frações do muco coletado em março de 2009 apresentaram concentrações protéicas bem maiores do que as amostras precipitadas de janeiro e maio de 2010. De acordo com estes resultados,

variações no conteúdo protéico do muco podem ocorrer, no entanto, em literatura não há estudos que mostrem variações (relacionadas a determinadas épocas do ano) na constituição de mucos de cnidários, embora sejam encontrados trabalhos focados em variações nas estações do ano (inverno e verão) relacionados ao branqueamento das colônias (Kemp et al., 2006), ao desencadeamento da espermatogênese (Boscolo e Silveira, 2005), ambos em *P. caribaeorum*, à densidade das algas simbióticas e pigmentos (Brown et al., 1999; Fitt et al., 2000), e à biomassa tecidual (Fitt et al., 2000), ambos em corais scleractíneos. Em pesquisa de Kelecom e Solé-Cava (1982), verificando a variação na composição de esteróis de três espécies de *Palythoa*, verificou-se que em *P. caribaeorum* os esteróis não apresentaram variação sazonal, geográfica ou sexual.

Pernambuco é um estado que fica no Nordeste do Brasil, na região intertropical, local que sofre com a grande oscilação das chuvas durante todo o ano, sendo característicos dois períodos: o seco (Outubro a Março) e o chuvoso (Abril a Setembro, podendo ocorrer a antecipação do período chuvoso) (Rebouças et al., 1999).

Um dos fatores que poderia ter influenciado na variação protéica dos mucos testados neste trabalho é a precipitação pluviométrica. Analisando dados pluviométricos do ITEP (Instituto Tecnológico de Pernambuco) dos anos 2009 e 2010, não foram observadas diferenças significantes na média de precipitações dos meses em que foram coletados os mucos. No entanto, verificando a precipitação pluviométrica diária, foi observado que nos dias de coleta das amostras de Jan/10 e Mai/10 houve 9.2mm e 21.8mm de precipitação, respectivamente, enquanto no dia da coleta da amostra de Mar/09 o índice de precipitação foi de 0 mm (sendo Mar/09 a amostra que, de forma geral, apresentou maior concentração protéica). Provavelmente no ano de 2010 houve a antecipação do período de chuvas, ocorrendo precipitações até três meses antes do período normal.

Inicialmente para a realização dos passos cromatográficos foi utilizada a amostra F1-Mar/09, a qual obteve a melhor dosagem protéica de todas as frações obtidas a partir do processo de precipitação com sulfato de amônio, bem como uma das melhores atividades hemaglutinantes. Entretanto, devido ao baixo rendimento da coleta da amostra de Março/09, não houve quantidade suficiente desta amostra para dar continuidade às análises, embora tenham-se obtido bons resultados (os

quais podem ser visualizados no apêndice deste trabalho). Outra amostra submetida a diferentes colunas cromatográficas foi Jan/10^{1/6}, no entanto devido à baixa dosagem protéica das amostras de Janeiro e ao baixo rendimento cromatográfico de Jan/10^{1/6} (resultados também no apêndice) optou-se por não trabalhar com esta amostra. Além disso, Jan/10^{1/6} ainda apresentava-se viscoso, dificultando a passagem nas colunas. Desta forma, as metodologias foram unidas, o muco de Maio/10 que havia sido liquidificado e diluído, passou também pelo processo de precipitação protéica com sulfato de amônio, utilizando quatro faixas de concentração do sal.

Amostras mais solúveis e menos viscosas foram obtidas utilizando faixas mais curtas de concentração de sulfato de amônio, separando melhor as proteínas de outras biomoléculas ativas do muco, como carboidratos e lipídeos. Segundo Slomiany et al. (1983), trabalhando com muco gástrico, cada mol de glicoproteínas nativas contém aproximadamente 24 moles de ácidos graxos ligados covalentemente a estas, sendo os lipídeos os prováveis responsáveis pela insolubilidade do muco. É possível que situação semelhante tenha ocorrido com o muco de *P. caribaeorum* e que, durante o fracionamento protéico, os lipídeos do muco tenham precipitado nas duas primeiras frações, que apresentaram baixa solubilidade. É possível também que os carboidratos presentes no muco de *P. caribaeorum* sejam os principais responsáveis pela baixa solubilidade, tendo sido estas moléculas precipitadas na sua maioria nas duas primeiras frações.

Em relação à atividade hemaglutinante de forma geral, com exceção de uma única fração (SF-Mar/09), todas as demais foram capazes de aglutinar hemácias humanas. Segundo Sharon e Lis (2001), hemaglutininas contêm sítios que se ligam a carboidratos presentes na superfície de hemácias, resultando na ligação cruzada das células e conseqüente precipitação, o que caracteriza a hemaglutinação.

A fração de Maio/10 com maior atividade hemaglutinante específica - AHE (F1-Mai/10^{1/3}), por ter apresentado uma das menores dosagens protéicas e baixíssima solubilidade não pôde ser utilizada para dar continuidade ao processo de purificação, evitando assim o entupimento das colunas e o aumento da pressão no sistema Akta purifier. O sobrenadante final (SF) de Maio/10, embora tenha apresentado a segunda maior AHE, apresentou baixa dosagem protéica e geralmente é descartado. Neste trabalho o SF foi utilizado apenas para demonstrar

a sua importância como fonte de lectinas. A fração escolhida (F3-Mai/10^{1/3}), embora não tenha obtido uma alta AHE, apresentou o maior teor protéico, baixa viscosidade, boa solubilidade e bom rendimento bruto, sendo então submetida a cromatografias de afinidade específica para lectinas.

Para aumentar a taxa de ligação proteína-resina, optou-se por incubar a amostra na coluna overnight, seguindo indicação do manual de cromatografia de afinidade da GE Healthcare. Antes da aplicação da amostra à resina, seguiu-se ainda o procedimento indicado por Joshi et al. (1997), sonicando a amostra para diminuir ao máximo a viscosidade e facilitar a entrada da amostra na coluna. O uso desta metodologia mostrou-se eficiente, resultando na obtenção de um pool protéico (NR), sem atividade hemaglutinante e com pelo menos 3 bandas protéicas visualizadas por eletroforese, além de uma fração contendo lectinas (R), visualizada na eletroforese como uma banda protéica. Comparando estes perfis eletroforéticos (NR e R) e o da amostra inicial aplicada a coluna (F3-Mai/10^{1/3}), na qual foram evidenciadas 6 bandas protéicas, pode ser observado a presença de uma banda protéica de 34 KDa em todos os pools, sugerindo a presença de proteínas com funções diferentes, mas com mesma massa molecular, já que apenas o pool contendo as lectinas com afinidade à coluna (R) apresentou atividade hemaglutinante.

A análise de ambos os pools em cromatografia de troca aniônica também resultou em dados interessantes. Uma banda protéica de 19 KDa, que não apareceu nos perfis do NR e da amostra inicial (F3-Mai/10^{1/3}), foi observada na fração não ligada a resina de troca aniônica (NR-Q1). Esta banda protéica pode ter sido resultante da separação de um complexo molecular durante o processo de purificação. Com relação às proteínas que compunham a banda de 34 KDa, estas apareceram em dois pools diferentes (NR-Q1 e NR-Q3), apresentando no último um tamanho de 35 KDa. Quando o pool R, com atividade hemaglutinante, foi submetido às mesmas análises, um perfil cromatográfico muito similar ao da amostra NR foi observado e, novamente, a banda protéica de 34 KDa, esteve presente no pool não ligado à resina (R-Q1). Entretanto, ao contrário do NR-Q1, R-Q1 apresentou atividade hemaglutinante. Esses resultados nos leva a sugerir que o muco de *P.caribaeorum* pode apresentar proteínas de mesma massa molecular, com cargas similares, porém com atividades farmacológicas diferentes. Além disso, é possível

que o muco contenha associações ou complexos protéicos, e que a forma complexada seja importante para a manutenção da função protéica.

