



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Marllyn Marques da Silva

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PERFIL PROTEOMICO DO MUCO PRODUZIDO
PELO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***

Vitória de Santo Antão

2016

Marllyn Marques da Silva

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PERFIL PROTEOMICO DO MUCO PRODUZIDO
PELO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia ou Saúde e Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

S586a Silva, Marllyn Marques da.
Atividades biológicas e perfil proteômico do muco produzido pelo zoantídeo
Palythoa caribaeorum / Marllyn Marques da Silva. Vitória de Santo Antão, 2016.
60f.

Orientadora: Noemia Pereira da Silva Santos.

Coorientadora: Marcela Silvestre Outtes Wanderley.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade
Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e
Meio Ambiente, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Saúde ambiental. 2. *Palythoa caribaeorum* - Propriedades biológicas. 3.
Palythoa caribaeorum - Perfil proteômico. 4. Cnidários. I. Santos, Noemia Pereira
da Silva (Orientadora). II. Wanderley, Marcela Silvestre Outtes (Coorientadora).
III. Título.

613.1 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-084/2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Marllyn Marques da Silva** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PERFIL PROTEOMICO DO MUCO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum***”, orientada pela Prof^a Dr^a Noemia Pereira da Silva Santos e coorientada pela Prof^a Dr^a Marcela Silvestre Outtes Wanderley, aprovada no dia 28 de março de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Dr. Roberto Afonso da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Dr^a Taciana Lima Salviano

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Autora

Marllyn Marques da Silva

Dedico este trabalho...

Ao meu Deus, que tudo pode e tudo faz,
aos meus pais, pelo amor e incentivo, ao
meu mui amado esposo, pela paciência e
pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela vida, pelas oportunidades, pelo cuidado e pelo seu imenso amor.

Ao meu querido esposo que é tão compreensivo, dedicado, amoroso e paciente. Obrigada pela ajuda em todos os momentos.

Quero agradecer a minha família, minha mãe Marili e meu pai Cícero, que criaram a mim e meu irmão Marllyson, com amor, correção e muitos conselhos (ainda bem que os escutei), pelas orações, palavras de incentivo e pelo apoio. E hoje, estou aqui concluindo mais uma etapa na minha vida.

À minha tia Mariluce, minha avó Amara, que sempre acreditaram em mim.

À minha orientadora, Noemia Pereira, pela orientação, não apenas nesses dois anos, mas há um bom tempo; por tudo que tem me ensinado. Quero dizer que aprendi muito. Obrigada pela ajuda e também por acreditar em mim.

À Marcela Wanderley, minha co-orientadora, pelo apoio, paciência, pela orientação. E muito obrigada pelo voto de confiança.

À Roberto Afonso, pela paciência em me ensinar as técnicas da eletroforese 2-D, pelas muitas dicas de metodologia.

À instituição LIKA, que disponibilizou sua estrutura física para que fosse possível a realização desse trabalho.

Agradeço a professora Idjane por disponibilizar o laboratório de Microbiologia e Imunologia para a realização da atividade antimicrobiana.

À professora Isabela Macário por disponibilizar seu tempo e realizar a atividade antimicrobiana do extrato proteico.

As meninas do laboratório de Proteômica, Iasmim, Sílvia e Raquel, pela paciência e ajuda em muitas técnicas do dia a dia. Sem vocês ficaria duas vezes mais difícil.

À Thiers, pela ajuda na atividade citotóxica, análise estatística e por muitas dicas.

A banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

As queridas amigas, companheiras de laboratório, de almoço, de conversas e de muitas aventuras, Tamiris, Daniella, Sarana, Diego.

A todos da turma do mestrado, que ficamos no mesmo barco muitas vezes, mas sempre ajudando um ao outro.

À Facepe, pelo apoio financeiro durante esses dois anos.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O ecossistema marinho é capaz de proporcionar uma enorme diversidade de biomoléculas com potencial terapêutico. Neste ambiente altamente competitivo, os organismos precisam de barreiras químicas para se proteger reduzindo ou evitando contaminação por microrganismos. O *Palythoa caribaeorum* é um zoantídeo (Cnidário) que produz um muco, conhecido popularmente como baba de boi, cuja principal função é proteger a colônia contra dessecação e patógenos. O muco ainda é pouco conhecido quanto as suas propriedades físico-químicas e biológicas. Esse fato vem despertando o interesse por estudos que desvendem suas propriedades biológicas, bem como identifique a sua composição. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas do muco e determinar seu perfil proteômico. Para tal, as atividades biológicas foram testadas contra as linhagens de células S-180, Hela, MCF7, fibroblastos e J774 (macrófagos) através do método MTT. Ainda, a citotoxicidade do muco também foi avaliada em hemácias humanas e a sua capacidade antioxidante testada. O perfil proteômico foi determinado pela eletroforese 2-DE seguido da espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os resultados demonstraram que o muco não exibiu ação citotóxica contra as células testadas, mas o extrato proteico apresentou viabilidade abaixo de 50 % nas linhagens de MCF-7 e S-180. A linhagem celular J774 tratada com o extrato proteico apresentou IC₅₀ de 6,9 µg/mL. Entretanto, no tratamento de fibroblastos com o extrato proteico (6,25 µg/mL) foi visualizado crescimento celular. Na avaliação antimicrobiana o extrato proteico apresentou CMI de 250 µg/mL para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O muco não apresentou atividade hemolítica e foi capaz de reduzir em 50 % do radical ABTS. O estudo proteômico pela eletroforese 2-DE, mostrou a presença de 76 spots, dos quais 14 foram identificados pela MALDI-TOF. São estas, “glutamyl-tRNA synthetase”, “Hypothetical protein PFICI_09699” e “Hypothetical protein NECAME_18605”, “Proteasome subunit aloha type-1”, “PAS domain S-box protein, parcial”, “Uroporphyrinogen-III synthase”, “Beta-2-microglobulin”, “Zinc metalloproteinase-disintegrin-like”, “mitochondrial import inner membrane translocase

subunit Tim 10", "deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2", "Zinc Finger Protein 654", "Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like", LIN-52. "Killer protein". Desse modo, conclui-se que o extrato proteico apresentou proteínas com potencial ação antibiótica, cicatrizante e antitumoral. Portanto, o muco produzido pelo *P. caribaeorum* se apresenta como uma fonte rica em matéria-prima para isolamento de moléculas com importante potencial biotecnológico e farmacêutico.

Palavras-chave: *Palythoa caribaeorum*. cicatrização. proteômica. citotoxicidade. muco.

ABSTRACT

The marine ecosystem is capable of providing a diversity of biomolecules that can be used for the treatment of diseases. In this highly competitive environment, organizations need chemical barriers to protect reducing or avoiding contamination by microorganisms. The *Palythoa caribaeorum* is a zoanthid (Cnidarian) that produces mucus, popularly known as baba ox, has main function to protect the colony against desiccation and against pathogens. Mucus is still unknown as their physicochemical and biological properties. Its features proposes a relevant study its biological properties as well as the isolation of substances. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activity of mucus and its protein extract against tumor cell lines such as S-180, Hela, MCF7, Fibroblasts and J774 (macrophages) using the MTT method. The cytotoxicity of mucus was also evaluated in human red blood cells and also for antioxidant capacity. Mucus showed no cytotoxic activity against the tested cells, but the protein extract showed viability below 50% in lines MCF-7 and S-180. The J774 strain treated with the protein extract showed IC₅₀ of 6.9 µg/mL. For fibroblast cells or mucus or the protein extract showed cytotoxicity, noting that the protein extract showed an increase of cells in 6.25 µg / ml. The protein extract showed MIC of 250 µg/mL for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Mucus showed no hemolytic activity and was able to reduce by 50% the ABTS radical. The proteomic study by 2-DE electrophoresis showed the presence of spots 76, 14 of which were identified by MALDI-TOF. These, "glutamyl-tRNA synthetase", "Hypothetical protein PFICI_09699" and "Hypothetical protein NECAME_18605", "Proteasome subunit aloha type-1", "PAS domain S-box protein, parcial", "Uroporphyrinogen-III synthase", "Beta-2-microglobulin", "Zinc metalloproteinase-disintegrin-like", "mitochondrial import inner membrane tranlocase subunit Tim 10", "deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2", "Zinc Finger Protein 654", "Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like", LIN-52. "Killer protein". Thus, it is concluded that the protein extract showed proteins with

potential antibiotic action, healing and antitumor. Therefore, the mucus produced by *P. caribaeorum* presents itself as a rich source of raw material for isolation of molecules with important potential biotech and pharmaceutical.

Keywords: *Palythoa caribaeorum*. healing. proteomics. cytotoxicity. mucus

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Praias localizadas no litoral sul do estado de Pernambuco, que possui colônias de *Palythoa caribaeorum*. a.Piedade, b.Guadalupe, c.Suape. 16
- Figura 2 *Palythoa caribaeorum*. a. Colônias organizadas em tapetes na superfície do recife, b. Pólipos abertos (colônias submersas) c. Pólipos retraídos (colônias expostas). 17

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Viabilidade celular do muco e do extrato proteico do muco frente ao tumor ascítico S-180 (A), Hela (B), MCF7 (C), J774 (D) e CCD1072 Sk (E). ■ Extrato proteico; ▤ Muco. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. $P < 0,05$ 56
- Figura 2 Atividade de eliminação do radical ABTS.+ (%) do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* nas concentrações de 100 e 200 mg/mL, em tempos de 6, 15, 30, 45, 60 e 120 min. utilizando trolox como padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de *Tukey*. $*P < 0,05$. 57
- Figura 3 Atividade hemolítica do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* em diferentes concentrações (500, 250 e 125 µg/mL). Foi utilizado o teste Tukey para comparar as médias, mas não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações. $P < 0,05$. 58
- Figura 4 Dados dos spots gel SDS-PAGE (12,5%) identificados a partir do Software ImageMaster 2D Platinum Versão 7.0. (A) Classificação das proteínas; (B) Ponto isoelétrico; (C) Peso molecular (KDa). 59
- Figura 5 Perfil proteômico do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* analisado por Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE (12,5%) corado com Comassie Blue. Tiras de IPG (3-10) linear, 13cm, foram usadas para focalização isoelétrica. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de IC ₅₀ em células S-180, Hela, MCF7, J774 e CCD1072Sk após 48 horas de exposição ao muco produzido pelo <i>P. caribaeorum</i> e o seu extrato proteico.	61
Tabela 2	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) µg/mL do muco e do seu extrato proteico. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.	62
Tabela 3	Lista de proteínas identificadas pelo MASCOT e expressas no muco produzido pelo <i>Palythoa caribaeorum</i> contra os bancos de dados de proteína do NCBI e SWissProt. Espécies e funções de cada proteína	63

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
>	Maior que
<	Menor que
±	Mais ou menos

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
MTT	Brometo de 3-[5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
S-180	Células de sarcoma-180
RBC	Células vermelhas do sangue
C	Controle
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônia
IEF	Focalização isoelétrica
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.P.	Desvio padrão
g	Grama
g/ Kg	Gram por quilograma
g/mol	Grama por mol
P-gp	Glicoproteína P
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
h	Hora
Trolox	6-hydroxy- 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
µg	Micrograma
µg/ml	Micrograma por mL
µL	Microlitro
mg	Miligrama
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Min	Minuto

PEG	Polietilenoglicóis
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
Kg	Quilograma
RPM	Rotações por minuto
S	Segundo
PBS	Tampão fosfato-salino
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
IC50	Concentração que inibi 50%
E2D	Eletroforese bidimensional
CCD	Cromatografia em camada delgada
nm	Nanômetro
CIM	Concentração mínima inibitória
ATP	Trifosfato de adenosina
CBM	Concentração mínima bactericida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
DTT	Dithiothreitol
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Da	Dalton
KDa	Quilodalton

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. Revisão da Literatura	14
3.1 Cnidários	14
3.2 <i>Palythoa caribaeorum</i>	15
3.3 Muco de corais	18
3.4 Estudos proteomicos de organismos marinhos	19
4. Referências	22
CAPÍTULO 2	
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PERFIL PROTEOMICO DO MUCO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO <i>Palythoa caribaeorum</i>	31
Resumo	32
Abstract	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	35
2.1 Coleta do material biológico	35
2.2 Preparação do muco	35
2.3 Ensaio de citotoxicidade	36
2.4 Atividade antimicrobiana	36
2.5 Determinação da atividade antioxidante total	37
2.6 Atividade hemolítica	37
2.7 Determinação do Perfil proteomico	38
2.7.1 Extração e quantificação de proteínas totais	38
2.7.2 Eletroforese Bidimensional (E2D)	38
2.7.3 Tripsinização dos <i>spots</i>	39
2.7.4 Análise de Espectrometria de massa	39
2.8 Análises estatísticas	40

3. Resultados e Discussão	40
3.1 Ensaio de citotoxicidade	40
3.2 Atividade antimicrobiana	43
3.3 Atividade antioxidante	44
3.4 Atividade hemolítica	45
3.5 Determinação do perfil proteômico	46
3.5.1 Quantificação de proteínas totais	46
3.5.2 Eletroforese 2D	46
3.5.3 Análise de Espectrometria de massa	46
4. Conclusões	48
5. Referências	49
Legenda das figuras	55
ANEXO	64

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Na última década o estudo químico e farmacológico de organismos marinhos despertou o interesse de muitos pesquisadores, favorecendo a descoberta de novas substâncias químicas bioativas com propósito terapêutico e que por muito tempo foi negligenciado no Brasil. A biodiversidade do ambiente marinho associado à diversidade química constitui um recurso praticamente ilimitado de novas substâncias ativas no campo de desenvolvimento de produtos bioativos (ANEIROS e GARATEIX, 2004; KOSSUGA et al., 2007; ALPPETANS et al., 2010).

Os zoantídeos são cnidários polipóides exclusivamente marinhos e habitam os recifes costeiros (SOARES et al., 2006). Estes tem apresentado importantes fontes de compostos bioativos com potencial farmacológico, como exemplo, a atividade antimicrobiana de extratos de tecido e de metabólitos secundários, principalmente toxinas extraída de zoantídeos (VENKATESWARLU et al., 1998; QUINTANA et al., 2015); a atividade antiviral, antimicrobiana e antineoplásica estudada por Rinehart (1981). Apesar dos avanços com os cnidários, a maioria das pesquisas relacionadas ao isolamento de substâncias e atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos é com as algas (LHULLIER et al., 2006, HWANG et al., 2008, ZHANG et al., 2010, WIJESEKARA et al., 2011).

Uma das espécies de cnidários que vem despertando a curiosidade dos pesquisadores é o *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860), um zoantídeo bastante abundante no litoral pernambucano, com maior predominância nas praias de Piedade, Guadalupe e Suape. Estes formam extensas colônias que quando expostas ao ambiente, durante a maré baixa, seus pólipos produzem e libera um muco, conhecido popularmente como “baba de boi” e cuja principal função é proteger a colônia da dessecação (SOARES et al., 2006, MELO et al., 2012). Essa espécie pertence ao gênero *Palythoa*, o qual se caracteriza pela presença de uma potente toxina denominada palitoxina (WU, 2009).

Segundo Soares (2006), o muco é utilizado popularmente como analgésico e anti-inflamatório através do uso tópico acelerando o processo de cicatrização nos

tecidos lesionados. Assim, em seu estudo, foi observado que o extrato hidroalcoólico a partir do *P. caribaeorum* não apresentavam toxicidade em camundongos, além de identificar uma significativa atividade analgésica. Além da analgesia, o extrato alcoólico do muco se mostrou com potencial para acelerar o processo de reparo tecidual em ratos (COSTA, 2013).

