



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**PAPEL DE PROTEÍNAS PRESENTES NA TINTA LIBERADA PELA  
LESMA-DO-MAR *Aplysia dactylomela* RANG 1828 NOS  
MECANISMOS DE DEFESA DO ANIMAL**

VANESSA LÚCIA RODRIGUES NOGUEIRA

FORTALEZA - CE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**PAPEL DAS PROTEÍNAS DA TINTA LIBERADA PELA  
LESMA-DO-MAR *APLYSIA DACTYLOMELA* RANG 1828 NOS  
MECANISMOS DE DEFESA DO ANIMAL**

**VANESSA LÚCIA RODRIGUES NOGUEIRA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências  
Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar  
da Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de MESTRE.

**Orientadora: Profa. Dra. VÂNIA MARIA MACIEL MELO**

**FORTALEZA – CE**

**2005**

Esta dissertação foi submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Marinhas, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira

Dissertação Aprovada em:

---

Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Depto. de Biologia  
Universidade Federal do Ceará  
**Orientadora**

---

Dra. Valdirene Moreira Gomes  
Centro de Biotecnologia e Biotecnologia  
Universidade Estadual do Norte Fluminense-RJ  
**Examinadora**

---

Dra. Ana de Fátima F. U. de Carvalho  
Depto. de Biologia  
Universidade Federal do Ceará  
**Examinadora**

*À minha família*

*Wamberg, meus pais e meus irmãos  
que sempre estiveram do meu lado me  
apoando e torcendo por mim,*

*Dedico com carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Em especial, à minha orientadora, Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela orientação criteriosa, por seu entusiasmo, atenção, participação, paciência, carinho e amizade. E, principalmente, por me ensinar a fazer tudo com amor e dedicação.

À Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano de Carvalho, por estar sempre pronta a me ajudar e orientar. Pelo carinho e amizade e por aceitar participar da avaliação de minha dissertação.

À Profa. Suzana Cláudia Martins Silveira, pelo carinho, amizade e apoio em todos os momentos de minha graduação e realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Valdirene Moreira Gomes, da UENF, por ter me recebido com tanto carinho em sua casa e dedicação na realização dos trabalhos desenvolvidos no seu laboratório e, sobretudo, pela amizade.

À Profa. Dra. Maura Cunha, da UENF, por sua dedicação e bom humor em me ajudar a realizar os ensaios de microscopia.

Aos Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira e Dra. Ilka Maria Vasconcelos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, por estarem sempre prontos a me ajudar e a disponibilizar seus laboratórios para realização de alguns experimentos.

Ao Dr. Gandhi Rádis-Baptista pela colaboração das análises de eletroforese bidimensional.

À Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, do Departamento de Farmacologia da UFC, pelo auxílio e disponibilidade nos experimentos de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Helena Matthews Cascon, do Departamento de Biologia da UFC, por sempre estar disposta a me ajudar com algumas dúvidas ao longo do trabalho e pelas viagens de campo, para coletar amostras e, por ceder seus aquários para manutenção dos animais.

Aos professores do Departamento de Biologia, que contribuíram para minha formação acadêmico-científica.

Aos professores do Instituto de Ciências do Mar, pelos ensinamentos na área de Ciências Marinhas, que despertaram em mim uma grande paixão.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de pós-graduação e auxílio à pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia, Raphaela, Lidianne, Fernanda, Denise, Natasha, Sarinha, Gardênia, Samantha, Viviane, Durcileide, Simone, Tatiane, Alysson, Caio, Júlio, Genilton, e em especial a Tallitinha, que de alguma forma me ajudaram muito, pelo apoio e pela convivência agradável me dando forças durante todo meu trabalho.

Aos Colegas do laboratório de Fisiologia Animal, André, Nara, Jérсия, e em especial ao Davi, sempre dispostos a me ajudar nos experimentos com os animais.

Ao amigo Luis Ernesto que sempre me ajudou nas minhas dúvidas, apoio e nos experimentos com os exemplares da lesma e, por sua extrema contribuição para realização desse trabalho.

À Izabela, uma amiga que fiz na UENF quando estive lá e que disponibilizou todo seu tempo para me acompanhar nos experimentos realizados, com imensa boa vontade e simpatia.

Aos meus amigos do curso de biologia que sempre farão parte da minha vida, Lú, Raquel, Max, Beto, Daniel, Danise e Lorena pelos momentos de alegria e apoio durante esses anos.

Aos Colegas do mestrado Rossana, Taty, Odete, Aline, Ítalo, Gardenny, Cris, Renata, Renata Stock, Manuel, etc. que durante o curso foram sempre amigos e prestativos, e que de alguma forma tornaram o dia-a-dia menos árduo.

À Rivalda que sempre me deu apoio e amizade todos esses anos e sempre cuida de todos do laboratório com alegria e carinho.

Especialmente aos meus pais, Leonardo e Vera, que são o meu amparo, porto seguro, durante todos os anos da minha vida. Por terem feito de tudo para que eu trilhasse pelo melhor caminho. Aos meus irmãos, Leonardo e Valéria que sempre torcem por mim e pela nossa grande amizade. À minha sogra Bibia e cunhada, Maysinha, pela torcida e carinho sempre.

A Wamberg, meu amor e grande amigo, que sempre esteve do meu lado nos momentos difíceis, com carinho e alegria, e me ensinou a persistir nos meus sonhos. Obrigada por existir na minha vida e que sem você nada disso seria possível.

*A Deus que me guia em todos os meus passos e a Ele entrego minha vida.*

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce.