Com o objetivo de verificar quais açúcares eram capazes de inibir a atividade hemaglutinante do muco de *P. caribaeorum*, foram realizados testes com as amostras Mai/10B, Mai/10^{1/3} e F3-Mai/10^{1/3}. Infelizmente, os pools resultantes das cromatografias de F3-Mai/10^{1/3} não apresentaram quantidade protéica suficiente para os testes. Os resultados mostraram alta taxa de inibição da aglutinação pela xilose e moderada inibição pela lactose. A especificidade das lectinas pelo açúcar xilose parece ser uma ocorrência rara na área da biologia animal, principalmente em se tratando de invertebrados. O único relato na literatura de uma lectina específica para xilose de origem animal foi feito por Yamada e Aketa (1982), os quais purificaram uma proteína do plasma seminal do ouriço *Hemicentrotus pulcherrimus*, capaz de inibir a aglutinação de hemácias humanas do tipo A+ e de coelho. Além dessa, uma única outra lectina xilose-específica foi isolada de um fungo comestível e testada sobre hemácias de coelho (Liu et al., 2006). Entretanto, é importante ressaltar que muitos trabalhos com lectinas de invertebrados, não utilizam este açúcar nos testes, ao contrário da lactose que é comumente utilizada. De forma geral, lectinas específicas para lactose parecem ser mais comuns, várias já foram isoladas de tecidos de vertebrados normais ou tumorais (Lotan et al., 1991), duas foram isoladas do fungo comestível *Tricholoma mongolicum* (Wang et al., 1995), outras duas foram purificadas do muco da pele da enguia *Anguilla japonica* (Tasumi et al., 2002). Provenientes de invertebrados foram isoladas três lectinas de ascídias coloniais, sendo elas lactose-específicas e ativas sobre hemácias de porquinho da índia (Schluter e Ey, 1989).

Analisando as massas moleculares das lectinas específicas para xilose e lactose já isoladas, foi observado que as lactose-específicas de muco de pele de enguia apresentavam massas de 16 e 32 KDa (Tasumi et al., 2002) semelhantes as tumorais, com massas de 14 e 35 KDa (Lotan et al., 1991). A lectina de cogumelo específica para xilose também apresentou massa de 14 KDa (Liu et al., 2006). Dessa forma, a massa molecular da primeira lectina parcialmente isolada do muco de *P. caribaeorum* (PcmL-1), 34 KDa, está de acordo com a massa molecular média das lectinas xilose ou lactose específicas já relatadas.

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (Nobre et al., 2008)

demonstraram a presença de atividade inibidora de hemorragia, causada pela peçonha da jararaca *B. leucurus*, no muco de *P. caribaeorum* coletado nas praias de Guadalupe e Suape, litoral sul pernambucano. Nesta dissertação foram realizados testes anti-hemorrágicos a fim de avaliar a presença desta atividade também nas amostras de muco de Porto de Galinhas. No muco de *P. caribaeorum* coletado em Porto de Galinhas, a maior atividade inibitória foi encontrada em uma amostra de janeiro (Jan/10B), no entanto, o pool utilizado para a purificação de proteínas (F3-Mai/10^{1/3}) também mostrou-se ativo. Estes resultados sugerem a presença de inibidores de metaloproteases no muco, já que estas moléculas são as responsáveis pela atividade hemorrágica das peçonhas botrópicas. A presença de inibidores de outras classes protéicas é uma hipótese a ser testada.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o processamento inicial do muco de *P. caribaeorum*, a melhor metodologia encontrada foi a liquidificação do muco, seguida pela diluição do mesmo na proporção 1:3 com agitação prolongada da mistura, centrifugação e, por fim, diálise do sobrenadante. Dessa forma, se obteve uma amostra mais líquida e com considerável diminuição da viscosidade.

Como primeiro passo de purificação, o método mais eficiente consistiu na precipitação gradual de proteínas por sulfato de amônio utilizando curtas faixas de concentração do sal. Este método possibilitou a obtenção de uma fração protéica mais solúvel, menos viscosa, com atividade hemaglutinante e com conteúdo protéico suficiente para a realização das etapas cromatográficas.

Como passos cromatográficos, a utilização inicial de uma resina de afinidade para lectinas seguida por cromatografia em coluna de troca aniônica foi eficaz na separação de proteínas aglutinantes de hemácias humanas e de outras proteínas presentes na amostra.

O muco de *P. caribaeorum* demonstrou ser uma fonte importante de proteínas biologicamente ativas, incluindo lectinas e possíveis inibidores de proteases. Entretanto, variações no conteúdo protéico e nas atividades biológicas podem ocorrer em função do período de coleta das amostras.

Testes de inibição da atividade aglutinante em hemácias humanas sugeriram que as lectinas do muco são xilose e lactose-específicas.

Testes de inibição da atividade hemorrágica, induzida pela peçonha de *B. leucurus*, comprovaram a ação inibitória do muco coletado em Porto de Galinhas, sugerindo a presença de inibidores de metaloproteases na amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A.; SAMMARCO, L.F.; DUARTE, G. New fission processes in the zoanthid *Palythoa caribaeorum*: Description and quantitative aspects. **Bull Mar Sci** 76: 1–26, 2005.

AFFINITY CHROMATOGRAPHY PRINCIPLES AND METHODS. **Amersham Biociences**. 18-1022-29.

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; ZENTENO, E. Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. **Comp. Bioch. and Physiol. Parte B**. 156: 1-5, 2010.

ARASON, G.J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish & Shellfish Immunology**. 6 (4): 277-289, 1996.

BABU, U.V.; BHANDARI, S.P.S.; GARG, H.S. Hariamide, a novel sulfated sphingolipid from a *Zoanthus* sp. of the Indian coast. **Journal of Natural Products**. 60 (12): 1307-1309, 1997.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B.P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 421: 125-134, 2004.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem. Sci**. 13: 480-482, 1988.

BASHA, N.S.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 8 (4): 353-360, 2009.

BAVINGTON, C.D.; LEVER, R.; MULLOYC, B.; GRUNDYA, M.M.; PAGE, C.P.; RICHARDSON, N.V.; MCKENZIE, J.D. Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. 139: 607–617, 2004.

BAYNE, C.; BOSWELL C.A.; LOKER, E.S.; YUI, M.A. Plasma components which mediate cellular defenses en the gastropod mollusk *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and Comparative Immunology**. 9 (3): 523-530, 1985.

BENSON, A.A. and MUSCATINE, L. Wax in coral mucus: energy transfer from corals to reef fishes. **Limnol. Oceanog.** 19: 810-814, 1974.

BING, D.H.; WEYAND, J.G.; STAVITSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 124(4): 1166-70, 1967.

BLIGH, E.G. and DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 37(8): 911-917, 1959.

BLUM, H.; BEIER, H; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8 (2): 93-99, 1987.

BOSCOLO, H. K. and SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of palythoa caribaeorum and protopalythoa variabilis (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of brazil. **Braz. J. Biol.** 65(1): 29-41, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. **Ana. Biochem.** 72: 248-254, 1976.

BRIAND, L.; ELOIT, C.; NESPOULOUS, C.; BÉZIRARD, V.; HUET, J.C.; HENRY, C.; BLON, F.; TROTIER, D.; PERNOLLET, J.C. Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. **Biochemistry**. 41 (23): 7241–7252, 2002.

BROWN, B.E. Coral bleaching: causes and consequences. **Coral Reefs**. 16: 129-138, 1997.