Recentemente, estudos tem demonstrado que extratos de alguns cnidários apresentam efeito tóxico sistêmico que estão relacionadas à sua atividade proteolítica (GARCIA-ARREDONDO et al., 2015). A grande maioria das proteínas purificadas e caracterizadas dos tecidos e fluidos corporais de invertebrados marinhos, tais como as esponjas (KAWSAR et al., 2008), crustáceos (RITTIDACH et al., 2007) e moluscos (ALPUCHE et al., 2010), são as lectinas (BARNEJEE et al., 2004). Além das lectinas, outras vem sendo identificadas e apresentando potencial biológico para antimicrobiano, antitumoral, antioxidante (STEINESTEL et al., 2015).

Diante do exposto, as características citadas do *Palythoa* ressaltam a riqueza do seu muco como fonte de compostos biologicamente ativos, se fazendo necessárias investigações mais profundas sobre suas propriedades biológicas. Estudos nesta vertente se mostram inovadores, tendo grande impacto econômico e social, além de utilizar inovações biotecnológicas aplicadas à saúde. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo investigar as propriedades biológicas do muco e do seu extrato proteico; e através da eletroforese bidimensional seguido de análise com espectrometria de massa do tipo Maldi-ToF caracterizar as proteínas presentes no muco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as propriedades biológicas e identificar o perfil proteômico do muco produzido pelo *P. caribaeorum*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* e do seu extrato proteico frente a linhagens de células indiferenciadas;
- Estudar a atividade antimicrobiana do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* e de seu extrato proteico;
- Determinar a atividade antioxidante e hemolítica do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum*;
- Traçar o perfil proteômico do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cnidários

O termo Cnidaria origina-se do grego “knide”, que significa “urtiga”, denominando assim o filo que se caracteriza por animais cujo tecido encontram células urticantes denominadas cnidócitos, utilizadas para sua defesa e captura de presas. Estes animais vêm causando interesse farmacológico devido às substâncias secretoras, como toxinas e mucos (NEVES et al., 2007).

Uma característica marcante do filo *Cnidaria* é a presença de nematocistos (cnidocistos), estruturas contendo toxinas utilizadas para defesa e alimentação, produzidas por células especializadas (cnidócitos) localizadas na epiderme do animal. Ainda, são animais diploblásticos, com apenas dois epitélios (epiderme e gastroderme) separados por uma camada denominada mesoglêia. Possuem apenas uma cavidade corpórea denominada cavidade gastrovascular, com apenas uma abertura para o ambiente, a boca (RABELLO, 2007).

Contudo, o estudo químico com cnidários teve grande impulso durante a década de 60 com o descobrimento das prostaglandinas em varias espécies de corais moles do Caribe, em especial a Gorgónia *Plexaura homomalla* (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969). Algumas propriedades biológicas, como antimicrobiana foi detectada a partir de extratos de tecidos e de metabólitos secundários extraídos de espécies de zoantídeos. (VENKATESWARLU et al., 1998; QUINTANA et al., 2015). Apesar dos avanços com os cnidários, as algas lideram a maioria das pesquisas relacionadas ao isolamento de substâncias, caracterização e atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos (HWANG et al., 2008, ZHANG et al., 2010, WIJESEKARA et al., 2011).

3.2. *Palythoa caribaeorum*

Os zoantídeos são cnidários polipoides exclusivamente marinhos que habitam os recifes costeiros (SOARES et al., 2006). Algumas espécies, como o *Palythoa caribaeorum*, abrigam em seus tecidos, microalgas, denominadas zooxantelas (zooxanthellae), com quem mantêm uma relação de simbiose. Estas algas fotossintéticas contribuem significativamente para a nutrição do seu hospedeiro (MUSCATINE, 1990; KEMP et al., 2006). Em troca, as zooxantelas recebem altas concentrações de nitrogênio e carbono inorgânico (MEDONCA-NETO et al., 2008) além de receberem proteção contra os raios UV (LESSER e SHICK, 1989).

Os corais, zoantídeos, anêmonas do mar são descritos como competidores, através de seus órgãos agressivos como tentáculos, ou por aleloquímicos. Evidências recentes sugere que várias espécies de zoantídeos como *Palythoa sp* tire proveito da carga de nutrientes em recifes e ganham uma vantagem competitiva sobre outros organismos sésseis como esponjas (SINGH E THAKUR, 2016).

O *P. caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) é um zoantídeo, pertencente ao filo Cnidaria, amplamente distribuído nos recifes do Caribe e do Brasil, em toda costa oeste do oceano atlântico (REIMER et al., 2007) e bastante abundante no litoral sul de Pernambuco, com maior predominância nas praias de Piedade, Guadalupe e Suape (Figura 1) e também em Porto de Galinha. Além de

também ocorrer no Atol das Rocas, nos arquipélagos de Fernando de Noronha, São Pedro e São Paulo, Abrolhos, e na ilha Trindade (NEVES et al., 2002). A predominância deste organismo em muitos recifes pode ser explicada por sua alta tolerância a estresses ambientais (SEBENS, 1982) e por sua alta capacidade reprodutiva (ACOSTA e ASBAHR, 2000). Estes animais apresentam o corpo em forma de coluna e formam extensas colônias quando expostas ao ambiente, e durante a maré baixa, seus pólipos retraídos produzem um muco, conhecido popularmente como “baba de boi” e cuja função é proteger a colônia da dessecação (SOARES et al., 2006, MELO et al., 2012) (Figura 2).

O gênero *Palythoa* se caracteriza pela presença de uma potente toxina denominada palitoxina (WU, 2009), um dos mais tóxico e complexo produto natural de composição não proteica (SOSA et al., 2009). Sua ação citotóxica foi avaliada contra linhagem de células do intestino humano, Caco-2, usado como modelo *in vitro* para investigar absorção da palitoxina no lúmen do intestino (PELIN et al., 2012), e contra linhagem de células da pele humana, HaCaT (queratinócitos), para analisar *in vitro* a resposta da pele em contato com a toxina, tendo como resultado a morte das células por necrose, como principal mecanismo de morte celular (PELIN et al., 2014). Estas pesquisas tiveram como respaldo, incidências de intoxicação humana pela palitoxina através dos frutos do mar (ALIGIZAKI et al., 2011), e por contato físico direto na pele (DEEDS e SCHWARTZ, 2010). Esta toxina foi purificada e descrita pela primeira vez em 1971 no Havaí através do *Palythoa toxica* (MOORE e SCHEUER, 1971) e posteriormente detectada em outras espécies de *Palythoa*, como *P. tuberculosa* (KIMURA et al., 1972), *P. mammillosa* e *P. caribaeorum* (ATTAWAY e CIERESZKO, 1974).



Figura 1. Praias localizadas no litoral sul do estado de Pernambuco, que possui colônias de *Palythoa caribaeorum*. a.Piedade, b.Guadalupe, c.Suape.



Figura 2. *Palythoa caribaeorum*. a. Colônias organizadas em tapetes na superfície do recife, b. Pólipos abertos (colônias submersas) c. Pólipos retraídos (colônias expostas).

Fonte: Melo *et al.*, 2012

Populações de *P. Caribaeorum* coletados no litoral Pernambucano foram testadas para toxicidade em camundongos e nenhuma mortalidade foi observada com doses de até 2000 mg/Kg, e ainda não induziam efeitos deletérios no sistema nervoso central e autônomo. Ainda neste trabalho, os pesquisadores identificaram uma significativa atividade analgésica em camundongos, quando inoculados com extratos hidroalcoólicos deste zoantídeo (SOARES *et al.*, 2006). No entanto uma abordagem bioquímica e fitoquímica, através de CCD foram identificadas a presença de terpenos e açúcares redutores, assim como pequenas quantidades de proteínas e grande quantidade de carboidratos (COSTA, 2013).

O *P. caribaeorum* também comumente encontrada nas águas rasas do Atlântico México, no qual, foi estudado uma fração de baixo peso molecular do seu veneno, avaliada contra atividades dos canais de sódio voltagem-dependentes do gânglio superior cervical, de neurônios de rato. Os resultados mostraram que esta fração foi sensível a inativação do canal de sódio, evidenciando a presença de neurotoxinas (LAZCANO-PÉREZ *et al.*, 2014).

Apesar da ampla distribuição geográfica do *P. caribaeorum* pouco se sabe a respeito da microbiota do seu muco. Vendo isto, Campos *et al.*, 2015 realizou uma caracterização taxonômica da microbiota presente no muco na praia do litoral sul de Pernambuco. O grupo dominante encontrado foi γ -proteobacteria (72%) seguido de α -proteobacteria, actinobacteria (12%) e Firmicutes (4%). Entre as γ -proteobacteria

Campos et al., 2015 encontrou *Alcanivorax dieselolei*, uma bactéria degradadora de alcanos. Este é um gênero que compreende espécies gram-negativas, aeróbias e halofíticas, que possuem a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos alcanos como uma fonte de carbono, além de está sendo utilizadas em projetos de biorremediação em ambientes marinhos poluídos. Este foi o primeiro registro de qualquer associação entre *A. dieselolei* e *P. caribaeorum*, e a primeira ocorrência relatada no Oceano Atlântico.

3.3 Muco de corais

O muco é o maior produto de secreção de corais (duros e moles) sendo produzido pelas células glandulares ectodermas a partir da fixação de carbono. É um fluido viscoelástico, tendo a água como maior constituinte, mas desde 1977 vem discutindo a respeito da sua composição que varia de acordo com a espécie (DAUMAS e THOMASSIN, 1977).

Estudos tem demonstrado que mudanças no meio ambiente como diminuição no pH, aumento de temperatura e da matéria orgânica pode está alterando a composição dos corais e em consequência também o muco pode está sofrendo com as mudanças ambientais (AINSWORTH et al., 2009; LITTMAN et al., 2010).

Entre suas principais funções, o muco atua contra os raios ultravioletas, predadores e contra dessecação durante a maré baixa, inclui ainda locomoção, limpeza, processamento de partículas de alimentos e defesa contra agente físico-química e agente infecciosa. Ele ainda fornece um ambiente e condições propícias ao aparecimento de bactérias, atuando como suplemento para microrganismos (TANIGUCHI et al., 2014 e 2015). A microbiota dos mucos de corais vem ganhando espaço para pesquisa, pois os microrganismos associado aos corais pode desempenhar um papel importante na saúde do hospedeiro como proteção contra bactérias patogênicas pela sua produção de compostos antibacterianos (RITCHIE et al., 2006; SHNIT-ORLAND et al., 2009).

Além das zooxantelas, algas endossimbióticas, no qual o muco mantém uma associação simbiótica que contribui para nutrição do hospedeiro transformando carbono inorgânico em carbono fotossintético (LESSER e SHICK, 1989;

MUSCATINE, 1990), o muco secretado pelos corais apresenta outros microrganismos, como bactérias, archaea, fungos e vírus. Estes formam uma estreita relação entre si, e qualquer distúrbio ecológico pode comprometer a saúde do hospedeiro, pois estes são capazes de proteger os corais da invasão de patógenos (ROHWER et al., 2002).

Nos últimos anos tem havido um aumento exponencial na pesquisa com muco de corais. A área mais ativa tem sido o estudo da estrutura e função, retratando a dinâmica do muco dos corais (BYTHELL E WILD, 2011). Em 2013, Carlos et al. (2013) avaliou a composição taxonômica de comunidades bacterianas associadas com o muco de quatro espécies de corais (*M. decactis*, *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, e *Tubastraea coccinea*) em duas épocas (inverno e verão).

Algumas proteínas já foram isoladas de muco de invertebrados marinhos, como ostras, no qual o muco demonstrou ter uma grande importância no tratamento de partículas de alimentos e nas interações com agentes patogênicos. Dada a pouca informação disponível sobre o muco em bivalves, a caracterização dessas secreções mucosas tornou-se uma prioridade de investigação. Neste estudo, o muco foi coletado separadamente dos manto, brânquias e palpos labiais da ostra-americana (*Crassostrea virginica*) e analisados por cromatografia líquida e espectrometria de massa. Os resultados mostraram a presença de uma grande variedade de moléculas envolvidas em interações hospedeiro-microbianas, incluindo moléculas de adesão (por exemplo, lectinas do tipo C) (ESPINOSA et al., 2016).

Além de bivalves, o muco produzido pelo poliqueta *Myxicola infundibulum* também foi avaliado quanto a suas propriedades físico-químicas, levando em consideração não apenas o conteúdo proteico (1,2%), mas também carboidratos, lipídeos, osmolaridade, condutividade elétrica (STABILI et al., 2014).

3.4. Estudos proteômicos de organismos marinhos

A proteômica é o estudo em larga escala de proteínas expressadas por um organismo e fornece uma visão global dos mecanismos toxicológicos de contaminantes. Portanto tem sido utilizada em ecotoxicologia, resultando no

surgimento de "ecotoxicoproteômica". Portanto, a proteômica pode expor alterações que os poluentes provocam nas proteínas. Um estudo realizado com cipermetrina, um pesticida agrícola e doméstica, mostrou que este pesticida induziu alterações nas proteínas relacionadas à fotossíntese em algas marinhas (GAO et al., 2016; YU et al., 2016).

Proteômica geralmente envolve extração, separação e identificação de proteínas em amostras biológicas, visto que as proteínas são importantes para o desenvolvimento dos organismos vivos e que podem ter importantes perfis de propriedades biológicas, pois representam uma variável fonte de novos terapêuticos (LIMA et al., 2013).

Alguns organismos marinhos, como bivalves (*Perna viridis*) tem sido utilizados como modelo para conhecer o perfil proteico. No estudo, foram comparados os perfis de proteínas em brânquias de *Perna viridis* após a exposição ao *Prorocentrum lima*, um dinoflagelado que produz toxinas, e identificou as diferenças de abundância de spots. As proteínas que foram identificadas estão envolvidas em várias atividades biológicas, como o metabolismo, citoesqueleto, transdução de sinal, resposta oxidativa a estresse e desintoxicação (HUANG et al., 2015).

Variedade de peptídeos e proteínas de cnidários foram identificadas atuando como neurotoxina e citolisinas. Mais de 32 espécies de anêmonas do mar produzem peptídeos citolíticos e proteínas. Os cnidários em geral, produzem que toxinas representam uma estratégia para sobrevivência em condições específicas. Não é surpreendente que os seus componentes exerçam efeitos potentes e específicos (ANDERLUH et al., 2002). A análise do perfil proteômico de outro cnidário, *Millepora complanata*, popularmente conhecido como "coral fogo", levou ao isolamento de uma proteína vasoconstrictora de 61 KDa (GARCÍA-ARREDONDO et al., 2015).

Os equinodermos, como estrelas do mar, também são alvos de identificação do seu conteúdo proteico. Sua secreção epidérmica, as quais representam a primeira barreira contra invasores, foi analisada e identificada proteínas envolvidas na defesa e adesão do organismo (HENNEBERT et al., 2015). Os peixes por sua vez, conhecidos por serem ricos em ômega 3, vitaminas e minerais, apresentam

peptídeos a partir de proteínas hidrolisadas, com atividade antioxidante. Os peptídeos foram identificados e purificados de carapau (*Megalaspis cordyla*) e corvina (*Otolithes ruber*) (KUMAR et al., 2012). Sila e Bougatef (2016) sugere que os peptídeos antioxidantes sejam utilizados não apenas como alimentos funcionais, mas também para fins terapêuticos.

Além dos peixes (SLIZYTE et al., 2010), outros animais foram alvos de análises de perfil proteômico, como mexilhão (JUNG e KIM, 2005), lulas (SHEIH et al., 2009), caracóis marinhos (ROBINSON et al., 2015), Plâncton *Brachionus rotundiformis* (BYUN et al., 2009) todos apresentaram conteúdo proteico com propriedades antioxidante.

Grande parte das análises proteicas encontram peptídeos com atividade antioxidante. Porém 1985, os peptídeos derivados da esponja *Discodermia kilensis* foram estudados e detectados com ação antimicrobiana (MATSUNAGA et al., 1985; LIU et al., 2008), são os chamados peptídeos antimicrobianos, candidatos promissores para novos agentes terapêuticos (KIM e WIJESEKARA, 2010; MANSOUR et al., 2014).