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde o trabalho foi realizado.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Considerações Gerais.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Ambiente Marinho.....	3
2.2. Estratégias de Defesa em Invertebrados Marinhos.....	4
2.3. Filo Mollusca: Características Gerais.....	6
2.4. Mecanismos de Defesa de Lesmas-do-mar.....	9
2.5. Tinta Púrpura.....	11
2.6. <i>Aplysia dactylomela</i> .....	15
2.7. Proteínas Isoladas de Lesmas-do-Mar.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAIS.....	19
4.1. Materiais Biológicos.....	19
4.1.1. <i>Aplysia dactylomela</i> .....	19
4.1.2. Microrganismos.....	19
4.1.3. Coelho, Camundongos e Ratos.....	19
4.2. Reagentes e Outros Materiais.....	19
4.2.1. Proteínas.....	19
4.2.2. Meios de Cultura.....	20
4.2.3. Matrizes para Cromatografias.....	20
4.2.4. Reagentes para Eletroforese.....	20
4.2.5. Materiais para “Dot” e “Western-blotting”.....	20
5. METODOLOGIA.....	21
5.1. Coleta e Tratamento da Tinta.....	21

5.2. Eletroforese Bi-Dimensional da Tinta .....	21
5.3. Determinação de Proteína .....	22
5.4. Purificação da Dactylomelina-P .....	22
5.4.1. Precipitação da Tinta com Sulfato de Amônio .....	22
5.4.2. Cromatografia de Troca Iônica .....	22
5.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica .....	23
5.5. Caracterização da Dactylomelina-P .....	23
5.5.1. Estimativa da Massa Molecular por PAGE-SDS .....	23
5.5.2. Determinação do Ponto Isoelétrico .....	24
5.5.3. Composição de Aminoácidos .....	24
5.5.4. Determinação de Carboidratos.....	25
5.5.5. Estabilidade Térmica .....	25
5.5.6. Influência do pH na Atividade da Proteína.....	25
5.5.7. Resistência a Protease .....	25
5.6. Atividades Biológicas da Tinta e da Dactylomelina-P .....	26
5.6.1. Atividade Antibacteriana em Meio Sólido .....	26
5.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Mecanismo de Ação .....	26
5.6.3. Atividade Antifúngica em Meio Sólido.....	27
5.6.4. Atividade Antifúngica em Meio Líquido.....	28
5.6.5. Extração dos Peptídeos da Tinta .....	29
5.6.6. Atividade Hemaglutinante .....	29
5.6.7. Atividade Anticoagulante .....	29
5.6.8. Determinação da Atividade $\beta$ -1,3 Glucanásica .....	30
5.6.9. Análise de Atividade Quitinásica .....	31
5.6.10. Detecção de Atividade Quitinásica Inespecífica em SDS-PAGE .....	31
5.7. Avaliação do Potencial Tóxico da Dactylomelina-P .....	32
5.7.1. Atividade Hemolítica.....	32
5.7.2. Atividade Citotóxica .....	32
5.7.3. Atividade Tóxica em Camundongos.....	33
5.8. Localização da Dactylomelina-P na Lesma <i>Aplysia dactylomela</i> .....	33
5.8.1. Produção de Anticorpos Policlonais .....	33

5.8.2. Determinação dos Títulos dos Soros Anti-Dactylomelina-P.....	34
5.8.3. Estudos de Imunolocalização.....	34
5.9. Interação da Dactylomelina-P com a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	37
6. RESULTADOS .....	38
6.1. Composição de Proteínas da Tinta de <i>A. dactylomela</i> .....	38
6.2. Purificação da Dactylomelina-P .....	39
6.3. Caracterização da Dactylomelina-P.....	46
6.3.1. Estimativa da Massa Molecular .....	46
6.3.2. Ponto Isoelétrico .....	47
6.3.3. Composição de Aminoácidos .....	47
6.3.4. Determinação de Carboidratos.....	49
6.3.5. Estabilidade Térmica .....	49
6.3.6. Influência do pH na Atividade da Dactylomelina-P.....	51
6.3.7. Resistência a Protease.....	51
6.4. Atividades Biológicas da Dactylomelina-P .....	52
6.4.1. Espectro de Ação .....	52
6.4.2. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima .....	57
6.4.3 Interação da dactylomelina-P com a bactéria <i>St. aureus</i> .....	57
6.4.4. Atividade Hemaglutinante .....	59
6.4.5. Atividade Anticoagulante .....	59
6.4. 6. Atividades Enzimáticas.....	59
6.5. Potencial Tóxico da Dactylomelina-P .....	59
6.6. Imunolocalização da Dactylomelina-P .....	60
6.6.1. Produção de Anticorpos Policlonais.....	60
6.6.2. Estudos de Imunolocalização da Dactylomelina-P.....	60
6.6.3. Localização da Dactylomelina-P na Glândula de Tinta.....	61
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÃO .....	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Exemplos de moluscos opistobrânquios das ordens Nudibranchia (A: <i>Chromodoris cavae</i> ; B: <i>Chromodoris elisabethina</i> ; C: <i>Hexabranhus sanguineus</i> ) e Anaspidea (D: <i>Bursatella leachii</i> ; E: <i>Aplysia dactylomela</i> ; F: <i>Aplysia oculifera</i> )..	7
FIGURA 2 – Defesa das lesmas-do-mar através da ontogenia, mostrada em cada estágio de vida: ovos, veligers, fase de metamorfose, juvenis e adultos (JOHNSON, 1999)..	120
FIGURA 3 – A: Localização da glândula de tinta da lesma-do-mar <i>Aplysia dactylomela</i> . B: Desenho esquemático, segundo Johnson <i>et al.</i> , 1999	152
FIGURA 4 – <i>Aplysia dactylomela</i> encontrada na praia de Fleixeiras, Trari, Ceará no momento da liberação da tinta.	15
FIGURA 5 – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida da tinta (20µgP) de <i>A. dactylomela</i> . A focalização isoeletrica da amostra foi feita em membrana de pHs 4,0 a 7,0. Marcadores de massa molecular: 250 kDa, 160 kDa, 105 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 5 kDa e 10kD.	38
FIGURA 6 – Antibiograma das frações protéicas e da tinta <i>A. dactylomela</i> contra a bactéria <i>St. aureus</i> . Tb: tinta bruta; Td: tinta dialisada; Frações obtidas por fracionamento da tinta com sulfato de amônio: F <sub>0/30</sub> , F <sub>30/60</sub> e F <sub>60/90</sub> . Todos os discos receberam uma alíquota de 30 µl.	40
FIGURA 7 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DE52-Metilcelulose da F <sub>30/60%</sub> obtida pela precipitação da tinta <i>A. dactylomela</i> com sulfato de amônio.	41
FIGURA 8 – Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose do pico DEII obtido da cromatografia de troca iônica.	42
FIGURA 9 – Atividade antibiótica dos picos obtidos da cromatografia de troca iônica (DEII), interação hidrofóbica (PHSII), da F <sub>30/60</sub> % e da tinta (Tp) do molusco <i>A. dactylomela</i> contra bactéria <i>St. aureus</i> . A: antibiótico controle: Vancomicina.	44
FIGURA 10 – Esquema de purificação adotado para o isolamento da dactylomelina-P, uma proteína com atividade antibacteriana presente na tinta do molusco <i>Aplysia dactylomela</i> .	45
FIGURA 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da fração protéica e picos das cromatografias obtidos durante a purificação da dactylomelina-P. Raia 1 –	