BROWN, B.E. and BYTHELL, J.C. Perspectives o mucus secretion in reef corals. **Mar. Ecol.: Prog. Ser.** 296: 291-309, 2005.

BROWN, B.E.; DUNNEL, R.P.; AMBARSARI, I.; LE TISSIER, M.D.A.; SATAPOOMIN, U. Seasonal fluctuations in environmental factors and variations in symbiotic algae and chlorophyll pigments in four Indo-Pacific coral species. **Marine Ecology**. 191: 301-309, 1999.

BUKANTZ, S.C. Residential study and treatment centre for children with intractable asthma. **J. Amer. med. Ass.** 1963.

CABALLEIRA, N.M. and REYES, M. Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemon *Condylactis gigantea* and the zoanthid *Palythoa caribaeorum*. **Journal of Natural Products.** 58 (11): 1689-1694, 1995.

CASTRO, C.B. and PIRES, D.O. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. **Bulletin of Marine Science.** 69 (2): 357-371, 2001.

CHEUNG, H.S. and CUSHMAN, D.W. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology.** 293 (2): 451-463, 1973.

CHUDZINSKI, A.M.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.; SAMPAIO, C.A.A. *Bothrops jararaca* plasma cysteine-proteinase inhibitor related to mammalian kininogen. **Brasilian Journal of Medicine Biological Research.** 22 (8): 945-948, 1989.

COFFROTH, M.A. Mucous sheet formation on poritid corals: an evaluation of coral mucus as a nutrient source on reefs. **Mar. Biol.** 105: 39-49, 1990.

COLES, S.L. and STRATHMANN, R. Observations on coral mucus "flocs" and their potencial trophic significance. **Limnol. Oceanogr.** 18: 673-678, 1973.

COOK, C.B.; D'ELIA, C.F.; MULLER-PAKER, G. Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. **Mar. Biol.** 98: 253-262, 1988.

DADOS PLUVIOMÉTRICOS de Pernambuco. ITEP (Instituto Tecnológico de Pernambuco). Disponível em < www.itep.br/meteorologia/ >. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2009.

DAUMAS, R. and THOMASSIN, B.A. Protein fractions in coral and zoantharian mucus: possible evolution in coral reef environment. **Proc. 3rd Int. Coral Reef Symp.** 1: 517-523, 1977.

DAUMAS, R.; GALOIS, R.; THOMASSIN, B.A. Biochemical composition of soft and hard coral mucus on a new Caledonian lagoonal reef. **Proc. 4th int. Symp. Coral Reefs**, 2: 59-67, 1981.

DEGROOTE, S.; MAES, E.; HUMBERT, P.; DELMOTTE, P.; LAMBLIN, G.; ROUSSEL, P. Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis. **Biochimie**, 85: 369–379, 2003.

DENNY, M.K. Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. **Symp Soc Exp Biol.** 43: 337-66, 1989.

DUCKLOW, H.W. and MITCHELL, R. Composition of mucus released by coral reefs coelenterates. **Limnol. Oceanogr.** 24: 706-714, 1979.

FENTON-NAVARRO, B.; ARREGUÍN-L, B.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, H.; HEIMER, E.; AGUILAR, M.B.; RODRÍGUEZ-A, C.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. **Toxicon.** 42 (5): 525-532, 2003.

FOUNTAIN, D.W. and CAMPBELL, B.A. A lectin isolate from mucus of *Helix aspersa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** 77 (2): 419-425, 1984.

FOX, J. W. and SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon.** 45 (8): 969-985, 2005.

FRANCINI-FILHO, R.B. and MOURA, R.L. Predation on the toxic zoanthid *Palythoa caribaeorum* by reef fishes in the Abrolhos bank, Eastern Brasil. **Braz. J. of Oceanog.** 58 (1): 77-79, 2010.

FRELIN, C. and VAN RENTERGHEM, C. Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action. **Gen. Pharmacol.** 26: 33–37, 1995.

GATES, R.D.; BAGHDASARIAN, G.; MUSCATINE, L. Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. **Biol. Bull.** 182: 324-332, 1992.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZHRINGER, U.; SCHMIDT, K. N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS Immun. and Med. Microb.** 43: 223-232, 2005.

GIGA, Y.; IKAI, A.; TAKAHASHI, K. TAKAHASHI, K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **J. Biol. Chem.** 262: 6197-6203, 1987.

GLIDER, W.V.; PHIPPS, D.; PARDY, R.L. Localization of symbiotic dinoflagellate cells within tentacle tissue of *Aiptasia pallida* (Coelenterata, Anthozoa). **Trans. Am. Microsc. Soc.** 99: 426-438, 1980.

GOKUDAN, S.; MUTA, T.; TSUDA, R.; KOORI, K.; KAWAHARA, T.; SEKI, N.; MIZUNOE, Y.; WAI, S.N.; IWANAGA, S.; KAWABATA, S. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. **National Acad. Sciences.** 96 (18): 10086-10091, 1999.

GOREAU, T.F. Mass expulsion of zooxanthellae from Jamaican reef communities after hurricane Flora. **Science.** 145: 383-386, 1964.

GOTO, R.; MURAMOTO, K.; YAMAZAKI, M.; KAMIYA, H. Purification and characterization of an agglutinin of the soft coral *Sinularia* species. **Dev. Comp. Immuno.** 16: 9-17, 1992.

GOTO-NANCE, R.; MURAMOTO, K.; ZENPO, Y.; KAMYIA, H. Purification and characterization of lectins of the soft coral *Lobophytum variatum*. **Fish. Sci.** 62: 297–301, 1996.

GOWDA, N.M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M.I. Purification and characterization of T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). **Fish et Shellfish Immunology.** 24: 450-458, 2008.

GREEN, A.A. and HUGHENS, W.L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods Enzymol.** 1: 67–90, 1955.

GUO, F.; HUANG, Z.; HUANG, M.; ZHAO, J.; KE, C. Effects of small abalone, *Haliotis diversicolor*, pedal mucus on bacterial growth, attachment, biofilm formation and community structure. **Aquaculture.** 293: 35–41, 2009.

HAYWICK, D. W. and MUELLER, M. Sediment retention in encrusting *Palythoa* spp. - a biological twist to a geological process. **Coral Reefs.** 16: 39-46, 1997.

HOEGH-GULDBERG, O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Mar. Freshw.** 50: 839–866, 1999.

HUBBARD, J.A. and POCOCK, Y.P. Sediment rejection by recent scleractinian corals: a key to paleoenvironmental reconstruction. **Geol. Rundsch.** 61: 598-626, 1972.

IMAMICHI, Y. and YOKOYAMA, Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lectin from the jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Comp. Biochem. and Physiol. Parte B.** 156: 12-18, 2010.

JATKAR, A.A.; BROWN, B.E.; BYTHELL, J.C.; GUPPY, R.; MORRIS, N.J.; PEARSON, J.P. Coral mucus: The properties of its constituent mucins. **Biomacromolecules.** 11: 883-888, 2010.

JEANLOZ, R.W.; LAMBLIN, G.; ROUSSEL, P.; HALBEEK, H.V.; MUTSAERS, J.H.G.M.; VLIEGENTHART, J.F.G. Structure of sialyloligosaccharides isolated from Bonnet Monkey (*Macaca radiata*) cervical mucus glycoproteins exhibiting multiple blood group activities. **The Jour. Of Biol. Chem.** 261 (5): 1992-1997, 1986.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comp. Biochem. and Physiol. Parte B.** 125: 227-236, 2000.

JOSHI, B.; KHIRE, J.M.; SIVARAMAN, H.; KHAN, M.I. Purification and Characterization of an extracellular lectin (Lectin 1) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM2443. **Biochimica et Biofysica Acta.** 1336: 218-224, 1997.