As proteínas e peptídeos bioativos tem sido isolados não só a partir de animais marinhos, mas também de algas marinhas (SHEINH et al., 2009). Embora em uma escala menor em relação aos animais marinhos, algumas proteínas como lectina e ficobiloproteínas foram relatadas a partir de algas. E foi a partir da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* que uma nova família de lectina foi isolada (BUCK et al., 1992; CALVETTE et al., 2000). Ademais, *Saccharina longicruris* é uma macroalga, na qual apresenta proteínas antimicrobianas (BEAULIEU et al., 2015).

Além do uso terapêutico que as proteínas marinhas podem exercer, elas podem utilizadas como bioindicadores da poluição, assim como as proteínas do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, por exemplo, coletadas sazonalmente no Norte do Adriático, Croácia, foram caracterizadas e determinadas como biomarcadoras de poluição ambiental (HAMER et al., 2004). A utilização da proteômica pode ser uma ferramenta importante para se descobrir efeitos, até então desconhecidos, de estressores ambientais, como mudanças na temperatura, osmótica, e condições aeróbicas (TOMANEK, 2010).

4. Referências

- ACOSTA, A; ASBAHR, M. Reproductive effort in *Palythoa caribaeorum*. **International Coral Reef Symp.** Bali, Indonesia, 295 pp. 2000.
- AINSWORTH, T. D; HOEGH-GULDBERG, O. Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. **Aquat. Biol.** 4, 289–296. 2009.
- ALIGIZAKI, K; KATIKOU, P; MILANDRI, A. AND DIOGÈNE, J. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. **Toxicon.** 57: 390–399, 2011.
- ALPUCHE, J; PEREYRA, A; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G; AGUNDIS, C; ROSAS, C; ZENTENO, E. Purification and partial characterization of na agglutinin from *Octopus maya* serum. **Comp. Bioch. And Physiol. Parte B.** 156: 1-5, 2010.
- ANDERLUH, G; MACEK, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). **Toxicon.** 40: 11-124, 2002.
- ANEIROS, A; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography B.** 803: 41–53, 2004.
- APPELTANS, W; BOUCHET, P; BOXSHALL, G. A; FAUCHALD, K; GORDON, D. P; HOEKSEMA, B. W; POORE, G. C. B; VAN SOEST, R. W. M; STÖHR, S; WALTER, T. C; COSTELLO, M. J. (Ed.). **World register of marine species**. Disponível em <<http://www.marinespecies.org>>. 2010.
- ATTAWAY, D. H. AND CIERESZKO, L. S. Isolation and partial characterization of Caribbean palytoxin. **Coral Reef Symp.** 497-504, 1974.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 421: 125-134, 2004.
- BARRY, R.; SOLOVIEV, M. Quantitative protein profiling using antibody arrays. **Proteomics.** 4: 3717–3726. 2004
- BEAULIEU, L.; BONDU, S.; DOIRON K.; RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicruris* and identification of peptides implied in bioactivity. **Journal of Functional Foods.** 17: 685–697, 2015.

BUCK, F.; LUTH, C.; STRUPAT, K.; BRETTING, H. Comparative investigations on the amino-acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Biochim. Biophys. Acta** 1159- 1, 1992

BYTHELL, J. C.; WILD, C.. Biology and ecology of coral mucus release. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 408: 88–93, 2011.

BYUN, H. G.; LEE, J. K.; PARK, H. G.; JEON, J. K.; KIM, S. K. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Process Biochemistry**. 44: 842–846, 2009.

CALVETTE, J. J.; COSTA, F. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; C. BLOCH JR., C.; SILVEIRA, S. B.; FREITAS, B. T.; SAMPAIO, A.H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure Cell. **Mol. Life Sci**. 57: 343- 350, 2000.

CAMPOS, FF.; GARCIA, J. E.; LUNA-FINKLER, C. L.; DAVOLOS, C. C.; LEMOS, M. V. F. and PÉREZ, C. D. *Alcanivorax dieselolei*, an alkane-degrading bacterium associated with the mucus of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa). **Braz. J. Biol.** V 75, 2: 431-434, 2015.

CARLOS, C.; TATIANA T. TORRES, T. T AND OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**. 3 : 1624, 2013

COSTA, S. L. A. Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente)**. Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. 2013.

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.

DEEDS, J. R. AND SCHWARTZ, M. D. Human risk associated with palytoxin exposure. **Toxicon**. 56: 150-162, 2010.

ESPINOSA, E. P.; KOLLER, A.; ALLAM, B. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Proteomics**. 132: 63–76, 2016.

GAO, Y.; LIM, T. K.; LIN, Q. and LI, S. F. Y. Identification of cypermethrin induced proteins changes in green algae by iTRAQ quantitative proteomics. **Journal of Proteomics**. 2016.

GARCÍA-ARREDONDO, A.; ROJAS-MOLINA, A.; BAH, M.; IBARRA-ALVARADO, C.; GALLEGOS-CORONA, M. A.; GARCÍA-SERVÍN, M. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 169: 55–64, 2015.

HAMER, B.; HAMER, D. P.; MÜLLER, W. E. G.; BATEL, R. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. **Environment International**. 30: 873–882, 2004.

HENNEBERT, E.; LEROY, B.; WATTIEZ, R.; LADURNER, P. An integrated transcriptomic and proteomic analysis of sea star epidermal secretions identifies proteins involved in defense and adhesion. **Journal of Proteomics**. 128: 83–91, 2015.

HIGGINS, P. G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**. 65:233–8, 2010.

HUANG , L.; ZOU, Y.; WENG, H. W.; LI, H. Y.; LIU, J. S.; YANG, W. D. Proteomic profile in *Perna viridis* after exposed to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. **Environmental Pollution**. 196: 350-357, 2015.

HWANG, H.J.; KWON, M. J.; KIM, I. H.; NAM, T. J. The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon fulvescens* on ethanol administration. **Food and Chemical Toxicology** 46: 2653–2657, 2008.

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

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.

KIM, S. K. AND WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. **Journal of functional foods.** 2: 1 – 9, 2010.

KIMURA, S. AND HASHIMOTO, Y. Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Toxicon.** 10: 611–612, 1972.

KOSSUGA, M.H et al. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchoraarbuscula*, *Aplysinasp.*, *Petromicaciocalyptoides* e *Topsentiaophiraphidites*, da ascídia *Didemnumligulum* e do octocoral *Carijoariisei*. **Quim. Nova.** 30: 1194-1202, 2007.

KUMAR, N. S. S.; NAZEER, R. A.; JAIGANESH, R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). **Amino Acids.** 42:1641–1649, 2012.

LAZCANO-PÉREZ, F.; VIVAS, O.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; RODRÍGUEZ-BUSTAMANTE, E.; CASTRO, H.; ARENAS, I.; GARCÍA, D. E.; SÁNCHEZ-PUIG, N.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. A purified *Palythoa* venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. **Toxicon.** 82: 112–116, 2014.

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

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacogn**. 16: 158-163, 2006.

LIMA, L. A.; MIGLIOLO, L.; CASTRO, C. B.; PIRES, D. O.; LÓPEZ-ABARRATEGUI, C.; GONÇALVES, E.F.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OTERO-GONZALEZ, A. J.; FRANCO, O. L. AND DIAS, S. C. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Brazilian Coast Coral *Phyllogorgia dilatata*. **Protein & Peptide Letters**. 20: 1153-1158, 2013.

LITTMAN, R.A.; BOURNE, D. G.; WILLIS, B. L. Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with Symbiodinium type on the same coral host. **Mol. Ecol**. 19: 78–90, 2010.

LIU, Z.; DONG, S.; XU, J.; ZENG, M.; SONG, H.; ZHAO, Y. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. **Food Control**. 19: 231–235, 2008.

MANSOUR, S. C.; PENA, O. M. AND HANCOCK, R. E. W. Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends in Immunology**. 35, Nº. 9, 2014.

MATSUNAGA, S.; FUSEYANI, N. AND KONOSU, S. Bioactive marine metabolites vii. structures of discodermins b, c, and d, antimicrobial peptides from the marine sponge *Discodermia kilensis*. **Tetrahedron Letters**. 26: 855-856, 1985.

MELO, L. F. A.; CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, L. L. D. S. S.; MODESTO, J. C. A.; PEREZ, C. D. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. **Biotemas**. 25: 145-151, 2012.

MENDONÇA-NETO, J. P.; FERREIRA, C.E. L.; LAÍS C.T. CHAVES, L. C. T.; PEREIRA, R. C. Influence of *Palythoa caribaeorum* (Anthozoa, Cnidaria) zonation on site-attached reef fishes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 80: 495-513, 2008.

MOORE, R. E. and SCHEUER, P. J. Palytoxina: A new marine toxin from a coelenterate. **Science**. 172: 495-496, 1971.

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

NEVES, E. G.; DA SILVEIRA, F. L.; JOHNSON, R. and LONGO, L. L. Shallow-water scleractinian corals and zoanthids from reefs of Coroa Grande, Pernambuco State, Brazil. **Biociências**. 10: 127-145, 2002.

NEVES, R.F., AMARAL, F.D., STEINER, A.T.; Levantamento de registros dos acidentes com cnidários em algumas praias do litoral de Pernambuco (Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1):231-237, 2007.

PELIN, M.; SOSA, S.; PACOR, S.; TUBARO, A.; FLORIO, C. The marine toxin palytoxin induces necrotic death in HaCaT cells through a rapid mitochondrial damage. **Toxicol Lett.** 229:440-50, 2014.

PELIN, M.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; POLI, M.; TUBARO, A.; DECORTI, G.; FLORIO, C. The cytotoxic effect of palytoxin on Caco-2 cells hinders their use for in vitro absorption studies. **Food Chem Toxicol.** 50:206-11, 2012.

QUINTANA, J.; BRANGO-VANEGASA, J.; COSTA, G. M.; CASTELLANOSA, L.; ARÉVALOA, C.; DUQUE, C. Marine organisms as source of extracts to disrupt bacterial communication: bioguided isolation and identification of quorum sensing inhibitors from *Ircinia felix*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2015.

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.

RINEHART, K. L.; SHAW, P. D.; SHIELD, L. S.; GLOER, J. B.; HARBOUR, G. C.; KOKER, M. E. S.; SAMAIN, D.; SCHWARTZ, R. E.; TYMIAK, A. A.; WELLER, D. L.; CARTER, G. T.; MUNRO, M. H.; HUGHES, R. G.; RENIS, H. E.; SWYNNENBERG, E. B.; STRINGFELLOW, D. A.; VAVRA, J. J.; COATS, J. H.; ZURENKO, G. E.; KUENTZEL, S. L.; LI, L. H.; BAKUS, G. J.; BRUSCA, R. C.; CRAFT, L. L.; YONG, D. N.; CONNER, J. L. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. **Pure Appl Chem.** 53: 795-817, 1981.

RITCHIE, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series.** 322: 1–14, 2006.

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.

ROBINSON, S. D.; LI, Q.; BANDYOPADHYAY, P. K.; GAJEWIAK, J.; YANDELL, M.; PAPENFUSS, A. T.; PURCELL, A. W.; NORTON, R. S.; HEMAMI, H. S. Hormone-like peptides in the venoms of marine cone snails. **General and Comparative Endocrinology.** xxx: xxx–xxx. 2015.

ROE, M. R.; GRIFFIN, T. J. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes. **Proteomics.** 6: 4678-4687. 2006.

ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series.** 243: 1-10. 2002.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIOS, C. G.; JIMÉNES, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da

Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. **Comunicado Técnico**. ISSN 1679-6535. 2007.

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

SHEIH, I. C.; WUB, T. K.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**. 100: 3419–3425, 2009.

SHNIT-ORLAND, M. & KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defence. **FEMS Microbiol. Ecol**. 67: 371–380, 2009.

SILA, A E BOUGATEF, A. Journal of Functional Foods, 2016 – Elsevier. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**. 21: 10–26, 2016.

SILVA, D. C. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**. 87:139– 145, 2012.

SINGH, A. AND THAKUR, N. L. Significance of investigating allelopathic interactions of marine organisms in the discovery and development of cytotoxic compounds. **Chemico-Biological Interactions**. 243: 135-147, 2016.

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

SOSA, S.; DEL FAVERO, G.; DE BORTOLI, M.; VITA, F.; SORANZO, M. R.; BELTRAMO, D.; ARDIZZONE, M.; TUBARO, A. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. **Toxicol Lett**. 191: 253-9, 2009.

STABILI, L.; SCHIROSI, R.; LICCIANO, M.; GIANGRANDE, A. Role of *Myxicola infundibulum* (Polychaeta, Annelida) mucus: From bacterial control to nutritional home site. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 461: 344–349, 2014.

STEINESTEL, K., EDER, S., EHINGER, K., SCHNEIDER, J., GENZE, F., WINKLER, E., ... and STEINESTEL, J. The small conductance calcium-activated potassium channel 3 (SK3) is a molecular target for Edelfosine to reduce the invasive potential of urothelial carcinoma cells. **Tumor Biology**, 1-9, 2015.

TANIGUCHI, A.; YOSHIDA, T.; HIBINO, K.; EGUCHI, M. Bacterial production is enhanced by coral mucus in reef systems. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 461: 331–336, 2014.

TANIGUCHI, A.; YOSHIDA, T.; HIBINO, K.; EGUCHI, M. Community structures of actively growing bacteria stimulated by coral mucus. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 469: 105–112, 2015.

TOMANEK, L. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. **Annu. Rev. Mar. Sci.** 3:14.1–14.27, 2011.

VENKATESWARLU, Y.; REDDY, N. S.; RAMESH P; REDDY, P. S, JAMIL K. Chemical reduction of zoanthamine and evaluation of antibacterial activity. **Heterocycl Commun** 4: 575-580, 1998.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**. 84: 14–21, 2011.

WU, C. H. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. **Toxicon** 54: 1183–1189, 2009.

WU, H.; JI, C.; WEI, L. AND ZHAO, J. Evaluation of protein extraction protocols for 2DE in marine ecotoxicoproteomics. **Proteomics** . 13: 3205–3210, 2013.

YU, D.; JI, C.; ZHAO, J. and WU, H. Proteomic and metabolomic analysis on the toxicological effects of As (III) and As (V) in juvenile mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, 150, 194-201, 2016.

ZHANG, Z.; WANG, F.; WANG, X.; LIU, X.; HOU, Y.; ZHANG, Q. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**. 82: 118–121, 2010.

Artigo a ser submetido ao periódico JOURNAL BIOTECHNOLOGY



(FI: 2,667; QUALIS: B1)

CAPÍTULO 2

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PERFIL PROTEOMICO DO MUÇO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum*

Marllyn Marques da Silva¹, Thiers Araújo Campos⁵, Isabela Macário^{2,3}, Idjane de Oliveira³, Carlos Daniel Pérez⁵, Roberto Afonso da Silva², Marcela Silvestre Outtes Wanderley^{2,4}, Noemia Pereira da Silva Santos^{1,2*}

¹Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (Nanobiocel) - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil; ²Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife-PE, Brasil; ³Laboratório de Microbiologia e Imunologia – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina – *Campus* Serra Talhada/Universidade de Pernambuco, Serra Talhada-PE, Brasil, ⁵Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE), Recife-PE, Brasil; ⁵Laboratório de Biodiversidade – Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Laboratório de Nanotecnologia Biotecnologia e Cultura de Células

Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,

55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)

E-mail: noemia.santos@pq.cnpq.br

Resumo

O *Palythoa caribaeorum*, do filo Cnidaria, é um organismo marinho abundante no litoral de Pernambuco e responsável pela produção de um muco durante a maré baixa. Esse muco ainda é pouco conhecido quanto as suas propriedades bioquímicas e farmacológicas. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades biológicas do muco e do seu extrato proteico (EP) e traçar o seu perfil proteômico. A citotoxicidade revelou que o EP apresentou viabilidade celular abaixo de 50 % nas linhagens de MCF-7 e S-180; IC₅₀ de 6,9 µg/mL para a linhagem de macrófagos (J774); e favoreceu o crescimento celular de fibroblastos. Ainda, o EP exibiu atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O muco não apresentou atividade hemolítica e foi capaz de reduzir em 50 % do radical ABTS. A identificação do perfil proteômico mostrou 76 spots, dos quais 14 proteínas foram identificadas pelo algoritmo Mascot (Matrix Biosciences): “glutamyl-tRNA synthetase”, “Hypothetical protein PFICI_09699” e “Hypothetical protein NECAME_18605”, “Proteasome subunit aloha type-1”, “PAS domain S-box protein, parcial”, “Uroporphyrinogen-III synthase”, “Beta-2-microglobulin”, “Zinc metalloproteinase-disintegrin-like”, “mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim 10”, “deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2”, “Zinc Finger Protein 654”, “Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like”, LIN-52. “Killer protein”. Diante do exposto, o muco produzido pelo *P. caribaeorum* apresenta-se como uma fonte rica para isolamento de biomoléculas com atrativo potencial terapêutico.