Marcador molecular; Raia 2 – F <sub>30/60%</sub> ; Raia 3 – Pico II da cromatografia de DEAE Celulose e Raia 4 – Pico II da cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose. Amostras: 20 µg/poço.....	46
FIGURA 12 – Ponto isoelétrico (pI 5,0) e massa molecular da dactylomelina-P (60 kDa) determinados em gel de poliacrilamida por eletroforese bidimensional. ....	47
FIGURA 13 – Géis de eletroforeses em poliacrilamida da dactylomelina-P após coloração com Coomassie brilliant blue (A) e Ácido periódico de Schiff (B). Raia 1 - controle positivo, Peroxidase; Raia 2 - Dactylomelina-P. Amostras: 1mgP/ml. ....	49
FIGURA 14 – Ação do calor na atividade antibacteriana da dactylomelina-P. C: disco com 30 µl de dactylomelina-P (100µg/ml) não aquecida; e discos com 30 µl de dactylomelina-P (100µg/ml) aquecida a 45, 50, 55 e 60 °C por diferentes períodos de tempo.....	50
FIGURA 15 – Influência do pH na atividade da dactylomelina-P contra <i>St. aureus</i> . C: disco com 30 µl de dactylomelina-P (500µg/ml) em pH 7,0; discos com 30 µl de dactylomelina-P (500µg/ml) previamente tamponada em diferentes pHs: 2,0 a 12,0.....	51
FIGURA 16 – Ação da tinta bruta e da dactylomelina-P sobre o crescimento vegetativo do fungo <i>Mucor</i> sp. A: tinta bruta (30 µl); B: dactylomelina-P (1 mg/ml).....	53
FIGURA 17 – Fotomicrografias de culturas do fungo <i>Colletotricum lindemuthianum</i> desenvolvidas a partir de conídios cultivados em meio contendo dactylomelina-P ou tinta bruta de <i>A. dactylomela</i> . (A) Controle, conídios incubados em Caldo Sabouraud; (B) Conídios incubados com a tinta bruta de <i>A. dactylomela</i> e (C) Conídios incubados com a dactylomelina-P. Esfregaços corados com lactofenol azul de algodão. Aumento: 400 x.....	56
FIGURA 18 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da dactylomelina-P para <i>St. aureus</i> pelo método de difusão em placa. Discos com concentrações de dactylomelina-P variando de 4-500 µg/ml.....	57
FIGURA 19 – Fotomicrografias de células de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivadas em meio sem a proteína dactylomelina-P (A) e em meio contendo 500 µg/ml de dactylomelina-P (B). Aumento 85.000 x ...	58
FIGURA 20 – Anatomia interna da lesma <i>Aplysia dactylomela</i> , destacando dentre outros a localização do papo, hepatopâncreas, glândula de albúmem e glândula opalina. ....	61

FIGURA 21 – Western blot de extratos de órgãos e da hemolinfa da lesma *A. dactylomela*. A: Membrana de PVDF revelando as proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-dactylomelina-P. Raia 1: dactylomelina-P; Raia 2: hemolinfa; Raia 3: glândula opalina; Raia 4: glândula digestiva; Raia 5: coração; Raia 6: glândula de tinta; Raia 7: glândula de albúmen e Raia 8: Papo. B: Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras para comparação, corada com Coomassie Brilliant Blue .....62

FIGURA 22 – Imunohistoquímica da glândula de tinta da lesma *A. dactylomela* revelada pelo anticorpo anti-dactylomelina-P. A, B e C: Cortes observados sem coloração (200, 400, 800x); D: Corte corado com azul de toluidina (400x) E: Corte controle, preparado com soro pré-imune, observado sem coloração (200x) e F: Corte controle, preparado com soro pré-imune, corado com azul de toluidina (400x). As setas apontam os locais da dactylomelina-P na glândula.....63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Teor de proteínas e atividade antibacteriana das frações protéicas obtidas a partir da precipitação da tinta de <i>A. dactylomela</i> com sulfato de amônio .....	39
TABELA 2 – Purificação da proteína com atividade antibacteriana da tinta de <i>Aplysia dactylomela</i> .....	43
TABELA 3 – Composição de aminoácidos da dactylomelina-P. Os valores estão expressos em mg para cada 10 g de proteína liofilizada.....	48
TABELA 4 – Espectro de atividade antibacteriana da tinta do molusco <i>A. dactylomela</i> e da dactylomelina-P .....	52
TABELA 5 – Atividade antifúngica em meio sólido da tinta e da dactylomelina-P.....	54
TABELA 6 – Atividade antifúngica em meio líquido da tinta bruta e da dactylomelina-P. 1: Inibição da germinação de esporos; 2: Inibição no desenvolvimento de hifas s .....	55

**ABREVIATURAS**

<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotrietol
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperagem
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>OPD</b>	Orto Fenileno de Amina
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
<b>PBS</b>	Salina com Tampão Fosfato de Sódio
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinidileno
<b>Rf</b>	Mobilidade Relativa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TEMED</b>	N,' N,' N,' N,' tetrametiletlenodiamina
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UV</b>	Ultravioleta