KAKIUCHI, M.; OKINO, N.; SUEYOSHI, N.; ICHINOSE, S.; OMORI, A.; KAWABATA, S.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of α -N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. **Glycobiology.** 12 (2): 85-94, 2002.

KAWABATA, S. and IWANAGA S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. **Developmental and Comparative Immunology.** 23: 391-400, 1999.

KAWSAR, S.M.A.; FUJII, Y.; MATSUMOTO, R.; ICHIKAWA, T.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; OZEKI, Y. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. **Comp. Bioch. And Physiol. Parte B.** 150: 349-357, 2008.

KAWSAR, S.M.A.; MATSUMOTO, R.; FUJII, Y.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; KOJIMA, N.; OZEKI, Y. Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. **Biochemistry (Moscow)**, 74 (7): 709-716, 2009.

KELECOM, A. and SOLÉ-CAVA, A.M. Comparative study of zoanthid sterols the genus *palythoa* (Hexacorallia, Zoanthidea). **Comp. Bioch. and Physiol Part B**. 72 (4): 677-682, 1982.

KEMP, D.W.; COOK, C.B.; LAJEUNESSE, T.C.; BROOKS, W.R. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 335: 266-276, 2006.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 187-197, 2002.

KLJAJIC, Z.; SCHRODER, H. C.; ROTTMANN, M.; CUPERLOVIK, M.; MOVSESIAN, M.; UHLENBRUCK, G.; GASIC, M.; ZAHN, R.K.; MULLERZ, W. E. G. A D-mannose-specific lectin from *Gerardia savaglia* that inhibits nucleocytoplasmic transport of mRNA. **Eur. J. Biochem**. 169: 97-104, 1987.

KRUPP, D.A. An immunochemical study of the mucus from the solitary coral *Fungia scutaria* (Scleractinia, Fungiidae). **Bulletin of Marine Science**. 36 (1): 163-176, 1985.

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

LASKOWSKI, M. and KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem**. 49: 593-626, 1980.

LESSER, M.P. and SHICK, J. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxantellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Mar. Biol**. 102: 243-255, 1989.

LEWIS, J. B. and PRICE, W.S. Patterns of ciliary currents in Atlantic reef corals and their functional significance. **J. Zool. Lond**. 178: 77-89, 1976.

LI, D. and GRAHAM, L.D. Epiphragmin, the major protein of epiphragm mucus from the vineyard snail, *Cermea virgata*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. 148: 192–200, 2007.

LIANG, Z.; SOTTRUP-JENSEN, L.; ASPA, A.; HALL, M.; SODERHALL, K. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 6682–6687, 1997.

LIN, K.; WANG, J.; FANG, L. Participation of glycoproteins on zooxanthellal cell walls in the establishment of a symbiotic relationship with the sea anemone, *Aiptasia pulchella*, **Zoological Studies**, 39(3): 172-178, 2000.

LIU, Q.; WANG, H.; NG, T.B. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. **Bioch. Et Bioph. Acta**. 1760: 1914-1919, 2006.

LOTAN, R.; MATSUSHITA, Y.; OHANNESIAN, D.; CARRALERO, D.; OTA, D.M.; CLEARY, K.R.; NICOLSON, G.L.; IRIMURA, T. Lactose-binding lectin expression in human colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. **Carbohydrate Research**. 213: 47-57, 1991.

MALL, A.S.; SELLERS, L.A.; ALLEN, A. Purification of pig duodenal mucus glycoprotein from protein and nucleic acid. **Biochem. Society Transactions**. 15: 1047-1048, 1987.

MANTLE, M. and ALLEN A. Isolation and characterization of the native glycoprotein from pig small-intestinal mucus. **Biochem. J.** 195: 267-275, 1981.

MCGEE, C.; WISDOM, G.B.; FAIRWEATHER, I.; BLACKSHAW, R.P.; MCILROY, J.; WALKER B. Characterization of the Proteins Present in the Mucus of the Flatworm *Artioposthia triangulata* (Dendy). **Comp. Biochem. Physiol.** 119B (2): 293–298, 1998.

MEIKLE, P.; RICHARDS, G.N.; YELLOWLEES, D. Structural Determination of the oligosaccharide side chains from a glycoprotein isolated from the mucus of the coral *Acropora Formosa*. **The Journal of Biological Chemistry**, 262 (35): 16941 – 16947, 1987.

MEIKLE, P.; RICHARDS, G.N.; YELLOWLEES, D. Structural investigations on the mucus from six species of coral. **Mar. Biol.** 99:187-193,1988.

MELO, V.M.M.; FONSECA, A.M.; VASCONCELOS, I.M. CARVALHO, A.F.F.U. Toxic, antimicrobial and hemagglutinating activities of the purple fluid of the sea hare *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. **Braz. Jour. of Med. and Biol. Research.** 31: 785-791, 1998.

MING, L.; XIAOLING, P.; YAN, L.; LILI, W.; QI, W.; XIYONG, Y.; BOYAO, W.; NING, H. Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. **Human Reproduction.** 22 (7): 1810–1815, 2007.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; LI, W.; KOBELEV, S.; KOZYREVSKAYA, S.; BOGDANOVICH, R.; HOWARD, E.; BELOGORTSEVA, N. New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. **Bioch. Et Bioph. Acta.** 1723: 82-90, 2005.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J.; OU YANG, D.; ZHENG, Y.; LUKYANOV, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comp. Bioch. and Physiol. Parte C.** 145: 184-193, 2007.

MOORE, R.E. and BARTOLINI, G. Structure of palytoxin. **J. Am. Chem. Soc.** 103: 2491–2494, 1981.

MOORE, R.E. and SCHEUER, P.J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. **Science.** 172: 495–498, 1971.

MORIYAMA, A. SHIMOYA, K.; OGATA, I.; KIMURA, T.; NAKAMURA, T.; WADA, H.; OHASHI, K.; AZUMA, C.; SAJI, F.; MURATA, Y. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. **Mol. Hum. Reprod.** 5: 656-661, 1999.

MÜLLER, W.E; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; LUCU, C.; MÜLLER, I.; UHLENBRUCK, G. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. **J. Bacteriol.** 5(1): 548-558, 1981.

MURAMOTO, K.; KAGAWA, D.; SATO, T.; OGAWA, T.; NISHIDA, Y.; KAMIYA, H. Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. **Comp. Biochem. and Physiol., Parte B.** 123: 33-45, 1999.

MURAMOTO, K.; JIN, D.; NIINO, Y.; FUJIWARA, K.; KABUTO, S.; OGAWA, T.; TODA, M.; KAMIYA, H. Comparison of the amino acid sequences of acorn barnacle

lectins showing different inhibitory activities toward the crystal growth of calcium carbonate. **Fisheries Science**. 67 (4): 703-709, 2001.

MUSCATINE, L. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. **Coral Reefs**. 25: 1-29, 1990.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Molecular Diversity**. 10: 607-618, 2006.

NAGASHIMA, Y.; KIKUCHI, N.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K. Purification and characterization of an antibacterial factor in the skin secretion of rock fish *Sebastes schlegeli*. **Comp. Bioch. Pysiol.** 136C: 63-71, 2003.

NAGASHIMA, Y.; TAKEDA, M.; OHTA, I.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K. Purification and properties of proteinaceous trypsin inhibitors in the skin mucus of pufferfish *Takifugu pardalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. 138: 103–110, 2004.

NALBONE, G.; LAFONT, H.; VIGNE, J.; DOMINGO, N.; LAIRON, D.; CHABERT, C.; LECHENE, P.; HAUTON, J.C. The apoprotein fraction of the bile lipoprotein complex: isolation, partial characterization and phospholipid binding properties. **Biochimie**. 61 (9): 1029-1041, 1980.