Palavras-chave: Zoantídeo. *Palythoa caribaeorum*. Proteômica. Citotoxicidade. Muco.

Abstract

The marine invertebrates are capable of producing bioactive compounds that may be of therapeutic use. The *Palythoa caribaeorum* belonging to the phylum *Cnidaria*, is an abundant marine organism in the coast of Pernambuco. The mucus produced by it during low tide, known as baba ox, is still little known about their biochemical and

pharmacological properties. The objective of this study was to assess possible biological activities of mucus and its protein extract and trace the proteomic profile of the mucus. Cytotoxicity revealed that the protein extract showed cell viability below 50% in the lines MCF-7 and S-180, and the line of macrophages (J774) extract showed IC₅₀ of 6.9 ug / ml, suggesting the therapeutic use against intracellular infections. Presented IGH 250 ug / ml for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The identification of the proteomic profile shows 76 spots, of which 14 proteins were identified: “glutamyl-tRNA synthetase”, “Hypothetical protein PFICI_09699” and “Hypothetical protein NECAME_18605”, “Proteasome subunit aloha type-1”, “PAS domain S-box protein, partial”, “Uroporphyrinogen-III synthase”, “Beta-2-microglobulin”, “Zinc metalloproteinase-disintegrin-like”, “mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim 10”, “deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2”, “Zinc Finger Protein 654”, “Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like”, LIN-52. “Killer protein”. Given the above, the mucus produced by *P. caribaeorum* presents itself as a rich source for the isolation of biomolecules with attractive therapeutic potential.

Keywords: Zoanthid. *Palythoa caribaeorum*. Proteomics. Cytotoxicity. Mucus.

Destaques

- Esse é o primeiro trabalho com objetivo de desvendar as proteínas existentes no muco;
- O extrato proteico apresentou ação antitumoral in vitro e antimicrobiano;
- Identificada proteína Metaloproteinase envolvida na regeneração tecidual;
- Duas proteínas foram identificadas com potencial contra células tumorais.

1. Introdução

Nas últimas décadas houve um aumento nas descobertas de novas substâncias isoladas a partir de organismos marinhos (Blunt et al., 2014; Quintana et al., 2015), pois estes têm sido visto como potencial de compostos bioativos com várias atividades biológicas, capazes de sintetizar moléculas citotóxicas potentes, que tem funções específicas para proteção e defesa contra infecções por microrganismos. As propriedades biológicas podem ter aplicações terapêuticas para a saúde (Blunt et al., 2014; Kim et al., 2012). Um desses bioativos são as moléculas de proteínas, promissoras para o desenvolvimento de compostos terapêuticos. A caracterização proteômica é importante para detectar as proteínas com numerosos efeitos a saúde (Beaulieu et al., 2015). Há proteínas com propriedades biológicas bem definidas como antioxidantes (Robinson et al., 2015), antibacterianas (Sila et al., 2014; Samy et al., 2015) e antiproliferativas (Picot et al., 2006; Suarez-Jimenez et al., 2012) e anti-hipertensiva (Ochoa-Méndez et al., 2016).

O zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, pertencente ao filo Cnidaria, é bastante abundante no litoral Pernambucano. Nesta região é encontrado alto grau de endemismo e competitividade, isso torna o ambiente mais diverso quanto as suas características biológicas. Seu desenvolvimento é vegetativo com altas taxas de regeneração. Durante a maré baixa, seus pólipos liberam um muco conhecido como baba de boi, que serve principalmente para proteger a colônia contra dessecação e contra patógenos (Soares et al., 2006; Almeida et al., 2012).

A grande diversidade de biocompostos sintetizados pelos organismos marinhos pode representar aplicações terapêuticas à saúde humana (Vizetto-Duarte et al., 2015). Segundo relatos populares, o muco apresenta efeito cicatrizante, anti-inflamatório e analgésico (Soares et al., 2006). Portanto, as características do muco, o torna importante fonte para investigações, visto que ainda não há estudos biológicos, tão pouco o isolamento de substâncias.

Devido ao aumento da resistência aos antibióticos convencionais bem como as doenças associadas à infecções, há uma procura incessante para a descoberta de novos agentes terapêuticos e eficazes não somente contra bactérias, mas também contra células cancerígenas, no qual os quimioterápicos utilizados no tratamento são sintéticos e causam efeitos indesejáveis. Porquanto, as proteínas e seus derivados vêm sendo investigados para o uso terapêutico, pois possuem perfil

específico, não causam efeitos colaterais e não promovem resistência bacteriana (Padhi et al., 2014).

Este estudo tem a finalidade de avaliar a citotoxicidade do muco e o seu extrato proteico contra células cancerígenas Sarcoma-180 (tumor ascítico de ratos), MCF7 (câncer de mama humano) e HELA (adenocarcinoma do colo do útero humano), e células normais, J774 (macrófagos de murino) e CCD1072Sk ATCC® CRL2088™ (fibroblastos humano), bem como testar seu potencial antimicrobiano. O muco foi avaliado ainda quanto a sua atividade antioxidante e hemolítica. Complementarmente, este é um trabalho pioneiro cujo objetivo foi determinar o perfil proteico do muco e avaliar suas propriedades biológicas e do seu extrato proteico.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta do material biológico

As amostras do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* foram coletadas na praia de Porto de Galinha no município de Ipojuca, litoral sul de Pernambuco/Brasil (8°30'24"S; 34°59'52"W). Esta etapa foi realizada com a colaboração do Profº Dr. Carlos Daniel Perez (Laboratório de Biodiversidade do Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco). O muco foi coletado diretamente de suas colônias, através de estimulação digital, com auxílio de luvas. O material coletado foi transportado em caixa térmica hermeticamente fechada e lacrada a 4°C, até o local final do armazenamento (- 20°C). As amostras biológicas coletadas do *Palythoa* foram submetidas ao congelamento (- 80°C), e em seguida liofilizadas.

2. 2. Preparação do muco

O muco liofilizado (1g) foi reidratado com 15 mL de água ultra pura e levado ao banho ultrassônico em baixa temperatura (≈ 4°C) por 40 min. Em seguida, o material foi centrifugado, rotor RA-3R a 10.000 rpm por 15 min. a 20°C. O sobrenadante foi coletado e submetido a congelamento (- 80°C) e novamente foi para liofilização.

Posteriormente, 400mg do liofilizado foi diluído em 1 mL de água ultra pura e foi feito a dosagem de proteínas através do kit comercial, 2-D Quant Kit (Ge Healthcare), este kit é capaz de quantificar precisamente as proteínas da amostra eliminando quaisquer interferentes, aumentando sua eficiência. A amostra foi lida no espectrofotômetro a 480 nm. Foi determinada uma curva padrão, e a partir desta, foi estimada a dosagem de proteínas.

2. 3. *Ensaio de citotoxicidade*

Os experimentos foram conduzidos com Células de tumor primário, Sarcoma-180 (S-180), assim como células tumorais permanentes HELA e MCF-7 (câncer de mama), e ainda utilizamos duas linhagens de células saudáveis, J774 (macrófagos) e CCD1072Sk (fibroblasto humano). Um ensaio de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular (Mossman , 1983). Exceto as células de S-180, em que a contagem de células foi feita diretamente na câmara de Neubauer, a uma densidade de 1×10^6 células/mL, as outras linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (10 %) e uma associação dos antibióticos: penicilina-estreptomicina (1 %). Estas foram tripsinizadas e depois inoculadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10^4 – 1×10^5 células/mL e após 24h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, foram expostas aos tratamentos por 48 horas, nas concentrações finais de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. O composto foi solubilizado em meio de cultura não suplementado. Após 48h de exposição ao tratamento, foi adicionado em cada poço, 25 µL de solução de MTT (5mg/mL), e as placas foram incubadas durante 3h. Após a incubação o sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 µL de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em Leitor de Microplaca, a 570 nm. Em comparação com os grupos controle, a citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular: $(A_{570} \text{ da população celular tratada} \times 100 / A_{570} \text{ da população celular não tratada})$ (Santos et al., 2015). Foi utilizado DMSO como controle positivo.

2.4. *Atividade antimicrobiana*

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada pelo método de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014).

Inicialmente foi distribuído caldo Müller-Hinton em cada poço das placas. Em seguida foram adicionadas as amostras (proteínas e muco) através de diluição seriada e posteriormente as suspensões bacterianas foram adicionadas. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano utilizando o corante resazurina. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota dos micro-organismos dos poços em que não houve crescimento visível foi inoculada em ágar Müller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração que não houve crescimento microbiano.

2.5. Determinação da atividade antioxidante total

Foi determinado pelo método de Re et al ([Re et al., 1999](#)). O radical ABTS^{•+} foi dissolvido em um volume de água destilada apropriado e adicionado a uma solução de Persulfato de potássio e deixado a 27 °C por 16 horas ao abrigo da luz. Após esse tempo, 1 mL da solução foi dissolvido em etanol até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,5$ nm a 734 nm. Para tal, utilizou-se o Trolox como padrão.

Em ambiente escuro foi transferido uma alíquota de 30 µL de cada diluição do muco para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical ABTS^{•+}. A leitura (734 nm) foi realizada após 6, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. As absorbâncias obtidas foram substituídas na equação da reta da curva padrão do trolox. O valor final obtido corresponde a porcentagem de atividade antioxidante.

2. 6. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada de acordo com [Jandú \(2013\)](#) com algumas modificações. O sangue para o ensaio hemolítico (5 a 10 ml) foi obtido de voluntários saudáveis por punção venosa e colocado em tubos heparinizados. Os eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação (1500 rpm, 10 min a 4 ° C). Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4). Cada tubo recebeu 1,1 ml de suspensão de eritrócitos (1%) e 0,4 mL de diferentes concentrações do muco (500, 250 e 125 mg / ml). Os controles foi

DMSO 20% (negativo) e Triton-x (positivo). Após 60 min de incubação as células foram centrifugadas e a absorvência do sobrenadante foi registrada a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela seguinte fórmula:

$$AH = \frac{\text{Amostra (média)} - \text{Controle (-)} \times 100\%}{\text{Controle (+)} - \text{Controle (-)}}$$

2.7. Determinação do perfil proteômico

2.7.1. Extração e quantificação de proteínas totais

O muco liofilizado (400 mg) foi diluído em 1 mL de água ultra pura para a quantificação de proteínas totais pelo 2-D Quant kit (GE Healthcare Corp., USA). A leitura foi realizada em 480nm, tendo BSA (Albumina de Soro Bovino) como padrão.

As proteínas totais foram precipitadas utilizando o kit comercial 2-D Clean-Up (GE Healthcare Corp., USA) seguindo as instruções do fabricante.

2.7.2. Eletroforese Bidimensional (E2D)

Para separação das proteínas presentes no muco foi utilizada a eletroforese bidimensional (E2D). Dessa forma, para a primeira dimensão, 400 µg de proteína total foi solubilizado em 250 µL de solução de hidratação (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 100 mM de DTT, 0,002% de azul de bromofenol e 2 % de Pharmalite pH 3-10) e usada para a rehidratação das fitas Immobiline DryStrips, durante 16 h, a 27 °C usando IPGbox (GE Healthcare Corp., USA). A focalização isoelétrica das amostras embebidas nas fitas foi realizada em aparelho IPGPhor 3 IEF System da Amersham (GE Healthcare Corp., USA). Após a 1ª dimensão, as fitas foram equilibradas com tampão contendo 6 M de uréia, 50 mM tampão TRIS-HCl pH 6.8, 30 % de glicerol, 2 % de SDS e DTT (10 mg/mL) durante 15 min e a seguir, usando o mesmo tampão e tempo de incubação, com a iodoacetamida (25 mg/mL) em substituição ao DTT. A corrida da 2ª dimensão ocorreu em gel de 12,5 % de SDS-PAGE, corrente elétrica de 20 mA e utilizando um tampão Tris-glicina descrito por [Laemmli \(1970\)](#). Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue e suas imagens digitalizadas com auxílio do Image Scanner III (GE Healthcare

Corp., USA). Os spots foram analisados pelo Software ImageMaster 2D Platinum Versão 7.0 (GE Healthcare Corp., USA).

2.7.3. Tripsinização dos spots

Os spots foram cortados com auxílio de um bisturi estéril e nos tubos contendo os spots, nos quais ficaram por 12h em 200 µL de solução de descoloração (50% metanol, 5% ácido acético). Em seguida, esta solução foi removida e adicionada a solução de lavagem (25mM NH_4HCO_3 : 50% Acetonitrila), levado ao vórtex por 10 minutos, repetindo-se o passo por outras duas vezes. Em seguida, pela adição de Acetonitrila 100%, iniciou-se a desidratação dos spots, e então, os géis foram secados em *speedvac* (Concentraton 5301, Eppendorf). A tripsina foi preparada conforme as instruções do fabricante (In vitrogen Inc, USA) em tampão de 25 mM NH_4HCO_3 . Os spots foram mantidos imersos na solução de tripsina em banho maria a 37 °C (20 h). Após o final da digestão com tripsina, a enzima foi inativada e procedeu-se a extração orgânica dos peptídeos pela adição de 30 µL de solução 5% TFA: 50% ACN. Depois de incubados por 1 h, a solução contendo os peptídeos extraídos foi transferida para um novo tubo e com o auxílio do *speedvac* foi concentrada.

2.7.4. Análise de Espectrometria de massa

Após extração dos peptídeos, as amostras foram diluídas e homogeneizadas em 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%. Após este procedimento, uma alíquota de 2 µL foi misturada com o mesmo volume de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, 10 mg/mL) e 1 µL dessa mistura foi aplicado sobre a placa de MALDI. Todas as amostras foram aplicadas em triplicata. Após secagem em temperatura ambiente, a placa de MALDI foi inserida no equipamento.

Para a obtenção dos espectros, foi utilizado um espectrômetro de massa MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado com laser de fase sólida, Nd:YAG (355 nm). A aquisição dos espectros foi realizada em modo refletido positivo, na faixa de detecção m/z 700 - 5000, com aceleração dos íons a 19 kV. Uma calibração externa foi feita com mistura padrão de peptídeos (Bruker Daltonics), utilizando-se os seguintes padrões (massa monoisotópica): Angiotensina II ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 1046,5418), Angiotensina I ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 1296,6848), Substância P ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 1347,7354), Bombesina

([M+H]⁺ 1619,8223), ACTH clip 1-17 ([M+H]⁺ 2093,0862), ACTH clip 18-39 ([M+H]⁺ 2465,1983) e Somatostatina 28 ([M+H]⁺ 3147,4710). Os espectros foram analisados com auxílio do programa FlexAnalysis versão 3.0 (Bruker Daltonics).