## RESUMO

O gastrópode marinho *Aplysia dactylomela* é conhecido por liberar uma tinta púrpura sempre que é importunado. Como não possui nenhuma estrutura externa de proteção, acredita-se que essa secreção, rica em substâncias biologicamente ativas, participe da defesa química do animal. A tinta é composta de pigmentos, proteínas e substâncias de baixa massa molecular. Os pigmentos da tinta são originados de algas vermelhas, mas quanto às proteínas, pouco é conhecido sobre a sua origem, processamento, local de armazenamento e função no animal. Este trabalho descreve pela primeira vez a composição protéica da tinta e apresenta algumas características físico-químicas e biológicas da dactylomelina-P, uma proteína antibacteriana presente na tinta dessa lesma, além de trazer informações acerca da localização desta proteína na glândula de tinta. A tinta foi obtida a partir de espécimes encontrados na praia de Fleixeiras, Ce. A composição de proteínas da tinta foi determinada por eletroforese bidimensional e a purificação da dactylomelina-P foi feita através de cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica. Dactylomelina-P foi analisada quanto à massa molecular, ponto isoelétrico, composição de aminoácidos, presença de carboidratos, estabilidade térmica, resistência ao pH e a proteases. Várias atividades biológicas foram testadas com a tinta e com a dactylomelina-P, incluindo atividades antimicrobianas, enzimáticas, hemaglutinante, anticoagulante, hemolítica, citotóxica e tóxica. Os ensaios de localização da proteína foram realizados em diferentes tecidos da lesma por *western blot*, na glândula de tinta por imunohistoquímica e a interação com a bactéria *Staphylococcus aureus* foi feita por imunocitoquímica. A tinta de *A. dactylomela* contém mais de 40 proteínas/ peptídeos, com massas abaixo de 70 kDa e pIs na faixa ácida. A proteína mais abundante na tinta é a dactylomelina-P, que é uma molécula monomérica, de 59,8 kDa, pI 5,0, que possui alto teor de metionina e menos de 1% de carboidratos, é desnaturada a 60 °C por 10 minutos e resiste a pHs entre 3-12. Dactylomelina-P mostra um amplo espectro de ação antibacteriano, mas não antifúngico, ao contrário da tinta que possui um fator com esta atividade. É particularmente eficiente contra bactérias marinhas, podendo ser bactericida (4,0µg/ml) ou bacteriostática (0,2µg/ml), dependendo da concentração. Dactylomelina-P aglutinou eritrócitos de coelho, ratos e camundongos, não apresentou atividade anticoagulante, hemolítica e nem citotóxica.

A  $DL_{50}$  para camundongos ficou entre 60-100 mg/Kg, sendo considerada moderadamente tóxica. Dactylomelina-P só foi encontrada na glândula de tinta, localizando-se preferencialmente nas células das vesículas produtoras. Ensaios de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a dactylomelina atravessa a parede celular da bactéria *S. aureus* e, interage principalmente com a membrana citoplasmática, provavelmente interferindo no metabolismo, ao invés de causar danos à célula.

## ABSTRACT

The sea hare *Aplysia dactylomela* is known by discharging a purple ink when disturbed. As it doesn't show any external structure of protection, it is believed that this secretion, rich in bioactive substances, participates in the chemical defense against pathogens and/or predators. The ink is constituted mainly by pigments, proteins and low molecular mass substances. The pigments are originated from red algae, nevertheless, there is lack of information about the origin, processing, storage and function of the ink proteins. This work describes the protein composition of the ink and present some physiochemical and biological characteristics of the dactylomelin-P, an antibacterial protein from the ink besides information concerning the location of this protein in the purple gland. The ink was obtained from specimens collected at Fleixeiras beach, Ce. The protein composition of the ink was studied by bi-dimensional electrophoresis. The purification of dactylomelin-P consisted basically in ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. Dactylomelina-P was analyzed as to molecular mass, isoelectric point, amino acid composition, carbohydrates, heat stability, pH and proteinase resistance. Several biological activities were tested with the ink and with dactylomelina-P, including antimicrobial, enzymatic, haemagglutinating, anticoagulant, hemolytic, cytotoxic and toxic activities. The immunolocalization assays of dactylomelina-P were carried out in different sea hare tissues by western blot and immunohistochemistry and the interaction with *Staphylococcus aureus* was investigated by immunocytochemistry. The ink of *A. dactylomela* contains more than 40 proteins/peptides, with molecular masses below 70 kDa and acid pIs. The most abundant protein in the ink is the dactylomelin-P, a monomeric protein with 59,8 kDa, pI 5,0, high methionin content, and less than 1% carbohydrates. It is denatured at 60 °C for 10 minutes and it resists to pH range of 3-12. Dactylomelin-P shows a wide antibacterial action spectrum, but no antifungal, unlike the ink that possesses some factor with this activity. It is particularly efficient against sea bacteria, can be bactericidal (4,0µg/ml) or bacteriostatic (0,2µg/ml), depending on the concentration. Dactylomelin-P agglutinated rabbit, mice and rat erythrocytes, but it did not show anticoagulating, hemolytic and cytotoxic activities. The LD<sub>50</sub> for mice was 60-100 mg/Kg, being considered moderately toxic. Dactylomelin-P was only found in the ink gland, being located preferentially in the cells of the producing

vesicles. The electronic transmission microscopy revealed that the dactylomelina-P crosses the cell wall of *S. aureus* and interacts mainly with the plasmatic membrane, probably interfering in the metabolism of the bacterium, instead of causing mechanic damage to the cell.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações Gerais

O Filo Mollusca abriga espécimes de importância econômica como as ostras, lulas, polvos, mariscos bivalves produtores de pérola e outros menos conhecidos ou até temidos, como as lesmas-do-mar (SAKAMOTO *et al.*, 1998). O medo das lesmas vem do fato de algumas delas liberarem uma tinta de cor púrpura quando importunadas. Essa tinta é liberada pela glândula de Tinta, que fica na cavidade paleal do animal. Quando ocorre o estímulo, a tinta é rapidamente eliminada e, como é muito viscosa, leva alguns segundos para dissipar-se na água. Essa tinta é rica em substâncias bioativas que, provavelmente, participam na defesa do animal (ÁVILA, 1995). As lesmas não possuem estruturas externas de proteção e, além disso, possuem nadadeiras, parapódios, originadas de projeções laterais amplas e corpo frequentemente colorido, tornando-se muito visíveis a potenciais predadores (NOLEN *et al.*, 1995). Todavia, esses animais, aparentemente desprotegidos e apetitosos possuem poucos predadores, o que desperta o interesse em se desvendar suas estratégias de defesa. Sabe-se que o arsenal de defesa desses animais inclui substâncias adquiridas a partir da dieta algal e outras de natureza constitutivas presentes em várias secreções, incluindo a tinta (MACCOLL *et al.*, 1990). Embora existam alguns trabalhos descrevendo o isolamento e a caracterização de proteínas a partir da tinta de algumas poucas espécies de lesmas, não se conhece a origem dessas proteínas, sua forma de armazenamento na glândula e, principalmente, sua função. Os oceanos ainda guardam muitos segredos a serem descobertos e um deles diz respeito às substâncias que os organismos marinhos produzem ou armazenam adaptativamente para serem utilizadas em processos de comunicação, defesa, predação, competição e/ou reprodução. Estudos dessa natureza são importantes para a compreensão da evolução dos mecanismos de defesa dos animais e podem propiciar a descoberta de novas substâncias com potencial biotecnológico ou terapêutico (FREITAS & MENDES, 1986).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O Ambiente Marinho