NEVES-FERREIRA, A.G.C.; CARDINALE, N.; ROCHA, S.L.G.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 1474 (3): 309-320, 2000.

NOBRE, A.H.B.; PÉREZ, C.D.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C. Avaliação bioquímica e farmacológica do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (baba de boi). **In: Anais do II Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas**, 2007.

NOBRE, A.H.B.; PÉREZ, C.D.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C. Avaliação bioquímica e farmacológica do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (baba de boi). **In: Anais do XVI CONIC**, 2008.

OHLSSON, K and TEGNER, H. Inhibition of elastase from granulocytes by the low molecular weight bronchial protease inhibitor. **Scand. Journal of Clin. & Lab. Invest.** 36 (5): 437-445, 1976.

OKAMOTO, M.; TSUTSUI, S.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis*. **Biochem. And Bioph. Res. Comm.** 333: 463-469, 2005.

OZEKI, Y.; YOKOTA, Y.; KATO, K.H.; TITANI, K.; MATSUI, T. Developmental expression of D-galactoside-binding lectin in sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. **Experimental Cell Research.** 216: 318-324, 1995.

PASZKIEWICZ-GODEK, A.; GINDZIENSKI, A.; POROWSKA, H. The use of preparative polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution for purification of mucus glycoproteins. **Analitycal Biochemistry.** 226: 263-297, 1995.

PÉREZ, C.D.; VILA-NOVA, D.A.; SANTOS, A.M. Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Anthozoa) from littoral of Pernambuco, Brazil. **Hydrobiologia.** 548: 207-215, 2005.

PEUMANS W.J. and VAN DAMME E.J.M. Plant Lectins: Specific Tools for the Identification, Isolation, and Characterization of O-linked Glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.** 33(3): 209-258, 1998.

POHAR, N.; GODENSCHWEGE, T. A.; BUCHNER, E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. **Genomics.** 57: 293–296, 1999.

QUINN, P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **J. Bioenergetics Biomembranes.** 21: 3-19, 1989.

REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. **Editora Escrituras.** 3ª edição, 2006.

REIMER, J.D.; TAKISHITA, K.; ONO, S.; MARUYAMA, T. Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) based on nuclear ITS-rDNA. **Coral Reefs.** 26: 399-410, 2007.

RITTIDACH, W.; PAIJIT, N.; UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Bioch. Et Bioph. Acta.** 1770: 106-114, 2007.

SCHLUTER, S.F.; and EY, P.L. Purification of three lectins from the haemolymph of the ascidian *Botrylloides leachii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**. 93 (1): 145-155, 1989.

SEBENS, K.P. Intertidal distribution of zoanths on the Caribbean coast of Panama: effects of predation and desiccation. **Bull. Mar. Sci.** 32: 316-335, 1982.

SHARON, N. and LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. 246: 227-234, 1989.

SHARON, N. and LIS, H. Lectins: Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, *www.els.net*. 2001.

SHARON, N. and LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14 (11): 53-62, 2004.

SHIGEMORI, H.; SATO, Y.; KAGATA, T.; KOBAYASHI, J. Palythoalones A and B, new ecdysteroids from the marine zoanthid *Palythoa australiae*. **Journal of Natural Products**. 62 (2): 372-374, 1999.

SLAYTER, H.S.; LAMBLIN, G.; LE TREUT, A.; GALABERT, C.; HOUDRET, N.; DEGAND, P.; ROUSSEL, P. Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein. **Eur. J. Biochem.** 142: 209-218, 1984.

SLOMIANY, A.; WITAS, H.; AONO, M.; SLOMIANY, B. Covalently linked fatty acid in gastric mucus glycoprotein of cystic fibrosis patients. **The Journal of Biological Chemistry**. 258 (14): 8535-8538, 1983.

SMITH, A.M.; QUICK, T.J.; PETER, R.L. Differences in the composition of adhesive and non-adhesive mucus from the limpet *Lottia Zimatula*. **Biol. Bull.** 196: 34-44, 1999.

SOARES, C.L.S.; PÉREZ, C.D.; MAIA, M.B.S.; SILVA, R.S.; MELO, L.F.A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognósia**, 16(4): 463-468, 2006.

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N.W.; MACKINNON, S.L. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. **Mar. Biotech.** 11: 748-757, 2009.

SUMI, T.; HAMA, Y.; NAKAGAWA, H.; MARUYAMA, D.; ASAKAWA, M. Purification and further characterization of a glycoprotein from the skin mucus of Japanese eels. **Journal of Fish Biology**. 64: 100–115, 2004.

TANISAKI, M.M.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM, F.R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**. 29 (6): 673-681, 1991.

TASUMI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; AIDA, K. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the japanese eel *Anguilla japonica*. **The journal of biological chemistry**. 277 (30): 27305–27311, 2002.

TRAVIS, J. and SALVESEN, C. Human plasma proteinase inhibitors. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 655-709, 1983.

TRENCH, R.K. Syntesis of a mucous cuticle by a zoanthid. **Nature**. 227: 1155-1156, 1970.

TRENTO, E.P.; GARCIA, O.S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S.C.; BATALINI, C.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from bothrops asper venom. **Biochemical Pharmacology**. 62 (11): 1521-1529, 2001.

TSUTSUI, S.; YAMAGUCHI, M.; HIRASAWA, A.; NAKAMURA, O.; WATANABE, T. Common skate (*Raja kenoei*) secretes pentraxin into the cutaneous secretion: the first skin mucus lectin in cartilaginous fish. **J. Biochem.** 146 (2): 295–306, 2009.

VASTA, G.R. and AHMED, H. Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species. **Prog. Mol. Subcell. Biol.** 17:158-82, 1996.

WANG, H.X.; NG, T.B. LIU, W.K.; OOU, V.E.C.; CHANG, S.T. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **International Journal of Peptide and Protein Research**. 46 (6): 508-513, 1995.

WATSON, P.F. and MORRIS, G.J. Cold shock injury in animal cells. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 41: 311-340, 1987.

WEDDE, M.; WEISE, C.; KOPACEK, P.; FRANKE, P.; VILCINSKAS, A. Purification

and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Eur. J. Biochem.** 255: 535–543, 1998.

WILD, C.; HUETTEL, M.; KLUETER, A.; KREMB, S.G.; RASHEED, M.Y.M.; JORGENSEN, B.B. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. **Nature.** 428: 66-70, 2004.

XUE, Q.; WALDROP, G.L.; SCHEY, K.L.; ITOH, N.; OGAWA, M.; COOPER, R.K.; LOSSO, J.N.; LA PEYRE, J.F. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. **Comp. Biochem. and Physiol. Part B.** 145 (1): 16-26, 2006.

YAMADA, Y. and AKETA, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Bioch. et Bioph. Acta – Prot. Struc. and Mol. Enzym.** 709 (2): 220-226, 1982.

YU, C.L.; FERRARO, D.; RAMASWAMY, S.; SCHMITZ, M.H.; SCHAEFER, W.F.; GIBSON, D.T. Purification and properties of Sandercyanin, a blue protein secreted in the mucus of blue forms of walleye, *Sander vitreus*. **Envirom. Biol. Fish.** 82: 51-58, 2008.

APÊNDICE

RESULTADOS DOS PASSOS CROMATOGRÁFICOS REALIZADOS COM OUTRAS AMOSTRAS

1 - AMOSTRA F1-MAR/09

1.1 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM SISTEMA MANUAL

A primeira amostra submetida à cromatografia de afinidade para lectinas foi F1-Mar/09 (Figura 1), sendo escolhida dentre as três frações do muco de Mar/09B por apresentar maior conteúdo protéico e maior atividade hemaglutinante. Foram obtidos dois picos de interesse: o Não retido (NR) e o Retido (R). Os pools dos materiais NR e R apresentaram concentrações protéicas de 0,539 mg/ml e 0,466 mg/ml, respectivamente.