Os espectros obtidos foram analisados usando o algoritmo Mascot (Matrix Biosciences) contra os bancos de dados de proteína do NCBI e SWISSProt. Os parâmetros utilizados foram: Taxinomia: Metazoa; modificações fixadas: carbamidometil (C), modificações variáveis: Oxidação (M).

2.8. Análises estatísticas

Os resultados de foram apresentados como média ± d.p., obtidos a partir de três experimentos independentes em quadruplicata para o ensaio de citotoxicidade. A análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste *Bonferroni* para comparações múltiplas foram utilizados para comparar as médias entre os grupos. Para a análise estatística do teste hemolítico e o teste antioxidante foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey, para comparação de médias. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$ usando o programa *Graph Pad Prism* (versão 5.00).

3. Resultados e discussão

3.1. Ensaio de citotoxicidade

Para a citotoxicidade vale destacar que um composto é considerado bom candidato para inibir o crescimento celular quando sua viabilidade celular for abaixo de 50 % segundo [Na \(2007\)](#).

Nas células de S-180 nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL do muco, a viabilidade celular exibiu valores respectivos de 79,05 ± 3,95; 91,01 ± 4,62; 88,26 ± 5,66; 87,6 ± 5,1; 96,54 ± 5,2 % (figura 1A). Enquanto que, para o extrato proteico os valores de viabilidade celular foram de 28,98 ± 2,49; 62,48 ± 3,63; 80,82 ± 4,70; 84,34 ± 3,0; 85,20 ± 4,84 %, conforme figura 1A. PE apresentou viabilidade abaixo de 50 % na concentração de 100 µg/mL, confirmando que o extrato proteico foi tão efetivo quanto o DMSO (21,45 %). Na concentração de 50 µg/mL o EP tem com efeito citotóxico contra as células de sarcoma de acordo com [Cai \(2012\)](#).

No estudo de citotoxicidade contra as células de Hela, o muco apresentou viabilidade celular entre 60 e 80 %. Nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL os valores foram respectivamente de $65,96 \pm 1,44$; $73,02 \pm 1,37$; $76,76 \pm 0,005$; $75,96 \pm 1,64$; $76,68 \pm 0,96$ % (figura 1B). Já o extrato proteico apresentou respectivos valores de viabilidade: $82,93 \pm 1,2$; $84,29 \pm 5,1$; $84,2 \pm 5,34$; $85,68 \pm 1,04$; $87,70 \pm 3,73$ % significativamente maiores em relação ao muco (Figura 1B).

Quanto às células MCF-7 os valores de viabilidade celular para o muco foram de $93,58 \pm 5,6$; $83,12 \pm 1,4$; $86,58 \pm 5,02$; $88,38 \pm 2,34$; $99,93 \pm 4,52$ %. O extrato proteico apresentou viabilidade abaixo de 50 % nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL, apresentando valores respectivos de $43,1 \pm 5,4$; $46,87 \pm 1,15$; $46,45 \pm 2,5$ % (figura 1C) demonstrando que o extrato proteico foi efetivo contra essa linhagem celular em concentrações baixas.

Proteínas totais de outros organismos marinhos como as de peixes, testadas contra MCF-7 apresentaram viabilidade acima de 70 % mesmo em alta concentração (1000 µg/mL) (Picot et al., 2006). Moléculas distintas de proteínas, como polímeros naturais extraídos de *Lentinus polychrous*, apresentaram viabilidade acima de 50% nas concentrações de 100 e 50 µg/mL (Thetsrimuang et al., 2011). Confirmando que o EP apresenta maior capacidade de inibição contra essas células.

O EP apresentou viabilidade abaixo de 50 % nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL em células de J774 respectivos valores de $22,18 \pm 1,08$; $28,52 \pm 0,24$; $31,60 \pm 3,29$; $37,57 \pm 1,88$ %. O muco não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações conforme a figura 1D. Uma toxina proteica, Adenilato-ciclase (AC), associada à superfície de *Bordetella pertussis*, bactéria gram negativa, apresentou mais de 80 % de inibição contra J774 na concentração de 100 µg/mL (Hewlett et al., 2006), demonstrando que compostos de natureza proteica apresentam propriedades biológicas de uso terapêutico. As moléculas tóxicas a macrófagos são importantes para combater principalmente infecções intracelulares, como no caso da tuberculose, no qual *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno intracelular, invade os macrófagos e causa a tuberculose (Lira et al., 2009). O EP do muco pode uma boa fonte de moléculas bioativas à utilização terapêutica contra a tuberculose.

A viabilidade dos fibroblastos (CCD1072Sk) observada após exposição ao muco foi de $77,32 \pm 5,76$; $80,09 \pm 2,27$; $82,23 \pm 5,67$; $80,85 \pm 5,64$; $80,89 \pm 5,34$ % nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O EP do muco apresentou viabilidade de $88,58 \pm 1,30$; $87,3 \pm 2,59$; $79,24 \pm 4,23$; $82,0 \pm 1,30$; $108,32 \pm 3,19$ %, respectivamente, conforme a figura 1E. (Figura 1E). Os resultados demonstraram que tanto o muco quanto o extrato proteico não apresentaram citotoxicidade. Um achado interessante foi percebido quando na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ do EP foi observado um aumento no crescimento celular, sugerindo a proliferação dos fibroblastos, em conformidade com os relatos populares (Soares et al., 2006), sugerindo que o EP desempenha papel importante no processo de reparo tecidual, como agente cicatrizante. Adicionalmente, há relatos de moléculas de origem proteica que promove significativamente a cicatrização de feridas, como o peptídeo LL37 (Ramos et al., 2011). Extratos do *P. caribaeorum* foi testado para citotoxicidade contra *Artemia*, pequenos crustáceos da ordem *Anostraca* (Alencar et al., 2015). Porém, o corrente estudo foi o primeiro, cujo objetivo foi obter o extrato proteico do muco que o *Palythoa* produz.

As concentrações que inibe 50 % do crescimento celular (IC_{50}) são mostradas na tabela 1. O muco apresentou valores de IC_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ em todas as células testadas, bem como o EP para as células de Hela e CCD1072Sk. Esses dados sugerem que o muco não é efetivo para inibir o crescimento das células segundo Akindele (2015). As linhagens de S-180, MCF7 e J774 apresentaram duas questões importantes: a primeira é que as células S-180 e MCF-7 foram sensíveis ao EP. A segunda, é que as células J774 foram ainda mais sensíveis, apresentando IC_{50} de $6,9 \pm 2,24$.

Atualmente há uma grande procura por novos compostos antitumorais que sejam eficientes e específicos. Um dos mais comumente utilizados é a Doxorubicina sintética apresentando IC_{50} de $0,38 \pm 0,09$ e $5,90 \pm 0,44$ $\mu\text{g/mL}$ para as células de MCF-7 e S-180 respectivamente. Porém agentes quimioterápicos como a doxorubicina apresentam limitações: não são seletivos ou específicos e afetam tanto as células tumorais como as normais, além de contraindicações na presença de infecções generalizadas (Schmitt and Breinig, 2006). As características de especificidade de seus substratos tornam as moléculas de origem proteica mais

efetivas e com menos efeitos colaterais, além de ser de origem natural. Já a Doxorubicina é sintética, pouca especificidade (Chen et al., 2013).

3.2. Atividade antimicrobiana

Inicialmente, o muco foi testado para avaliar a atividade antimicrobiana conforme tabela 2. Os resultados demonstraram que o muco não apresentou atividade contra as bactérias testadas. Em seguida, a atividade antimicrobiana do extrato proteico testada contra duas bactérias gram negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e duas gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) (tabela 2). Para todas as bactérias testadas o extrato proteico apresentou CMI (Concentração Mínima Inibitória) de 250 µg/mL e CBM (Concentração Bactericida Mínima) superior. Segundo, CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) resultados de CBM acima de 250 µg/mL não representa valor significativo.

E. coli é uma bactéria do trato intestinal, considerada como um patógeno oportunista, causa a maioria das infecções do trato urinário. O gênero *Staphylococcus* é um grupo de bactérias que causam infecções. O *S. aureus*, está presente em superfícies mucosas, causa deterioração dos alimentos, e assim como *E. coli* provoca infecções por via alimentar (Barbosa et al., 2016). O *S. epidermidis*, patógeno oportunista, participa da biodiversidade da pele, e ainda, está associada a infecções de dispositivos médicos implantados, como próteses cardíacas e articulares (Von et al., 20002) e vem adquirindo fatores de resistência múltipla aos antibióticos convencionais (Gill et al., 2005). A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria importante da família das Enterobactérias. A sua implicação maior é infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas) (Xia et al., 2016), principalmente em pacientes imunocomprometidos com HIV (Rameshkumar et al., 2016).

Em concordância com nossos resultados, extratos de invertebrados marinhos como *Sagassum vulgare* e *Laurencia dendroidea* também apresentaram CMI de 250 µg/mL para *S. aureus* (Bianco et al., 2015). Por outro lado, Jandú (2013) testou o extrato metanólico *Myracrodruon urundeuva*, conhecida como aroreira, e obteve CMI acima de 390 µg/mL para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Em

comparação com nossos resultados, isso sugere que o extrato proteico teve melhores resultados de CMI.

Os resultados do muco foram de acordos com os encontrados por [Lima \(2013\)](#). Ele verificou que o extrato bruto do *Palythoa caribaeorum* não apresentou resultados significativos contra bactérias patogênicas. Outros corais também foram avaliados para atividade antimicrobiana, como *Phyllogorgia dilatata*, no qual foi observado que seu conteúdo proteico possui características antimicrobianas, principalmente contra o crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Isso nos indica que o conteúdo proteico de organismos marinhos são moléculas promissoras e uma alternativa aos antibióticos comuns, confirmando os resultados que obtivemos com o extrato proteico do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum*.

3.3. Atividade antioxidante

Os radicais livres desempenham um papel crucial na patogênese de doenças humanas, como câncer, artrite e várias doenças neurodegenerativas e pulmonares ([Rameshkumar e Gutteridge, 2015](#)). Antioxidantes protegem contra esses radicais e, portanto, são importantes ferramentas na obtenção e preservação de boas condições de saúde. Portanto, os perfis de numerosos compostos antioxidantes, naturais e sintéticas, são frequentemente, a fim de identificar os mais potentes ([Arts et al., 2004](#)).

ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) é comumente usado como radical livre para avaliar compostos antioxidantes capazes de reduzi-lo ([Oehlke et al., 2011](#); [Cheng et al., 2015](#)). O muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* foi analisado quanto a sua capacidade de redução do radical ABTS, no qual foi testado na concentração de 100 e 200 mg/mL em diferentes tempos 6, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Os valores de inibição na concentração 100 mg/mL foi de 0,0; 3,51; 19,8; 22,2; 24,3; 51,1 % nos respectivos tempos de 6, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Na concentração de 200 mg/mL os valores de inibição nos respectivos tempos foi de 0,0; 30,5; 20; 34,24; 33,37; 58,62 %, conforme figura 2. Os valores apresentaram resultados significativamente diferentes exceto aos 6 e 30 minutos. O muco apresentou inibição acima de 50 % aos 120 min, apresentando valor significativo de acordo com [Alencar \(2015\)](#), no qual realizou teste de atividade

antioxidante com extratos do *Palythoa caribaeorum* e encontrou porcentagens de inibição acima de 50 %.

Um ponto importante a ser discutido é as concentrações altas pelos quais o muco teve ação antioxidante. Isso pode ser explicado pelo fato de que ele foi testado na íntegra de sua composição, sem isolamentos de moléculas. Mas, já foi comprovado na atividade citotóxica e antimicrobiana, que o isolado proteico do muco apresentou resultados que confirma seu potencial biológico.

3.4. Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica é usualmente realizada para determinar possível efeito citotóxico que esteja relacionado com danos direto à membrana celular. A figura 3. apresenta o resultado de toxicidade do muco frente a eritrócitos humano. A atividade hemolítica do muco testado nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL teve resultado de 0,0; 0,14 e 0,45 % respectivamente, no qual não apresentaram diferenças estatísticas comparando as concentrações entre si.

O veneno da medusa *Chysaora sp.* foi analisado quanto a capacidade de causar hemólise e apresentou 20 % de hemólise em eritrócitos humanos na concentração de 22 µg/mL (Becerra-Amezcu et al., 2016). De acordo com atividade hemolítica do muco, inferior a 1% em concentrações mais altas, concluímos que o muco não apresenta capacidade de causar hemólise em eritrócitos humanos.

Alencar (2015) realizou testes de hemólise em diferentes extratos do *Palythoa caribaeorum*. Conclui-se na sua análise que os extratos (etanólico, diclorometano, acetato de etila, aquoso do *P. caribaeorum*) apresentaram baixo potencial hemolítico, inferior a 10%. Apenas na concentração de 100 µg/mL o extrato bruto e o extrato com diclorometano aumentaram consideravelmente seu potencial de hemólise. Comparando com nossos resultados, isso nos indica que o *Palythoa* possui componentes que causam hemólise, mas o muco que ele produz, testado isoladamente, não apresenta capacidade hemolítica. Ainda deve-se destacar que esse é o primeiro estudo que propôs testar a capacidade hemolítica do muco.

Esse teste foi feito principalmente para descartar a hipótese de que o muco possui atividade citotóxica contra as hemácias, pois se assim fosse, ele não poderia ser útil em preparações farmacológicas segundo Jandú (2013). Uma vez que

compostos que possui importante atividade antimicrobiana e antioxidante não pode ser utilizado na composição de medicamentos de uso terapêutico (Jandú et al., 2013). Portanto, o muco pode ser utilizado em preparações farmacológicas, uma vez que ele não apresenta atividade hemolítica.

3.5. Determinação do perfil proteômico

3.5.1. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas realizada através do 2-D Quant Kit (GE Healthcare ®) apresentou um rendimento de 0,57%. Em 400 mg do muco contém aproximadamente 2,28 mg de proteínas totais.

3.5.2. Eletroforese 2D

O perfil proteico do muco foi traçado através da Eletroforese 2D e corado com Comassie Blue conforme figura 5. A análise do Software ImageMaster 2D Platinum identificou 76 spots, sendo 79 % proteínas básicas (figura 4 A). Dentre os spots visualizados, 24% se comportam como proteínas básicas com pI entre 7 – 9. Enquanto que, 23 % dos spots representaram proteínas ácidas (pI-6) (Figura 4 B).

Ao avaliar o parâmetro peso molecular (PM), 34 % dos spots refere-se à proteínas de peso molecular na faixa de 10 – 20 KDa; 26 % dos spots em proteínas de 30 - 40 Kda, 9 % 40-60 e 8 % em proteínas de 80 - 100 KDa (Figura 4 C).

3.5.3. Análise de Espectrometria de Massa

Estudo em MALDI –TOF identificou 14 proteínas pelo banco de dados MASCOT (Matrix Biosciences) conforme a Tabela 3. Foi utilizado o grupo Metazoa para a identificação, no qual se encaixa o *Palythoa*. Ainda na Tabela 3 estão descritas as principais funções das proteínas identificadas.

O spot 8 (figura 5), identificada como glutamyl-tRNA synthetase. Uma descoberta recente demonstra seu envolvimento no mecanismo de resistência a biocidas por bactérias probióticas como o *Lactobacillus pentosus* (Muñoz et al., 2016) (Tabela 3). Isso sugere que a presença dela no muco possa estar envolvida no processo de resistência ao estresse oxidativo que os corais vêm enfrentando

devido aos efeitos das alterações climáticas, como o aumento da temperatura nos mares (Voolstra et al., 2011).