O ecossistema marinho detém a maior parte dos organismos primitivos, como as algas, as esponjas os corais e as anêmonas. Desprovidos de sistema nervoso desenvolvido ou de órgãos especializados na captação de luz e do som, esses seres restringem-se à forma de comunicação mais primitiva, àquela que se efetua por mediadores químicos. Essa forma de comunicação é responsável pela geração de uma grande diversidade de moléculas neste ecossistema. Os diálogos químicos envolvem interações intra e interespecíficas. Nas interações intraespecíficas participam os feromônios sexuais, territoriais, de alarme, de pista e de agrupamento, enquanto nas interações interespecíficas participam os caimônios, que são substâncias que beneficiam o organismo que as recebe e os alomônios, que conferem vantagens aos organismos produtores. Essas interações, portanto, geram um fluxo contínuo de moléculas das mais diferentes naturezas e complexidades (SOLÉ-CAVA & KELECOM, 1988). Muitas dessas substâncias já mostraram ser de grande valor terapêutico (CARTÉ, 1996). Dessa forma, o ambiente marinho é uma excepcional reserva de produtos naturais bioativos, que provavelmente exibem fatores estruturais não encontrados nos produtos naturais terrestres (IRELAND *et al.*, 1988).

Apesar do ambiente marinho ser muito mais diversificado que o terrestre, pelas dificuldades de coleta de organismos, ainda é pouco conhecido. No entanto, somente entre 1977 e 1987, 2500 novos produtos naturais marinhos foram reportados na literatura (IRELAND *et al.*, 1993). Em 1992, por exemplo, mais de 500 novos metabólitos bioativos foram isolados desses organismos, relatados em mais de 200 publicações. Nos anos de 1998 a 2000, 106 compostos marinhos derivados de diversos organismos, como animais, algas, fungos e bactérias se encontravam em fase pré-clínica (MAYER & HAMANN, 2005).

Dentre os invertebrados marinhos, as esponjas, os corais, os moluscos e, em menor escala, os equinodermas, os briozoários, os corais moles e os tunicados são as fontes principais de produtos naturais de origem marinha. Embora haja um surpreendente número de produtos naturais isolados de invertebrados marinhos, as inferências biológicas têm sido

tímidas e cuidadosas, uma vez que estas substâncias, em muitos casos, são oriundas de microrganismos associados a esses invertebrados ou obtidas da dieta alimentar, restringindo a compreensão da química do grupo (PEREIRA & SOARES, 2002).

## 2.2. Estratégias de Defesa em Invertebrados Marinhos

Todos os organismos possuem mecanismos de defesa contra microrganismos. Esses mecanismos constituem a imunidade natural. Os mecanismos de defesa especializados que constituem a imunidade adquirida só estão presentes nos vertebrados. O sistema de defesa dos invertebrados difere grandemente desses, sendo a principal característica a incapacidade de produzir anticorpos. Esse fato não os torna menos indefesos ou incapazes de se defender de seus agressores. Os invertebrados primitivos que povoam nossos oceanos são registros vivos de que mecanismos de defesa, às vezes rudimentares, foram bastante eficazes na manutenção desses filos ao longo da evolução (ROIT, 1989).

Nos invertebrados, várias células respondem aos microrganismos, que cercam esses agentes infecciosos e os destroem. Essas células se parecem com as células fagocitárias e foram denominadas de amebócitos fagocíticos nos acelomados, hemócitos nos moluscos e artrópodes, celomócitos nos anelídeos e leucócitos sanguíneos nos tunicados. Além disso, os invertebrados produzem aglutininas, que se ligam a carboidratos presentes nas paredes celulares dos microrganismos facilitando a fagocitose, e numerosos fatores líticos e antimicrobianos como as lisozimas. Muitos estudos têm demonstrado que os invertebrados são capazes de rejeitar transplantes de tecidos estranhos ou alotransplantes. Essas reações de rejeição são mediadas principalmente por células semelhantes às células fagocitárias. Elas diferem das que ocorrem nos vertebrados porque a memória para o tecido transplantado não é gerada ou é difícil de ser demonstrada. No entanto, tais resultados indicam que até os invertebrados devem expressar moléculas de superfície que distinguem o próprio do estranho, como fazem os vertebrados (ABBAS & LITCHTMAN, 2005).

Para alguns invertebrados os únicos mecanismos de proteção são aqueles desempenhados pelas barreiras morfológicas e comportamentais. São exemplos de barreiras

morfológicas os esqueletos de calcário dos corais, os espinhos dos ouriços-do-mar, as conchas de carbonato de cálcio de alguns moluscos e as espículas, finas como agulhas, das esponjas. Como exemplos de barreiras comportamentais têm-se a camuflagem, a aquisição de hábitos noturnos ou a colonização de zonas de difícil acesso, como pequenos buracos ou ranhuras. Para muitos organismos, particularmente aqueles desprovidos de proteção externa, as principais estratégias de defesa envolvem a acumulação ou produção de secreções ricas em substâncias bioativas (SOLÉ-CAVA & KELECOM, 1988).

Um exemplo típico de defesa química é o de alguns tunicados que acumulam vanádio, um elemento químico bastante tóxico e raro na água do mar, além de produzirem e concentrarem ácido sulfúrico na parte externa do corpo, que servem para afastar os predadores (PEREIRA & SOARES, 2002). Outro exemplo bem conhecido é da anêmona-do-mar, *Anthopleura elegantissima*, que quando ameaçada se contrai e, após certo tempo, anêmonas da mesma espécie que se encontram ao seu redor também se contraem, sendo dessa forma, rejeitadas pelo predador. Estudos das secreções produzidas nesta resposta permitiram identificar a antopleurina, um feromônio de alarme, que é um análogo estrutural do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). É interessante destacar que o predador ataca a anêmona principalmente nos tentáculos e na parte superior do corpo, onde há menor concentração de antopleurina, o que sugere que essa substância tenha, também, um papel de defesa (BAKUS *et al.*, 1988).