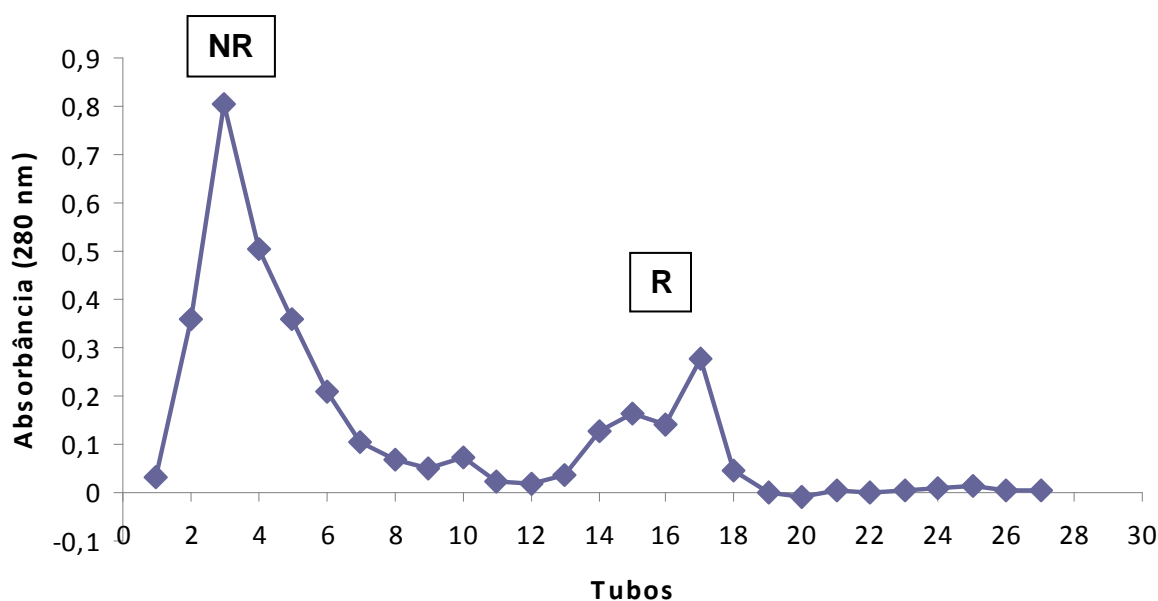


Figura 1 - Cromatografia em coluna ConA Sepharose 4B do F1-Mar/09. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 20mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 0,6 ml/min), sendo o NR eluído com mesmo tampão (fluxo 0,4 ml/min) e o R eluído com PBS 50mM pH 4,5, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 0,2 ml/min). O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

Para a triagem da atividade hemaglutinante dos pools resultantes foram utilizadas hemácias tipo O+, já que a fração F1 apresentou maior atividade sobre este tipo sanguíneo. Quando testada a atividade hemaglutinante, o R mostrou potente ação hemaglutinante, com 256 U.H., sendo a AHE 549,3 e a DMHg 7,8 ng/ml. Não houve atividade hemaglutinante em NR.

O perfil eletroforético dos picos (Figura 2) mostrou no R quatro bandas protéicas majoritárias de massas moleculares estimadas em 37, 28, 19 e 14 KDa aproximadamente, enquanto o NR apresentou apenas duas bandas majoritárias de pesos moleculares de 40 e 23 KDa aproximadamente.

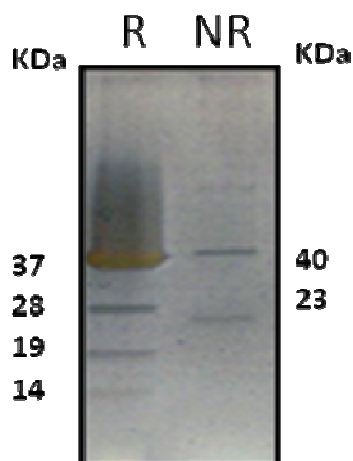


Figura 2 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% dos picos R e NR. Picos resultantes da cromatografia de F1-Mar/09 em coluna ConA Sepharose 4B. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). **NR** e **R**) Material não ligado e com afinidade a coluna, respectivamente.

1.2 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM SISTEMA AKTA PURIFIER

A fim de obter maior rapidez e praticidade, devido à ausência de bomba peristáltica para controle da velocidade de fluxo e da lentidão do processo de purificação utilizando a coluna manual, a amostra F1-Mar/09 (1mg/ml de proteína) foi aplicada em coluna HiTrap ConA acoplada ao AKTA. Ao contrário do esperado, após várias tentativas com diferentes concentrações de amostra e variando-se as taxas de fluxo de ligação e de eluição, apenas em uma corrida da amostra F1-Mar/09 obteve-se a formação dos picos NR e R (Figura 3). Entretanto, o baixo rendimento protéico da corrida não permitiu a realização dos testes de hemaglutinação nem SDS-PAGE.

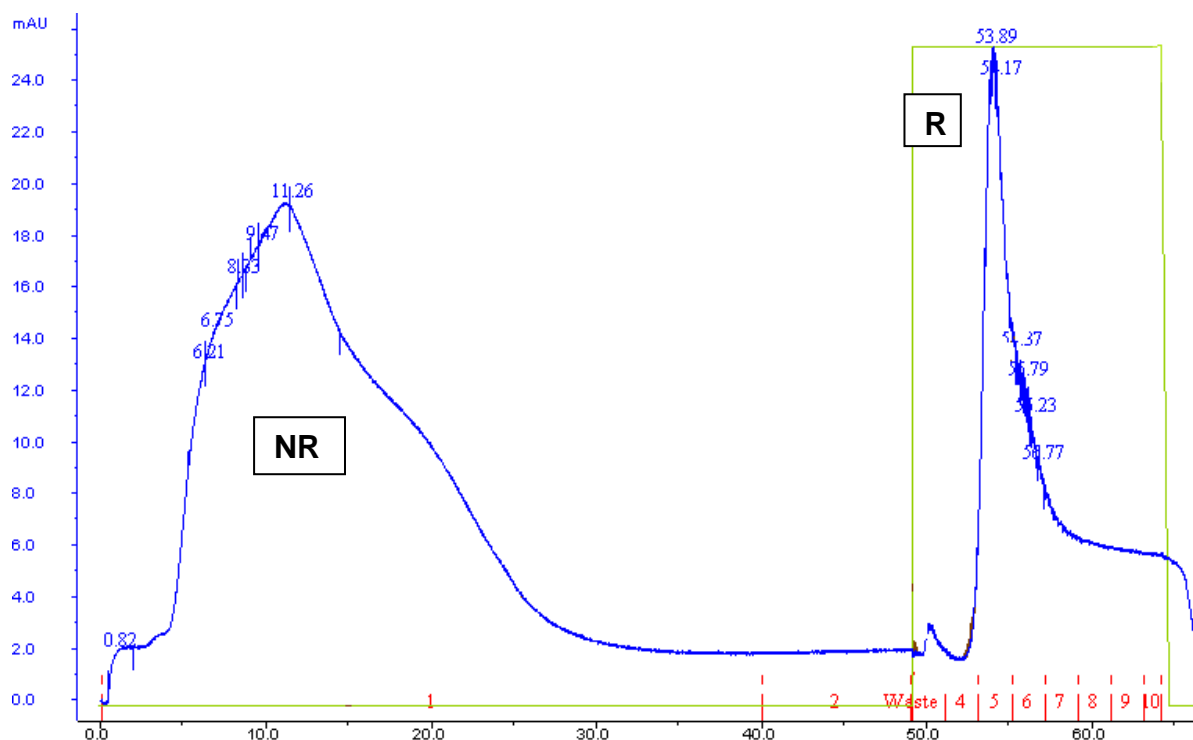


Figura 3 - Cromatografia em coluna HiTrap ConA do F1-Mar/09. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 20mM, pH 7.4, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 1,0 ml/min), sendo o **NR** eluído com mesmo tampão (fluxo 1,0 ml/min) e o **R** eluído com PBS 50mM pH 4,5, contendo NaCl 0,5 M (fluxo 0,5 ml/min). O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