Uma proteína importante identificada Zinc finger protein 654, correspondente ao spot 71 (figura 5) é envolvida com a destruição de células tumorais, como explicado na tabela 3. Portanto, sugere-se que ela esteja participando do processo de inibição celular que o extrato proteico do muco apresentou, no corrente estudo, frente às células MCF-7, S-180 e J774. Não há relatos da sua função para o *Palythoa caribaeorum*, porém ela pode ser responsável pelo mecanismo de defesa, na destruição de microrganismos patogênicos.

Outra proteína identificada como Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like corresponde ao spot 56 (figura 5), também pode estar envolvida na morte de células tumorais (tabela 3). Esta é uma proteína de defesa imune inata expressa nos pulmões de recém-nascidos prematuros e adultos e que, cujo gene, vem sendo mencionado como um candidato a supressor de tumor, contra câncer de cérebro, pulmão e trato digestivo (Mollenhauer, et al., 2001). Em relação aos corais, sugere que esta proteína tenha envolvimento na defesa contra patógenos.

Hypothetical protein NECAME_18605 e Hypothetical protein PFICI_09699 corresponde ao spot 76 e 14 respectivamente (Figura 5), são proteínas hipotéticas (SPH) conhecidas como proteínas cuja estrutura é desconhecida (Tan et al., 2014). Não foram encontrados na literatura função dessas proteínas.

As proteasomas, também encontrada no muco, correspondente ao spot 32 (Figura 5), desempenham funções importantes e vitais para os seres vivos (tabela 3), por isso pode tornar-se uma estratégia terapêutica.

Beta-2-microglobulin (B2M), correspondente ao spot 61 (Figura 5). A sua presença no muco tem função desconhecida, mas pode ser utilizada na indução de apoptose de células tumorais (Yang et al., 2006). Outra proteína, Uroporphyrinogen-III synthase (URO-sintase III) correspondente ao spot 34 (Figura 5), também não tem função conhecida para o *Palythoa*, mas possivelmente sua função está envolvida em manter o funcionamento normal do *Palythoa*, assim como em humanos (tabela 3).

A identificação do spot 33 (Figura 5) corresponde a PAS domain S-box, encontrado em diversas espécies, como mamíferos, insetos, plantas, fungos e cianobactérias. Pela sua função descrita na tabela 3. ela deve estar associada à

proteção do *Palythoa* contra os raios UV, que o muco juntamente com as zooxantelas garante durante a maré baixa ([Lesser et al., 1989](#)).

A metalloproteinase-disintegrin, correspondente ao spot 65 (Figura 5) faz parte dos componentes da matriz extracelular, participando do processo de lesão do tecido (tabela 3). Sua função para o *Palythoa* é a mesma, regeneração tecidual em resposta ao pisoteio que essa espécie vem enfrentando com visitas turísticas, como as que acontecem em Porto de Galinha. Concordando ainda com os resultados obtidos nesse estudo, em que o EP aumentou a proliferação de fibroblastos.

O spot 70 (Figura 5) foi identificada como Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10, mas não há relatos de sua função para *Palythoa*.

Ainda foi identificada a proteína deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2 correspondente ao spot 73 (Figura 5). Não há relatos da função desta proteína no muco, mas como ela está envolvida no fator de restrição do vírus HIV ([Franzolin et al., 2015](#)), ela tem potencial para a utilização terapêutica contra o vírus HIV.

A Proteína Lin-52 e a Killer, correspondentes ao spot 60 e 66 respectivamente (Figura 5) tem funções envolvidas na morte celular (tabela 3). A presença delas no muco pode estar associada à defesa do *Playthoa* contra patógenos. Até o momento a função de proteção era dada apenas ao muco íntegro ([Soares et al., 2006](#)). Porém a descoberta destas proteínas, prova sua relação direta a esta função. Sugerindo ainda, participação na inibição bacteriana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Ademais, esta proteína pode ter provocado a morte celular das células MCF-7, S-180 e J774 (figura 1 A, C e D) pelo bloqueio dos canais de cálcio.

4. Conclusões

Pode-se concluir que o extrato proteico apresenta-se como forte candidato para atuar contra infecções intracelulares, como tuberculose, além de grande potencial de inibição contra células tumorais. Em contrapartida, o muco não

apresentou citotoxicidade em nenhuma das células testadas, mas apresentou moderada atividade antioxidante.

A ação antimicrobiana do EP sugere a participação das Proteínas Killer, Zinc Finger Protein 654, Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like, LIN-52, Killer protein, garantindo proteção ao *Palythoa* contra patógenos. Essa proteção era conferida apenas ao muco, mas com a descoberta das proteínas, conferimos a ela esta função.

Diante do exposto, podemos afirmar que as proteínas presentes no muco se comportam com grande potencial para o uso terapêutico, com especificidade em relação aos compostos sintéticos. Vale averiguar a capacidade individual de cada proteína, sugerindo o isolamento e testes biológicos.

5. Referências

- Akindele, A.J., Wani, Z., Mahajan, G., Sharma, S., Aigbe, F.R., Satti, N., Adeyemi, O.O., Mondhe, D.M., 2015. Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl.(Aristolochiaceae). *Journal of traditional and complementary medicine*. 5, 35-41.
- Alencar, D.B., Melo, A.A., Silva, G.S., Rebeca, L., Lima, R.L., Pires-Cavalcante, K.M.S., Carneiro, R.F., Rabelo, A.S., Sousa, O.V., Vieira, R.H.S.F., Viana, F. A., Sampaio, A. H., Saker-Sampaio, S., 2015 Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87, 1113-1123.
- Almeida, J.G.L., Maia, A.I.V., Wilke, D.V., Silveira, E.R., Braz-Filho, R., Clair, J.J.L., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, O.D.L., 2012. Palyosulfonoceramides A and B: Unique Sulfonlated Ceramides from the Brazilian Zoanthids *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*. *Marine Drugs*. 10, 2846-2860.
- Beaulieu, L., Bondu, S., Doiron, K., Rioux, L.E., Turgeon, S.L., 2015 Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicuris* and identification of peptides implied in bioactivity. *Journal of Functional Foods*. 17, 685 - 697.
- Bhaskar, P.K., Mukherjee, A., Mutsuddi, M., 2012. Dynamic pattern of expression of dlin52, a member of the Myb/MuvB complex, during *Drosophila* development. *Gene Expression Patterns*. 12, 77-84.

- Bishop, D.F., Schneider-Yin, X., Clavero, S., Yoo, H.W., Minder, E.I., Desnick, R.J., 2010. Congenital erythropoietic porphyria: a novel uroporphyrinogen III synthase branchpoint mutation reveals underlying wild-type alternatively spliced transcripts. *Blood*. 115, 1062–1069.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., Prinsep, M.R., 2014. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 30, 237- 323.
- Cai, Z., Li, W., Wang, H., Yan, W., Zhou, Y., Wang, G., Cui, J., Wang, F., 2012. Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. *Carbohydrate polymers*. 90, 296-300.
- Chen, Y., Yang, W., Chang, B., Hu, H., Fang, X., Sha, X., 2013. In vivo distribution and antitumor activity of doxorubicin-loaded N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid coated mesoporous silica nanoparticles and safety evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 85, 406-412.
- Farah, C., Levicán, G., Ibba, M., Orellana, O., 2014. Effect of Hydrogen Peroxide on the Biosynthesis of Heme and Proteins: Potential Implications for the Partitioning of Glu-tRNA^{Glu} between These Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 15, 23011-23023.
- Franzolin, E., Salata, C., Bianchi, V., Rampazzo, C., 2015. The Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase Activity of SAMHD1 Protein Contributes to the Mitochondrial DNA Depletion Associated with Genetic Deficiency of Deoxyguanosine Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 290, 25986-25996.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C., Rice, G.I., Christodoulou, E., ... and De Carvalho, L.P.S., 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*. 480, 379-382.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M., Gray, M.C., 2006. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP!. *Molecular Microbiology*. 59, 447–459.
- Huang, L., and Chen, C.H., 2009. Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr Med Chem*. 16, 931–939.
- Huang, L., and Chen, C.H., 2009. Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr Med Chem*. 16, 931–939.
- Jandú J.J.B., Silva, L.C.N., Pereira, A.P.C., Souza, R.M., Júnior, C.A.S., Figueiredo, R.C.B.Q., Araújo, J.M., Correia, M.T.S., Silva, M.V., 2013. *Myracrodruon*

- urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. Journal of Medicinal Plants Research. 7, 413-418.
- Kim, J.H., Lee, J.S., Lee, K.R., Shim, M.J., Lee, M.W., Shin, P.G., Cheong, J.C., Yoo, Y.B., Lee, T.S., 2012 Immunomodulating and Antitumor Activities of *Panellus serotinus* Polysaccharides. Mycobiology. 40,181-188.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature. 227, 680-685.
- Lesser, M.P., and Shick, J., 1989. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxantellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoadaptation and enzymic defenses against oxygen toxicity. Mar. Biol. 102, 243-255.
- Lima, L.A., Migliolo, L., Castro, C.B., Débora, D.O., Abarategui, C.L., Gonçalves, E. F., Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A., Otero-Gonzalez, A.J., Franco, O.L. and Dias, S.D., 2013. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Brazilian Coast Coral *Phyllogorgia dilatata*. Protein & Peptide Letters. 20, 1153-1158.
- Lira, M.C.B., Siqueira-Moura, M.P., Rolim-Santos, H.M.L., Galetti, F.C.S., Simioni, A.R., Santos, N.P., Tabosa, D.O., Egito, E.S., Silva, C.L., Tedesco, A.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. Journal of Liposome Research. 19, 49–58.
- Magliani, W., Conti, S., Travassos, L.R., Polonelli, L., 2008. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. FEMS microbiology letters. 288, 1-8.
- Mollenhauer, J., Herbertz, S., Helmke, B., Kollender, G., Krebs, I., Madsen, J., Holmskov, U., Sorger, K., Schmitt, L., Wiemann, S., Otto, H.F., Grone, H.J., Annemarie Poustka, A., 2011. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. Cancer research. 61, 8880-8886.
- Mollenhauer, J., Herbertz, S., Helmke, B., Kollender, G., Krebs, I., Madsen, J., Holmskov, U., Sorger, K., Schmitt, L., Wiemann, S., Otto, H.F., Grone, H.J., Annemarie, Poustka A., 2001. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. Cancer research. 61, 8880-8886.
- Mossman T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity. Journal Immunology Methods. 65, 55-63.

- Muehlenbein, N., Hofmann, S., Rothbauer, U., Bauer, M.F., 2004. Organization and function of the small Tim complexes acting along the import pathway of metabolite carriers into mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 13540-13546.
- Muñoz, M.C.C., Benomar, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Lerma, L.L., Knapp, C.W., Gálvez, A., Abriouel, H., 2016. Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 222, 8–15.
- Na, K., Lee, E.S., Bae, Y.H., 2007. Self-organized nanogels responding to tumor extracellular pH: pH-dependent drug release and in vitro cytotoxicity against MCF-7 cells. *Bioconjugate chemistry*. 18, 1568-1574.
- Ochoa-Méndez, Celma Estefania, Lara-Hernandez, Ignacio, Gonzalez, Luzmila Martinez, Aguirre-Banuelos, Patricia, Ibarra-Barajas, Maximiliano, Castro-Moreno, Patricia, Gonzalez-Ortega, Omar, Soria-Guerra, Ruth Elena, 2016. Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.11.001>.
- Oliveira, C.P.D., Rodrigues, L.M.R., Fregni, M.V.V.D., Gotfryd, A., Made, A.M., Pinhal, M.A.D.S. Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. *Acta ortopedica brasileira* 2013; 21: 144-149.
- Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K.H., Sonawane, A., 2014. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: current status and future prospects. *Tuberculosis*. 94, 363-373.
- Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., Getzoff, E.D., 1998. Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 5884-5890.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., ... & Piot, J.M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*. 41, 1217-1222.
- Quintana, J., Brango-Vanegas, J., Costa, G.M., Castellanos, L.E., Arévalo, C., Duque, C., 2015. Marine organisms as source of extracts to disrupt bacterial communication: bioguided isolation and identification of quorum sensing inhibitors from *Ircinia felix*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

- Ramos, R., Silva, J.P., Rodrigues, A.C., Costa, R., Guardão, L., Schmittb, F., Soares, R., Vilanova, M., Dominguesa, L., Gama, M., 2011. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides*. 32, 1469–1476.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231–1237.
- Robinson, S.D., Li, Q., Bandyopadhyay, P.K., Gajewiak, J., Yandell, M., Papenfuss, A.T., Purcell, A.W., Norton, R.S., Hemami, H.S., 2015. Hormone-like peptides in the venoms of marine cone snails. *General and Comparative Endocrinology*. xx, xxx-xxx.
- Samy, R.P., Thwin, M.M., Stiles, B.G., Satyanarayana-Jois, S., Chinnathambi, A., Zayed, M., Alharbi, S.A., Siveen, K.S., Sikka, S., Kumar, A.P., Sethi, G., Lim, L.H.K., 2015. Novel phospholipase A2 inhibitors from python serum are potent peptide antibiotics. *Biochimie*. 111, 30-44.
- Santos, N.P., Nascimento, S.C., Silva, J.F., Pereira, E.C.G., Silva, N.H., Honda, N.K., Santos-Magalhães, N.S., 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of drug delivery science and technology*. 15, 355-361.
- Schmitt, M.J. and Breinig, F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Micro*. 4, 212-221.
- Sila, A., Hedhili, K., Przybylski, R., Ellouz-Chaabouni, S., Dhulster, P., Ali, B.A., Nedjar-Arroume, N., 2014. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. *journal of functional foods*. 11, 322–329.
- Soares, C.L.S., Pérez, C.D., Maia, M.B.S., Silva, R.S., Melo, L.F.A., 2006. Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16, 463-468.
- Suarez-Jimenez, G.M., Burgos-Hernandez, A., Ezquerro-Brauer, J. M., 2012. Bioactive Peptides and Dipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. *Marine Drugs*. 10, 963-986.
- Tan, S.O., Normi, Y.M., Leow, A.T.C., Salleh, A.B., Karjiban, R.A., Murad, A.M.A., Mahadi, N.M., Rahman, M.B.A., 2014. A Sco protein among the hypothetical proteins of *Bacillus lehensis* G1: Its 3D macromolecular structure and association with Cytochrome C Oxidase. *BMC Structural Biology*. 14:11.

- Thetsrimuang, C., Khammuang, S., Chiablaem, K., Srisomsap, C., Sarnthima, R., 2011. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. Food Chemistry. 128, 634–639.
- Vizetto-Duarte, C., Custódio, L., Acosta, G., Lago, J.H., Morais, T.R., Sousa, C.B., ... and Vasconcelos, M.H., 2015. Can macroalgae provide promising anti-tumoral compounds? A closer look at *Cystoseira tamariscifolia* as a source for antioxidant and anti-hepatocarcinoma compounds. PeerJ PrePrints. (No. e1907).
- Voolstra, C.R., Sunagawa, S., Matz, M.V., Bayer, T., Aranda, M., Buschiazzi, E., ... and Medina, M., 2011. Rapid evolution of coral proteins responsible for interaction with the environment. PloS one. 6(5), e20392.
- Wang, L., Pei, Z., Tian, Y., He, C., 2005. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. Molecular Plant-Microbe Interactions. 18,375-384.
- Yang, J., Qian, J., Wezeman, M., Wang, S., Lin, P., Wang, M., ... and Yi, Q., 2006. Targeting β 2-microglobulin for induction of tumor apoptosis in human hematological malignancies. Cancer cell. 10, 295-307.
- Yeung, C.K., Wong, K.L., Wong, W.S., Chan, K.H., 1996. beta 2-Microglobulin and systemic lupus erythematosus. The Journal of rheumatology. 13, 1053-1058.
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R., 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. Trends in biochemical sciences. 22, 331-333.

Legenda das figuras

Figura 1. Viabilidade celular do muco e do extrato proteico do muco frente ao tumor ascítico S-180 (A), Hela (B), MCF7 (C), J774 (D) e CCD1072 Sk (E). ■ Extrato proteico; ▤ Muco. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. $P < 0,05$.