Toxinas são também freqüentemente encontradas em vários invertebrados como as medusas e as anêmonas, organismos providos de nematocisto. Os nematocistos são estruturas celulares que explodem e penetram na pele de animais agressores. Há registros de queimaduras e até de morte de banhistas em consequência desse contato. Essas toxinas podem estar presentes também em algas, moluscos e platelmintos, podendo servir tanto de defesa como de ataque, dependendo dos organismos (BAKUS *et al.*, 1988). Um dos exemplos mais conhecidos de toxina de invertebrado é a palitoxina, isolada dos zoantídeos (cnidários sem esqueleto calcário) do gênero *Palythoa*. Essa toxina é a mais violenta conhecida até hoje. Causa vasoconstrição e, dependendo da dose, pode ser fatal (IRELAND *et al.*, 1993). A palitoxina era usada por nativos em Maui, no Hawaii, na ponta de suas lanças como defesa contra invasores (COLWELL, 1983). Outra toxina bastante conhecida é a lofotoxina, uma toxina neuromuscular de algumas gorgônias do Pacífico, do

gênero *Lophogorgia*, tão deletéria como o curare, veneno obtida de algumas folhas de plantas como *Strychnos toxifera* ou *S. guianensis*. A toxina ocorre em corais ou gorgônias de águas tropicais ou subtropicais, e exibe citotoxicidade, ictiotoxicidade e atividade antibacteriana (JACOBS *et al.*, 1985).

Muitos invertebrados marinhos, como moluscos sem concha são aparentemente mais indefesos do que outros invertebrados marinhos. Portanto, é provável que esses animais acumulem toxinas em seus corpos para proporcionar uma defesa química (HIGUCHI, *et al.*, 1998). Apesar da ausência da concha, poucos predadores desses animais são conhecidos. Muitas explicações, incluindo, comportamento defensivo e secreções químicas, têm sido abordadas para reconhecer a habilidade desses moluscos em escapar de predadores (CIMINO, 1985). Em geral, o estabelecimento de um mecanismo de defesa química pareceu ter servido à falta de proteção física proporcionada pela concha. Acredita-se que a concha foi perdida depois que a defesa química foi envolvida. Acreditam que foi um relacionamento de causa e efeito entre a perda da concha e o ganho do mecanismo de defesa química. Embora, é claro, que a defesa química foi elaborada gradualmente, enquanto a concha foi sendo perdida. A concha é uma defesa efetiva, mas não perfeita, para muitos moluscos. Mecanismos auxiliares de defesa, incluindo comportamental, anatômica e química estão presentes em formas com a concha bem desenvolvida (FAULKNER, 1983).

### 2.3. Filo Mollusca: Características Gerais

Os moluscos têm corpo mole, não segmentado, consistindo tipicamente de uma cabeça anterior, um pé ventral e uma massa visceral dorsal. O corpo é recoberto pelo manto, responsável pela formação da concha. Possuem sistema circulatório aberto (exceto em Cephalopoda), com coração. A respiração pode ser branquial ou pulmonar. O sistema nervoso é formado por três pares de gânglios. São animais dióicos ou monóicos e a fecundação pode ser interna ou externa (RUPPERT & BARNES, 1996).

O Filo compreende sete classes de aspectos e hábitos diferentes, mas a maioria dos trabalhos sobre defesa e produtos naturais concentra-se na classe Gastropoda, que compreende os caramujos, caracóis e lesmas. Essa classe está dividida em 3 subclasses:

Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata. Devido à proteção física fornecida pela concha, os prosobrânquios não contêm metabólitos secundários interessantes (RUPPERT & BARNES, 1996).

Na subclasse Pulmonata, o foco tem sido a família Siphonariidae, que possui espécies produtoras do antibiótico diemenensina-A (HOCHOLOWSKI & FAULKNER, 1983). Os moluscos da subclasse Opisthobranchia não possuem estrutura externa de proteção e, além disso, o manto que recobre o animal é freqüentemente colorido, como os nudibrânquios e as lesmas-do-mar, e apesar de parecerem frágeis e apetitosos (Figura 1), possuem poucos predadores (NOLEN *et al.*, 1995). Geralmente, esses animais concentram metabólitos a partir da dieta e os incorporam em suas estratégias de defesa (FAULKNER, 1988).

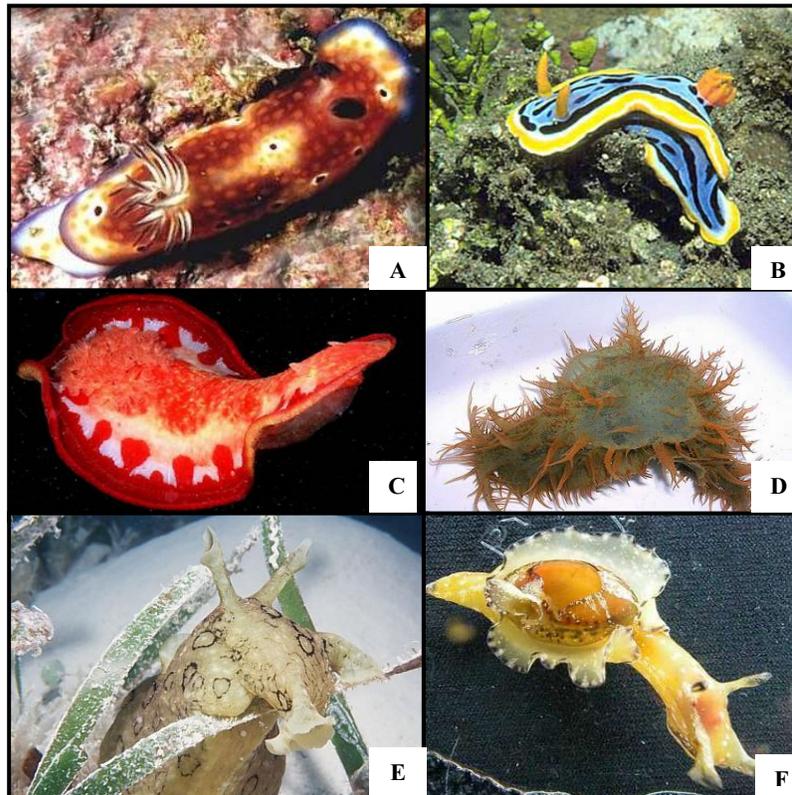


FIGURA 1 – Exemplos de moluscos opistobrânquios das ordens Nudibranchia (A: *Chromodoris cavae*; B: *Chromodoris elisabethina*; C: *Hexabranthus sanguineus*) e Anaspidea (D: *Bursatella leachii*; E: *Aplysia dactylomela*; F: *Aplysia oculifera*).