1.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SISTEMA AKTA PURIFIER

Buscando maior praticidade para as purificações, a amostra F1-Mar/09 (5mg/ml de proteínas) foi ainda submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 acoplada ao cromatógrafo AKTA purifier. O perfil cromatográfico (Figura 4) mostrou quatro picos, contendo o primeiro (P1) proteínas de alto peso molecular. Os outros três picos (P2, P3 e P4), contendo proteínas de menores pesos. No entanto os picos formados não foram bem separados. Mesmo centrifugando a amostra, o sobrenadante ainda apresentou alta viscosidade, o que provavelmente atrapalhou na purificação das proteínas do muco. Por ser uma coluna extremamente sensível, optou-se por não utilizar mais esta amostra viscosa, e sim os resultados de outras cromatografias nesta coluna.

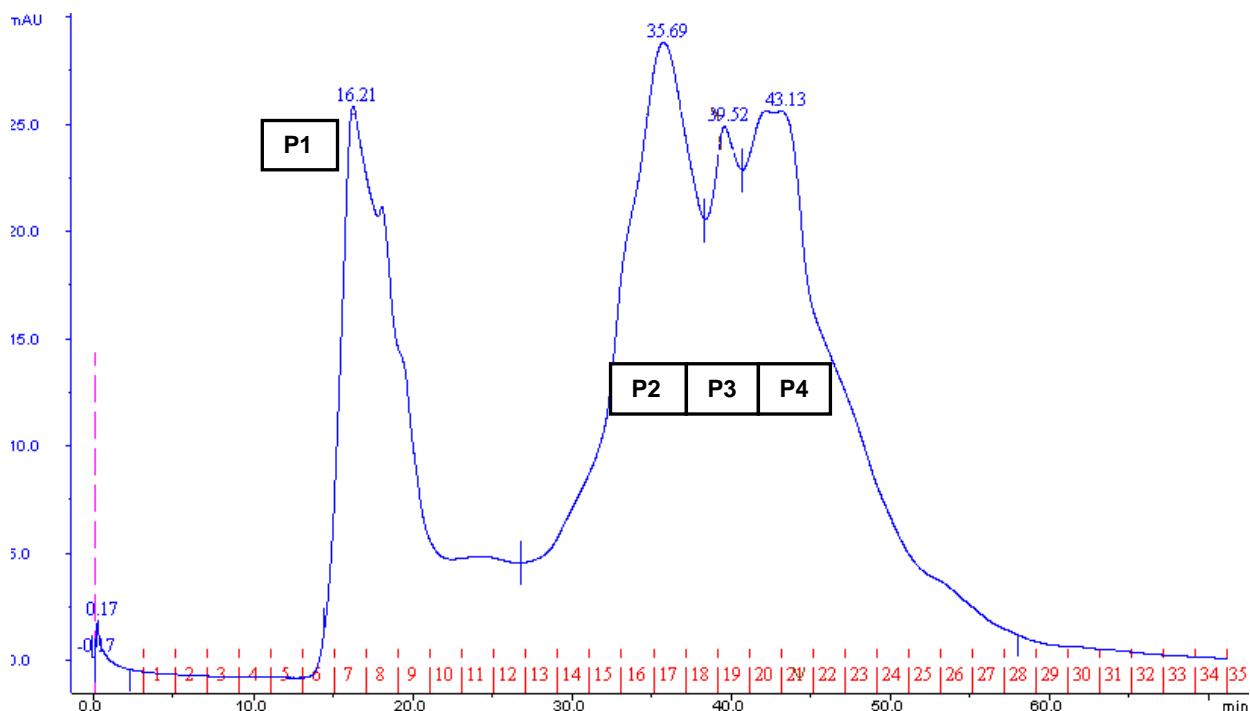


Figura 4 - Cromatografia de Exclusão molecular em coluna Superdex 200 de F1-Mar/09. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (fluxo 0,5 ml/min), sendo os picos **P1**, **P2**, **P3** e **P4** eluídos com mesmo tampão. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

2 - AMOSTRA JAN/10^{1/6}

Após processamento da amostra de Jan/10, realizou-se SDS-PAGE (gel de resolução 12,5%) (Figura 5), a fim de verificar a eficiência dos procedimentos realizados (Diluição e precipitação). Foi visualizada a pureza das bandas protéicas da amostra Jan/10^{1/6}, em relação às outras amostras. Seu perfil permitiu uma melhor visualização das bandas. A análise do perfil eletroforético das frações mostrou grande arrasto de carboidratos, dificultando a visualização das bandas protéicas. Jan/10^{1/6}.

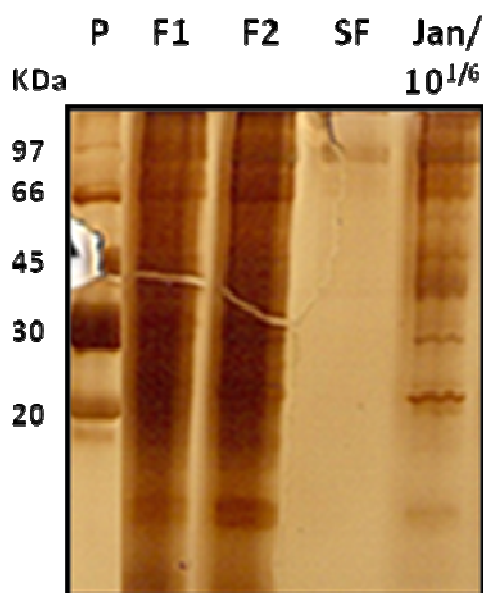


Figura 5 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% das amostras de Jan/10. SDS-PAGE realizada segundo Laemmli (1970) e corada por AgNO₃ de acordo com Blum *et al.* (1987). **P)** Padrões de massa molecular (14 a 66 KDa). **F1 e F2-Jan/10**, mostrando arrasto de carboidratos; **SF-Jan/10** com baixa concentração protéica; **Jan/10^{1/6}**, mostrando uma variedade de bandas protéicas.

Devido à quantidade insuficiente da amostra F1-Mar/09 para a realização de novos passos cromatográficos, F1-Jan/10 e Jan/10^{1/6} foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna manual ou na HiTrap acoplada ao AKTA. Entretanto, em nenhuma das corridas realizadas houve retenção de proteínas pela resina. Em relação à ConA Sepharose 4B, provavelmente o uso de soluções com pH baixo, ou a própria viscosidade do muco pode ter provocado alterações nas propriedades ligantes da resina.

2.1 - CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA EM SISTEMA AKTA PURIFIER

Priorizando o desenvolvimento de uma metodologia de purificação de proteínas do muco de *P. caribaeorum*, com rendimento suficiente para testes bioquímicos e farmacológicos, utilizou-se a amostra Jan/10^{1/6} (2mg/ml de proteínas), a qual mostrou perfil cromatográfico límpido, em uma nova tentativa de purificação, em coluna Resource Q. O perfil cromatográfico (figura 5) mostrou os picos NR

(proteínas de carga positiva e sem carga que não foram ligadas à coluna) e R (proteínas de carga negativa retidas pela coluna). No entanto, a Resource Q não foi capaz de separar bem o material retido proveniente da amostra Jan/10^{1/6}, podendo sugerir que o procedimento de diluição do muco por si só não seja eficiente na separação das biomoléculas do muco.