Figura 2. Atividade de eliminação do radical ABTS.+ (%) do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* nas concentrações de 100 e 200 mg/mL, em tempos de 6, 15, 30, 45, 60 e 120 min. utilizando trolox como padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de *Tukey*. * $P < 0,05$.

Figura 3. Atividade hemolítica do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* em diferentes concentrações (500, 250 e 125 µg/mL). Foi utilizado o teste *Tukey* para comparar as médias, mas não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações. $P < 0,05$.

Figura 4. Dados dos spots gel SDS-PAGE (12,5%) identificados a partir do Software ImageMaster 2D Platinum Versão 7.0. (A) Classificação das proteínas; (B) Ponto isoelétrico; (C) Peso molecular (KDa).

Figura 5. Perfil proteômico do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* analisado por Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE (12,5%) corado com Comassie Blue. Tiras de IPG (3-10) linear, 13cm, foram usadas para focalização isoelétrica.

Fig. 1

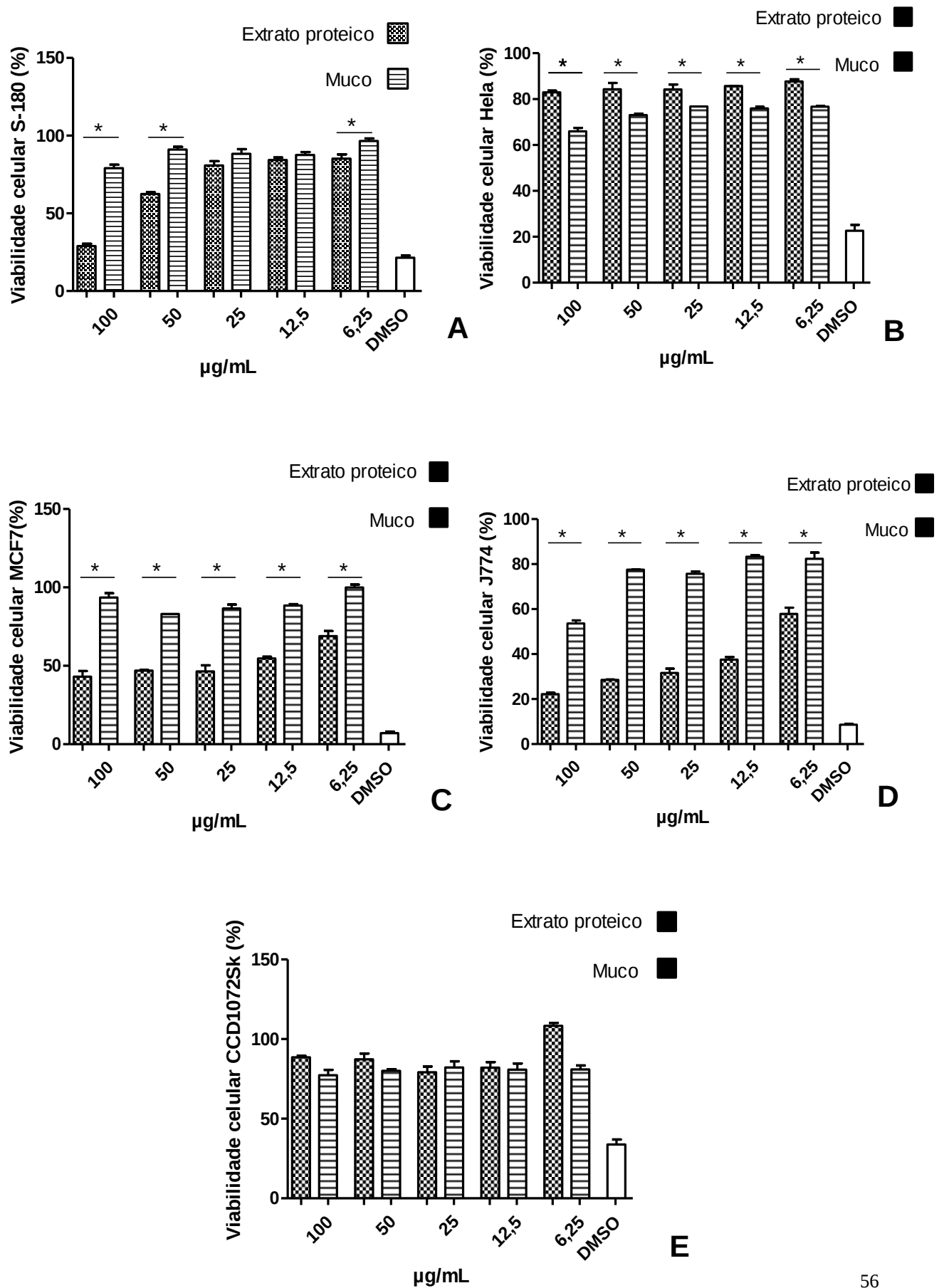


Fig. 2

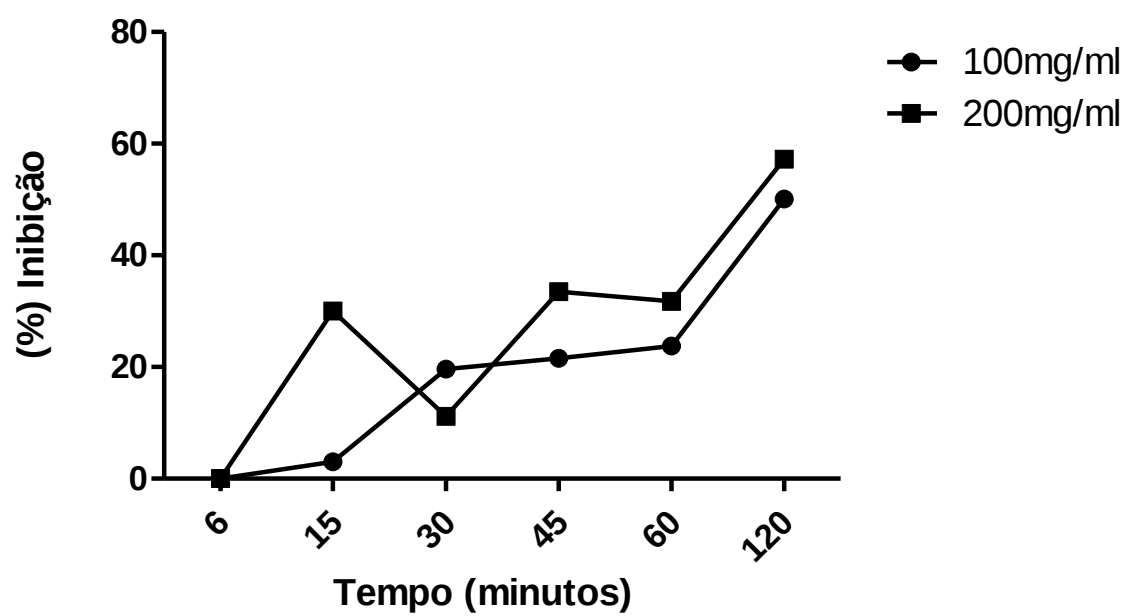


Fig. 3

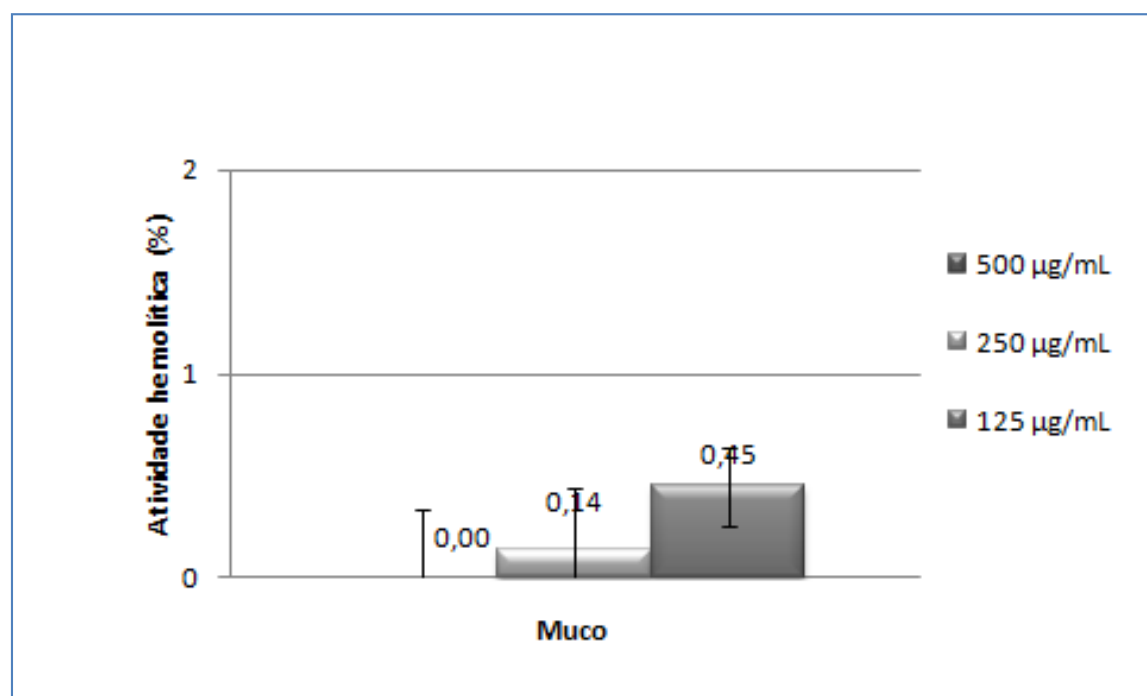


Fig. 4

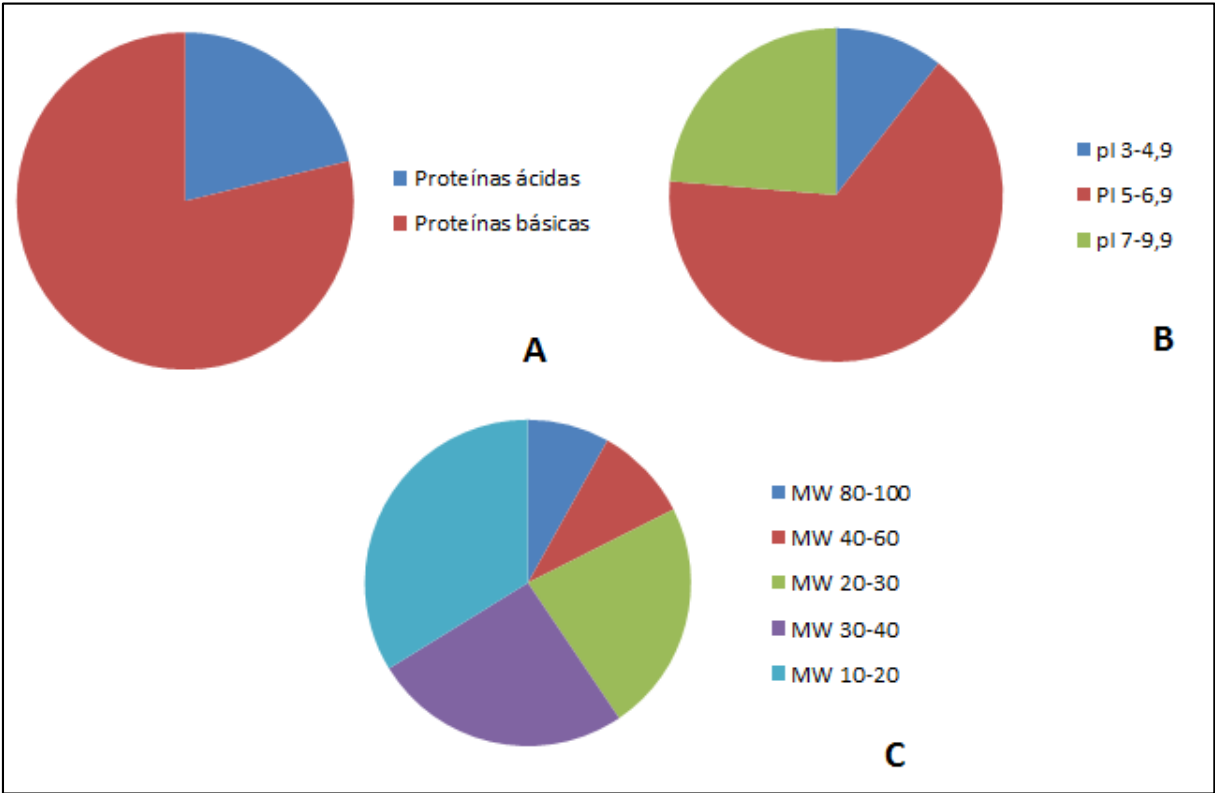


Fig. 5

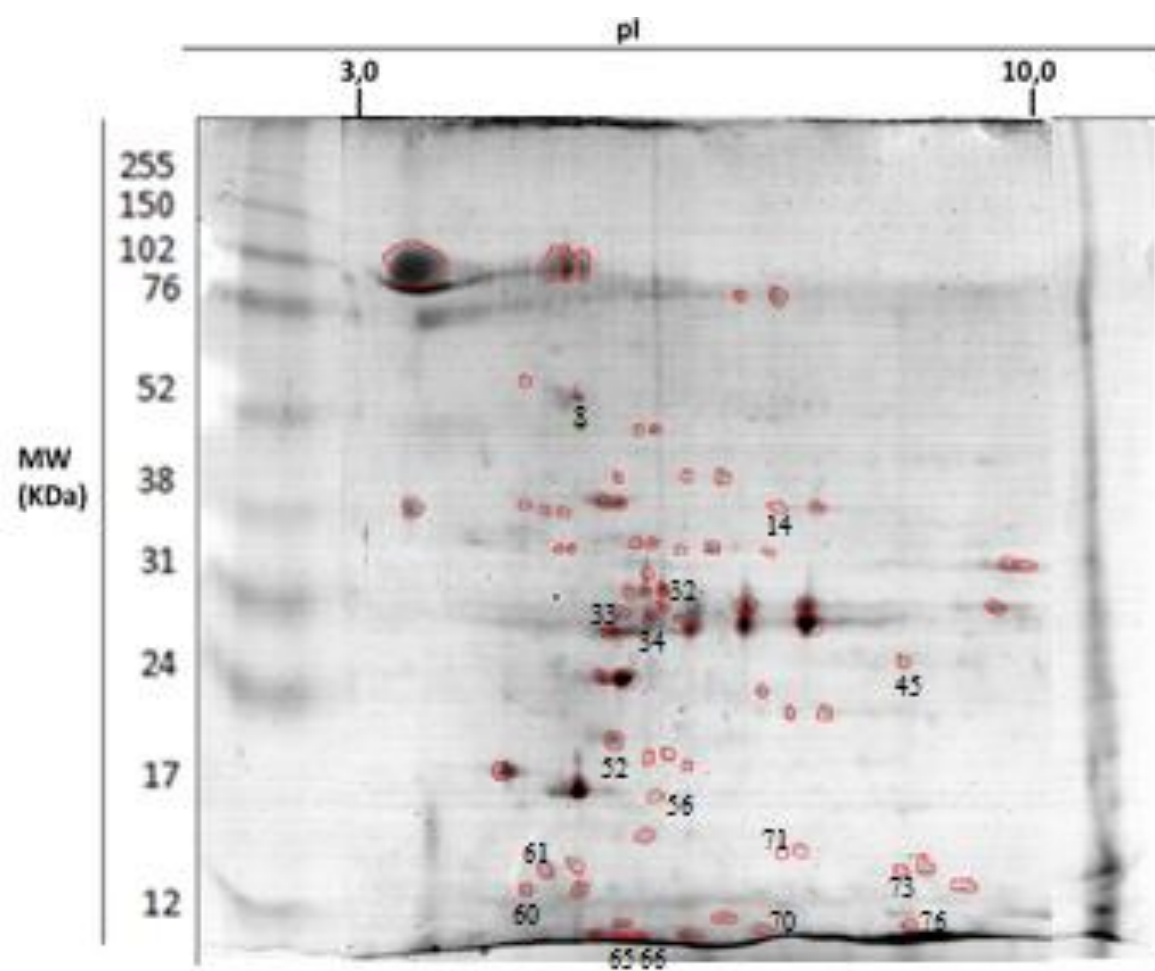


Tabela 1. Valores de IC₅₀ em células S-180, Hela, MCF7, J774 e CCD1072Sk após 48 horas de exposição ao muco produzido pelo *P. caribaeorum* e o seu extrato proteico.