As lesmas-do-mar são temidas desde tempos Romanos por causa de uma tinta púrpura que algumas espécies secretam quando são importunadas (HALSTEAD, 1965). As lesmas-do-mar compreendem a ordem Anaspidea, que contem duas famílias (Akeridae e Aplysiidae) com nove gêneros: *Akera*, *Aplysia*, *Dolabella*, *Dolabrifera*, *Petalifera*, *Phyllaplysia*, *Notarchus*, *Stylocheilus* e *Bursatella* (THOMPSON, 1976).

Várias espécies de lesmas dos gêneros *Dolabella*, *Bursatella* e *Aplysia* liberam a tinta púrpura. Das 37 espécies descritas para o gênero *Aplysia*, por exemplo, 30 liberam essa secreção (NOLEN *et al.*, 1995).

A tinta púrpura é liberada pela glândula de tinta localizada abaixo da concha no manto. Quando ocorre o estímulo, essa tinta é eliminada e, como é muito viscosa, demora alguns segundos para dissipar-se. Assim, uma das primeiras funções atribuídas a essa secreção foi a de funcionar como uma cortina de fumaça, dando tempo ao animal para escapar do predador. Pelo fato de terem sido encontradas várias substâncias bioativas nessa secreção, outras funções têm sido sugeridas, incluindo a de defesa (ÁVILA, 1995).

A tinta é constituída de pigmentos que corresponde a 65% de sua massa seca, e o restante consistindo de proteínas de alta massa molecular e pequena quantidade de outros compostos de baixa massa molecular (TROXLER *et al.*, 1981).

COELHO *et al* (1998), propuseram um modelo para explicar o processo de obtenção do pigmento púrpuro pelo molusco a partir de sua dieta. Segundo os autores, o pigmento ficoeritrina, presente nas algas vermelhas, é processado em vacúolos da glândula digestiva do molusco. O cromóforo é separado da proteína e é transportado pela hemolinfa para a glândula de tinta, onde é armazenado em vacúolos até sua liberação. Ao contrário dos pigmentos, essas proteínas parecem não ser originadas da dieta, haja vista que não foi encontrada nenhuma homologia com as biliproteínas algais (MACCOLL *et al.*, 1990; BEZERRA *et al.*, 2004). Embora ainda não tenha sido elucidada a síntese, processamento e função das proteínas da tinta especula-se que devam estar envolvidas na defesa desses animais (COELHO *et al.*, 1998; MELO *et al.*, 1998; 2000).

Além da glândula de tinta, esses animais possuem as glândulas opalina e digestiva, que secretam substâncias tóxicas. A glândula opalina ou de Bohadsch, como também é conhecida, está situada na parte anterior da cavidade paleal e secreta um fluido leitoso que em algumas espécies, possui um odor nauseante. A glândula digestiva, ou

hepatopâncreas, elimina suas secreções diretamente no estômago e, além da função digestiva, parece armazenar metabólitos de defesa obtidos a partir da dieta (ROGERS *et al.*, 1995). Esses animais produzem ainda um muco, que recobre todo o corpo e é rico em substâncias bioativas, o que limita ou impede a predação (KISUGI *et al.*, 1989).

#### 2.4. Mecanismos de Defesa de Lesmas-do-mar

As lesmas-do-mar são conhecidas por adquirir defesa química de suas dietas, exatamente como muitos insetos que comem plantas enriquecidas quimicamente (DUFFLEY, 1980). Esses animais são geralmente impalatáveis para muitos predadores. Entretanto, embora evidências indiquem que as lesmas-do-mar seqüestrem metabólitos secundários de suas dietas, existe pequena evidência direta que esses metabólitos seqüestrados prestam às lesmas-do-mar impalatabilidade. Em suma, embora essas lesmas seqüestrem metabólitos que são desagradáveis para potenciais predadores, eles não parecem localizar esses compostos em locais condizentes com o papel de defesa, como a pele, por exemplo (FAULKNER, 1992).

Algumas lesmas-do-mar, mas notadamente *Aplysia juliana* que come exclusivamente algas verdes dos gêneros *Ulva* ou *Enteromorpha*, pobres em metabólitos secundários, mostra ser mais vulnerável a predação que as lesmas, que comem algas vermelhas ricas em compostos tóxicos (CAREFOOT, 1987). Entretanto, poucas diferenças significativas foram encontradas na palatabilidade de outras partes do corpo, apenas na glândula digestiva. Entretanto, secreção da glândula opalina, pele e presente nos ovos de *A. juliana* parece conter substâncias que participam na sua defesa química (PENNING, 1994).

As defesas que as lesmas-do-mar empregam mudam por toda ontogenia e são normalmente interligadas (Figura 2) dando a esses animais vários estágios de defesa dependendo do tipo e intensidade de ameaça predatória (JOHNSON, 1999). Embora seja verdade que poucos organismos fazem das lesmas-do-mar a maior parte de sua dieta, predadores desses animais certamente existem (NOLEN, *et al.*, 1995). Eles incluem a grande anêmona-do-mar *Anthopleura xanthogrammica*, gastrópodes predadores *Navanax* e

*Melo amphora* e a estrela-do-mar *Coscinasterias calamaria* (JOHNSON, 1999).