Este passo cromatográfico foi repetido várias vezes a fim de gerar quantidade suficiente de material para ser utilizado em coluna de exclusão molecular. Os NR e R obtidos foram unidos, dialisados contra água destilada por 24 h a 4°C e liofilizados.

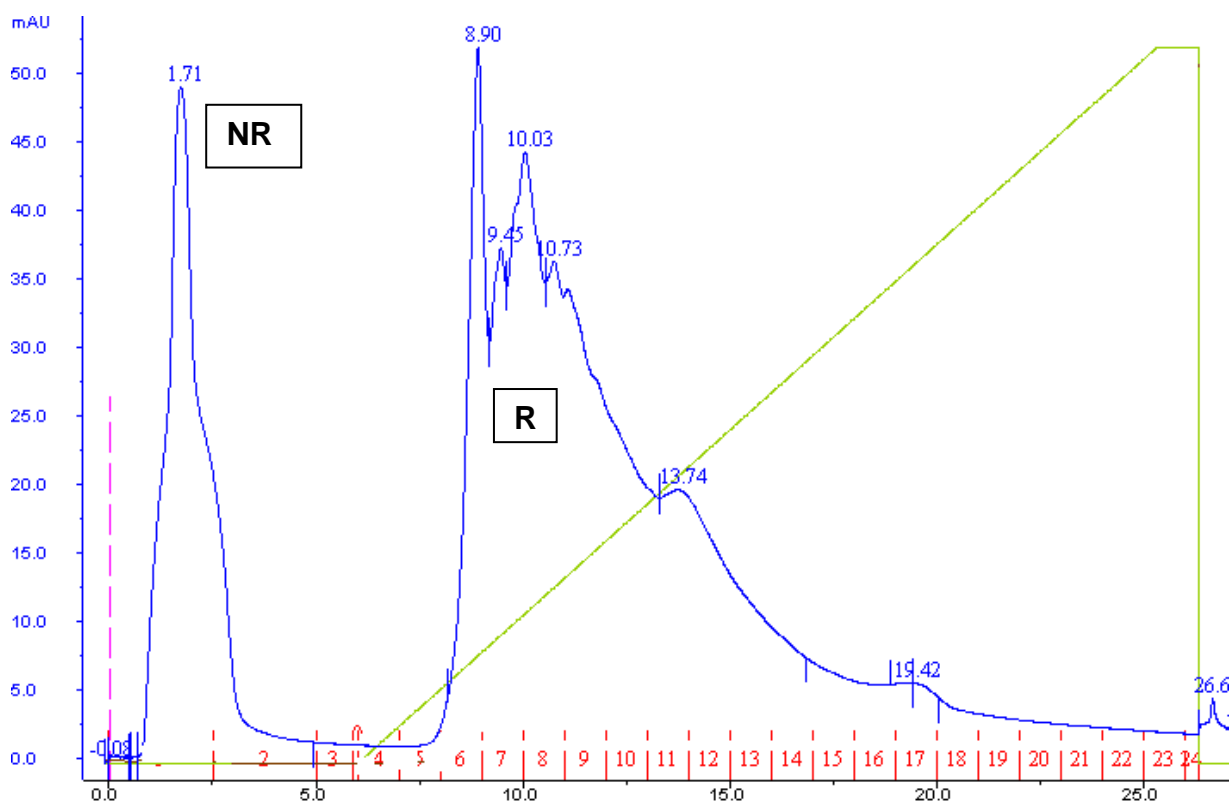


Figura 5 - Cromatografia em coluna Resource Q da amostra Jan/10^{1/6}. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 50mM pH 8.0, em fluxo de 0,5 ml/min. NR foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que R foi eluído com tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.

2.2 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Após cromatografia de troca aniônica, 1ml do material retido, contendo 0,274

mg/ml de proteínas, foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 acoplada ao AKTA. No entanto, o perfil cromatográfico (Figura 6) mostrou três picos mal separados, os quais foram submetidos à SDS-PAGE, e nenhuma banda protéica foi visualizada. Além disso, os três picos não apresentaram atividade hemaglutinante sobre as hemácias testadas (O+).

Desta forma, devido ao baixo rendimento, a amostra Jan/10^{1/6} foi descartada para uso em cromatografias.

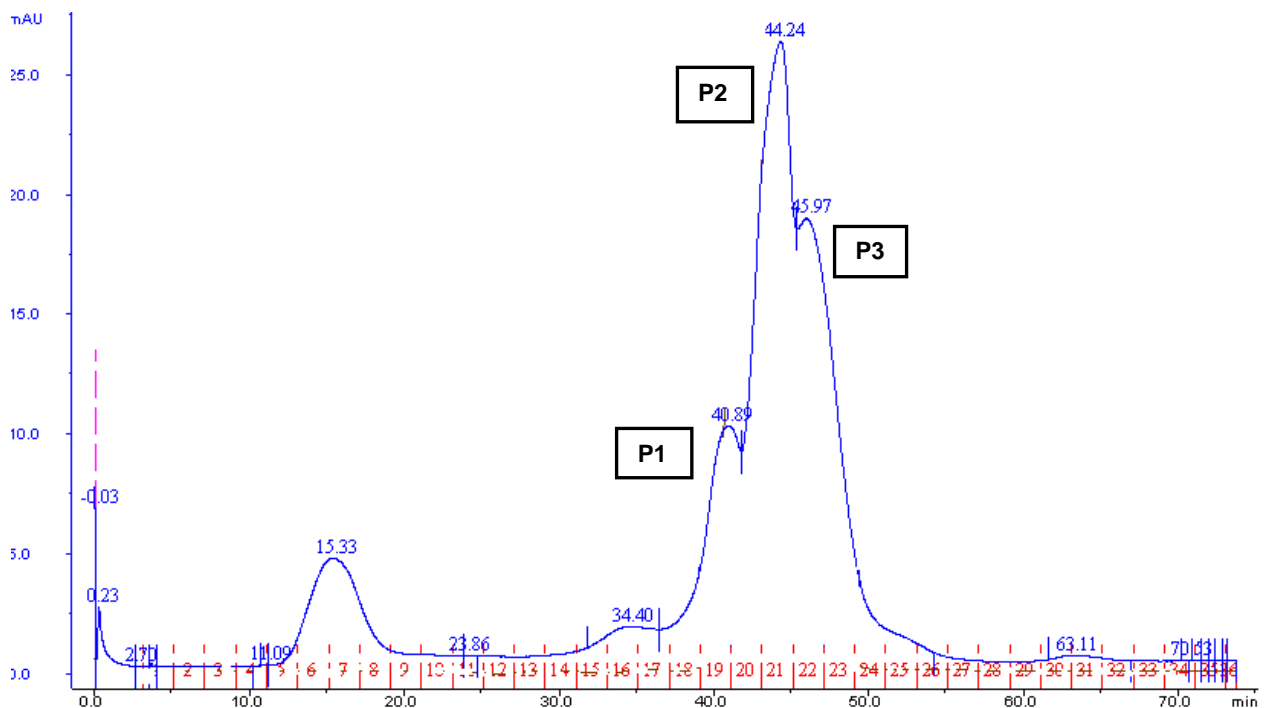


Figura 6 - Cromatografia de Exclusão molecular em coluna Superdex 200 do pico R. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (fluxo 0,5 ml/min), sendo os picos **P1**, **P2** e **P3** eluídos com mesmo tampão. O conteúdo protéico das frações foi monitorado a 280 nm.