IC ₅₀ µg/mL		
	Muco	Extrato proteico
S-180	>100	51,67 ± 3.73 *
HELA	>100	>100
MCF-7	> 100	54,94 ± 4,1 *
J774	>100	6,9±2,24 *
CCD1072Sk	>100	>100

***P < 0,05, comparado com o muco**

Tabela 2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) µg/mL do muco e do seu extrato proteico. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Microrganismos	Gram	CMI (Muco)	CMI (Extrato proteico)	CBM (Extrato proteico)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC® 19606	-	NI	NT	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	-	NI	250	>250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603	-	NT	250	>250
<i>Shigella</i> ATCC® 12022	-	NI	NT	-
<i>Salmonella</i> ATCC® 14028	-	NI	NT	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC® 13047	-	NI	NT	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	-	NI	NT	-
MRSA feridas	+	NI	NT	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> cepa clínica	+	NI	NT	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	+	NI	250	>250
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC® 934	+	NI	NT	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	NT	250	>250

*NI: Não ocorreu inibição; NT: Não testado

Tabela 3. Lista de proteínas identificadas pelo MASCOT e expressadas no muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* contra a base de dados de proteínas do NCBI e SWISSProt. Espécies e funções de cada proteína.

ID	Spot	Protein	Coverage	pI _{TE}	MW _{TE}	pI _{ENC}	MW _{ENC}	Species	Functions
319435166	8	glutamyl-tRNA synthetase	58%	5	55,23	5,25	56	<i>Dietzia cinnamea</i>	Catalisar uma ligação de um aminoácido para a molécula de tRNA (Farah et al., 2014).
630028390	14	Hypothetical protein PFIC1_09699	45%	6,18	9,52	7,12	39	<i>Pestalotiopsis fici</i>	Desconhecida
697511537	32	Proteasome subunit aloha type-1	48%	6,08	30,353	6,05	31	<i>Fulmarus glacialis</i>	Participa da regulação ciclo celular, diferenciação, respostas inflamatórias, vias de transdução de sinal, apoptose (Huang and Chen, 2009)
464316105	33	PAS domain S-box protein, parcial	48%	4,9	30,069	5,68	29	<i>Leptospira interrogans serovar</i>	Funciona como sensores a estímulos luminosos (Zhulin et al., 1997); Tem função na detecção e transdução de sinal (Pellequer et al., 1998);
768927828	34	Uroporphyrinogen-III synthase	47%	5,33	30,087	5,92	29	<i>Bacillus subtilis</i>	Está envolvida na conversão de hidroximetilo em bilane uroporfirinogênio III. A sua deficiência, em humanos, causa uma doença autossômica recessiva, Porfíria Eritropoiética Congênita (PEC) (Bishop et al., 2010).
637279932	56	Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like	81%	5,16	15,122	5,97	17	<i>Anolis carolinensis</i>	Tumor supressor (Mollenhauer et al., 2001)
LIN-51_TETNG	60	protein lin-52 homolog	35%	4,53	12,637	4,77	12	<i>tetraodon nigroviridis</i>	Participa de um complexo de proteína grande com importantes reguladores transcricionais de proliferação e morte celular (Bhaskar et al., 2012).
B2MG-CHICK	61	Beta-2-microglobulin	27%	5,84	13,148	4,96	13	<i>Gallus gallus</i>	Está associada a doenças inflamatórias e hematológicas (Yeung et al., 1996)
VM3B4-BOTSA	65	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-4 (fragment)	28%	5,36	11,436	5,65	10	<i>Bothrops jararaca</i>	Participa da remodelação tecidual (Oliveira et al., 2013)
659870098	66	Killer protein	85%	6.73	10,8	5,83	10	<i>Caulobacter sp.</i>	Causam a morte celular pelo bloqueio de canais de cálcio (Schmitt e Breinig, 2006). Conferir resistência a infecções fúngicas (Magliani et al., 2008).
543371659	70	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10	54%	5,9	10,638	6,97	10	<i>Pseudopodoces humilis</i>	Participa da importação e inserção de proteínas transmembranas na membrana interna da mitocôndria. Atua como uma proteína semelhante à chaperona que protege os precursores hidrofóbicos e os guia através do espaço intermembranar mitocondrial (Muehlenbein et al., 2004).
831563256	71	Zinc finger protein 654	13%	7,12	15,05	7,16	14	<i>Fundulus heteroditus</i>	Regula a morte celular programada (Wang et al., 2005);
657576201	73	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-LIKE isoform X2	60%	7,71	14,995	8,27	13	<i>Stegastes partitus</i>	Bloqueia a replicação do vírus em estágio inicial. E ainda é altamente expressa em células dentríticas (Goldstone et al., 2011);
915245772	76	Hypothetical protein NECAME_18605	78%	9,91	11,658	8,37	11	<i>Necator americanus</i>	Desconhecida

PM= peso molecular (KDa); TE= Teórico; ENC= Encontrado

ANEXO (NORMAS DA REVISTA)

Introdução

O *Journal of Biotechnology* fornece um meio para a rápida publicação de artigos completos e breves comunicações sobre aspectos inovadores e inovadores da biotecnologia. A Revista aceitará trabalhos que vão desde as posições de genética ou biologia molecular até aqueles que abrangem aspectos de engenharia bioquímica, química ou de bioprocessos, bem como a aplicação por computador de novos conceitos de software, desde que em cada caso o material seja diretamente relevante para sistemas biotecnológicos. **Os trabalhos que apresentam informações de natureza multidisciplinar, que não seriam adequadas para publicação em uma revista dedicada a uma única disciplina, são particularmente bem-vindos**. As seguintes áreas são abordadas no Diário:

Tipos de papel

(1) Papéis de corpo inteiro, geralmente não excedendo 15 páginas dactilografadas. Os artigos completos devem: (a) ser divididos em seções (Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão); (B) conter um resumo, não superior a 200 palavras, no início do trabalho, seguido por 3-6 palavras-chave; (C) não exceder 10-12 páginas impressas (aproximadamente 15 páginas dactilografadas), incluindo o espaço necessário para as figuras.

(2) Comunicações curtas, não superior a 1500 palavras ou espaço equivalente, incluindo figuras e tabelas. Estes devem ser breves relatórios definitivos e não conclusões preliminares. As comunicações curtas não precisam ser divididas em Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, em vez disso, Materiais e Métodos podem ser descritos no texto ou, se apropriado, em lendas de figuras ou notas de rodapé de tabela.

(3) Os comentários serão publicados após convite dos Editores ou sugestão de autores.

(4) As comunicações de genoma curtas são um tipo especial de comunicação curta, descrevendo a sequência genômica completamente montada e anotada de um organismo biotecnologicamente relevante na base de dados correspondente (para eucariotas, genomas de rascunho avançados também serão considerados) e avalia genes identificados com genes especiais Impacto nas propriedades biotecnológicas. Devem ser preparados da mesma forma que as Comunicações Curtas (ver 2) e conter, para além dos dados biotecnológicos mais relevantes, um quadro que resume as principais características do genoma abordado e o (s) número (s) de acesso da sequência de nucleótidos. Os dados da sequência têm de ser depositados no GenBank do NCBI, ***Ou a biblioteca de dados EMBL e tornado publicamente acessível antes da submissão do manuscrito.***

(5) Questões especiais sobre aspectos destacados da biotecnologia também são publicadas. Questões Especiais podem conter contribuições selecionadas (conferências convidadas) de conferências internacionais, ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e podem ser compostas de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas. Os Editores Convidados responsáveis pela organização de Questões Especiais serão convidados pelos Editores da Revista, mas também podem ser sugeridos por cientistas que estão dispostos a organizar um número especial sobre um tema que merece ser publicado.

(6) As cartas ao Editor e os anúncios de reuniões e cursos serão incluídos a critério dos Editores e do Editor. (5) Questões especiais sobre aspectos destacados da biotecnologia também são publicadas. Questões Especiais podem conter contribuições selecionadas (conferências convidadas) de conferências internacionais, ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e podem ser compostas de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas. Os Editores Convidados responsáveis pela organização de Questões Especiais serão convidados pelos Editores da Revista, mas também podem ser sugeridos por cientistas que estão dispostos a organizar um número especial sobre um tema que merece ser publicado. (6) As cartas ao Editor e os anúncios de reuniões e cursos serão incluídos a critério dos Editores e do Editor. (5) Questões especiais sobre aspectos destacados da biotecnologia também são publicadas. Questões Especiais podem conter contribuições selecionadas (conferências convidadas) de conferências internacionais, ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e podem ser compostas de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas. Os Editores Convidados responsáveis pela organização de Questões Especiais serão convidados pelos Editores da Revista, mas também podem ser sugeridos por cientistas que estão dispostos a organizar um número especial sobre um tema que merece ser publicado. (6) As cartas ao Editor e os anúncios de reuniões e cursos serão incluídos a critério dos Editores e do Editor. ***Ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e pode ser composto de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas. Os Editores Convidados responsáveis pela organização de Questões Especiais serão convidados pelos Editores da Revista, mas também podem ser sugeridos por cientistas que estão dispostos a organizar um número especial sobre um tema que merece ser publicado.*** (6) As cartas ao Editor e os anúncios de reuniões e cursos serão incluídos a critério dos Editores e do Editor. ***Ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e pode ser composto de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas. Os Editores Convidados responsáveis pela organização de Questões Especiais serão convidados pelos Editores da Revista, mas também podem ser sugeridos por cientistas que estão dispostos a organizar um número especial sobre um tema que merece ser publicado.*** (6) As cartas ao Editor e os anúncios de reuniões e cursos serão incluídos a critério dos Editores e do Editor.

Estrutura do artigo

Subdivisão- seções numerada

Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas 1.1 (em seguida, 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da seção). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não se refira apenas ao "texto". Qualquer subseção pode receber um breve cabeçalho. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Exponha os objetivos do trabalho e forneça uma base adequada, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

Material e métodos

Fornecer detalhes suficientes para permitir a reprodução do trabalho, com detalhes do fornecedor e número de catálogo, quando apropriado. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas devem ser descritas modificações relevantes.

Teoria / cálculo

Uma seção de Teoria deve estender, não repetir, o fundo para o artigo já tratado na Introdução e lançar as bases para trabalhos futuros. Em contraste, uma seção de Cálculo representa um desenvolvimento prático a partir de uma base teórica.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Isso deve explorar a importância dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão é freqüentemente apropriada. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de rosto

- **Título.** Concisa e informativo. Os títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- **Nomes de autores e afiliações.** Indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão devidamente escritos. Apresentar os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra de sobrescrito em minúscula imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- **Autor correspondente.** Indicar claramente quem vai lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Certifique-se de que o endereço de e-mail é dado e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.
- **Endereço atual / permanente.** Se um autor se deslocou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome do autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser

mantido como o principal endereço de afiliação. Números arábicos sobrescritos são usados para tais notas de rodapé. Certifique-se de que o endereço de e-mail é dado e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.

Resumo

É necessário um **resumo** conciso e factual. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e principais conclusões. Um resumo é muitas vezes apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as referências devem ser evitadas, mas se essencial, em seguida, citar o autor (es) e ano (s). Além disso, devem ser evitadas abreviaturas não padronizadas ou incomuns, mas, se essenciais, devem ser definidas na primeira menção no resumo.

Resumo gráfico

Embora um resumo gráfico seja opcional, seu uso é encorajado, pois atrai mais atenção para o artigo on-line. O resumo gráfico deve resumir o conteúdo do artigo de forma concisa, pictórica, destinada a captar a atenção de um amplo leitor. Os resumos gráficos devem ser apresentados como um arquivo separado no sistema de envio on-line. Tamanho da imagem: Forneça uma imagem com um mínimo de 531 × 1328 pixels (h × w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5 × 13 cm usando uma resolução de tela normal de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office. Você pode ver Exemplo Graphical Abstracts no nosso site de informações. Os autores podem fazer uso de Elsevier '

Destaques Os

destaques são obrigatórios para esta revista. Eles consistem em uma pequena coleção de pontos que transmitem as principais conclusões do artigo e deve ser apresentado em um arquivo editável em separado no sistema de apresentação on-line. Por favor, use 'Destaques' no nome do arquivo e incluir 3 a 5 pontos (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por ponto). Você pode ver exemplos de destaques em nosso site de informações.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, fornecer um máximo de 6 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Ser poupador com abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

Compostos químicos

Você pode **enriquecer** seu artigo, fornecendo uma lista de compostos químicos estudados no artigo. A lista de compostos será usada para extrair informações

relevantes do banco de dados NCBI PubChem Compound e exibi-lo ao lado da versão on-line do artigo no ScienceDirect. Você pode incluir até 10 nomes de compostos químicos no artigo. Para cada composto, forneça o CID PubChem do registo mais relevante como no exemplo seguinte: Ácido glutâmico (PubChem CID: 611). Por favor, posicione a lista de compostos imediatamente abaixo da seção "Palavras-chave". É altamente recomendável seguir a formatação exata do texto como no exemplo abaixo:

Compostos	químicos	estudados	neste	artigo	Etilenoglicol
(PubChem	CID:	174);	Plitidepsina	(PubChem	CID: 44152164);

Abreviaturas

Definir abreviaturas que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé para ser colocado na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas na sua primeira menção lá, assim como na nota de rodapé. Assegurar a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

Agradecimentos

Agrupe reconhecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e não, portanto, incluí-los na página de título, como uma nota de rodapé para o título ou de outra forma. Indique aqui os indivíduos que prestaram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecer ajuda na língua, escrever ajuda ou provar a leitura do artigo, etc.).

Formatação das fontes de financiamento

Liste as fontes de financiamento desta forma normalizada para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelo National Institutes of Health [conceder números xxxx, yyyy]; A Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; E os Institutos de Paz dos Estados Unidos [número de concessão aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subvenções e prêmios. Quando o financiamento provém de um subsídio em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu qualquer concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Notas

As **notas de** rodapé devem ser utilizadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto podem criar notas de rodapé no texto, e esse recurso pode ser usado. Caso contrário, indique a posição das notas de rodapé no texto e liste as notas de rodapé separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista Referência.

Manipulação de imagens

Embora seja aceito que os autores às vezes precisam manipular imagens para clareza, manipulação para fins de fraude ou fraude será visto como abuso ético científico e será tratado em conformidade. Para imagens gráficas, esta revista está aplicando a seguinte política: nenhum recurso específico dentro de uma imagem pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido. Ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cor são aceitáveis se e desde que não obscureçam ou eliminem qualquer informação presente no original. Os ajustes não-lineares (por exemplo, mudanças nas configurações de gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

Arte eletrônica

Pontos gerais

- **Certifique** -se de usar letras e tamanhos uniformes de sua arte original.
- Incorporar as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Aponte para usar as seguintes fontes nas suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Símbolo ou use fontes parecidas.
- Numere as ilustrações de acordo com a sua sequência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de arte.
- Fornecer legendas às ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas das dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Um [guia detalhado sobre obras de arte](#) eletrônicas está disponível.

Você é convidado a visitar este site; Alguns excertos das informações detalhadas são dadas aqui.