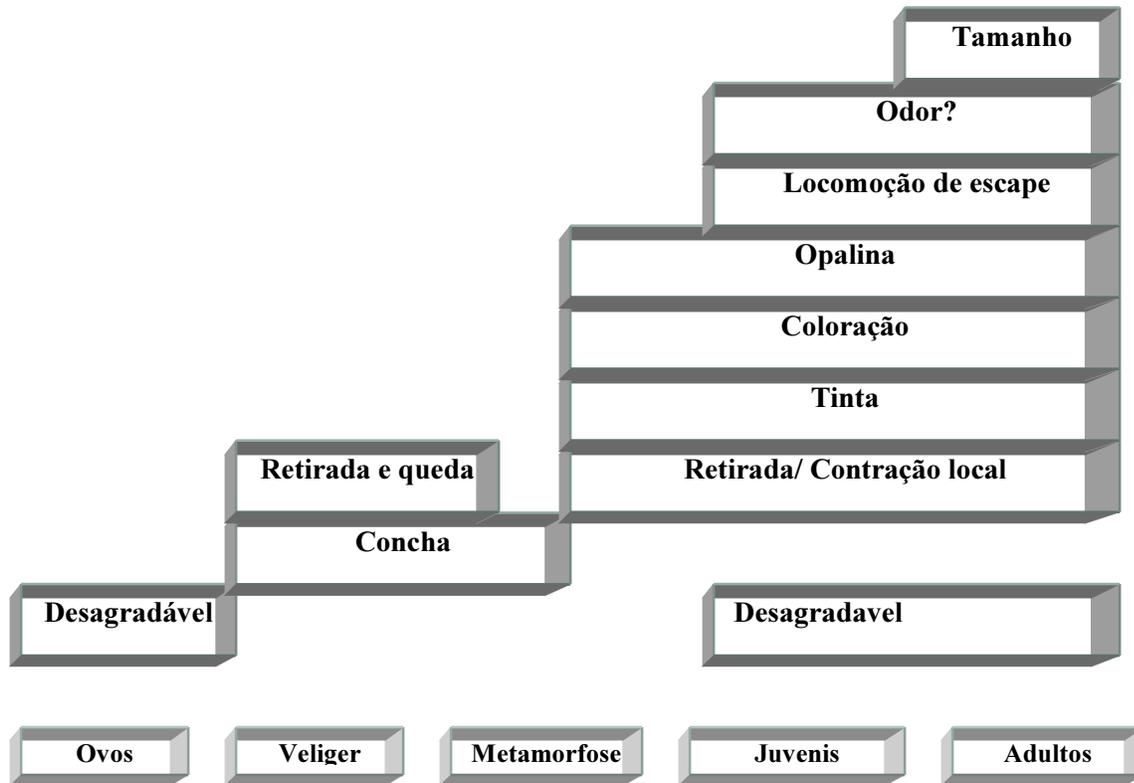


FIGURA 2 – Defesas das lesmas-do-mar através da ontogenia, mostradas em cada estágio de vida: ovos, veligers, fase de metamorfose, juvenis e adultos (JOHNSON, 1999).

As lesmas-do-mar colocam massas de ovos sobre diversos substratos, como algas ou rochas, e têm sido encontrados também em raiz de mangues, pedaços de madeira e fundo arenoso (CAREFOOT, 1987). Os ovos expostos oferecem uma fonte fácil de nutrientes para predadores, e existem somente duas referências na literatura de predação em massa de ovos; ambas por estrela-do-mar (JOHNSON, 1999). Têm surgido hipóteses de que metabólitos secundários da dieta algal das lesmas são responsáveis pela aparente repugnância dos ovos, entretanto, poucos estudos têm sido conduzidos. PENNING & PAUL (1993) fizeram experimentos com as lesmas *Stylocheilus longicauda*, *Dolabella auricularia* e *Aplysia californica*, onde se alimentaram de dietas naturais e artificiais contendo metabólitos secundários, mas esses metabólitos não foram encontrados nos ovos.

É possível que lesmas-do-mar sintetizam *de novo*, substâncias que detêm predação em ovos (JOHNSON, 1999).

Presumivelmente, a proteção química oferecida pela massa de ovos não é a maior parte da estratégia de defesa na larva veliger livre-natante. Isso, não tem, entretanto sido testado. Se a proteção química é perdida, a larva veliger parece depender somente da proteção física da concha larval. Depois de sobreviver várias semanas no plâncton, as larvas sedimentam na coluna d'água próximo as algas preferidas (normalmente vermelhas para espécies que produzem tinta) onde elas começam o processo de metamorfose (CAREFOOT, 1987). Até o desenvolvimento do estágio 6, três a quatro vesículas de tinta podem ser vistas em espécimes preservadas. Pelo 3º dia ou estágio 8 o animal começa a se alimentar de algas e a tinta começa a ser visível. Pelo estágio 9, quatro a seis vesículas de tinta estão cheias com tinta púrpura em *A. Californica* e o animal já é capaz de liberar tinta nesse estágio (KRIEGSTEIN, 1977).

A defesa em estágios de juvenil e adulto pode em sua maioria ser dividido dentro das categorias passiva e ativa. Defesas passivas são aquelas em que a ação direta do sistema nervoso não é requerida, são consideradas a primeira linha de defesa. Defesas ativas, por outro lado, são normalmente inativas e em sua maioria são ativadas com ataque predatório, representam à linha final de defesa. Como exemplos de defesas passivas têm a coloração, odor, palatabilidade e o tamanho. Entre as defesas ativas encontram-se o comportamento de retirada do sifão e brânquias, locomoção de escape (“galope” e “natação”) e defesas químicas, incluindo a tinta, liberada pela glândula de tinta, e a secreção opalina, liberada pela glândula hipobranquial (JOHNSON, 1999).

## 2.5. Tinta Púrpura

Como já foi citado anteriormente, a tinta é liberada pela glândula de tinta também comumente chamada de glândula do manto, glândula púrpura ou glândula de Blochmann. Glândula púrpura não é uma escolha apropriada, pois se refere somente às espécies que liberam a tinta púrpura e por isso sugere que os animais que liberam tinta branca não têm a glândula ou que não é homóloga à glândula de tinta. Glândula do manto seria aceitável, exceto por que pode ser confundida com outras glândulas contidas dentro da

cavidade do manto. Se Blochmann tivesse descrito somente a glândula de tinta esse também seria um nome apropriado, mas infelizmente seu nome tem sido aplicado também para glândula hipobranquial. Por essas razões o nome glândula de tinta é o nome mais apropriado (JOHNSON, 1999).

A glândula de tinta está localizada na cavidade paleal do manto, sobre as brânquias (Figura 3). O estudo de PRINCE *et al.* (1998) com a glândula de tinta de *A. californica* e *A. brasiliana* aperfeiçoaram o entendimento da estrutura dessa glândula, e o processamento e secreção da tinta.

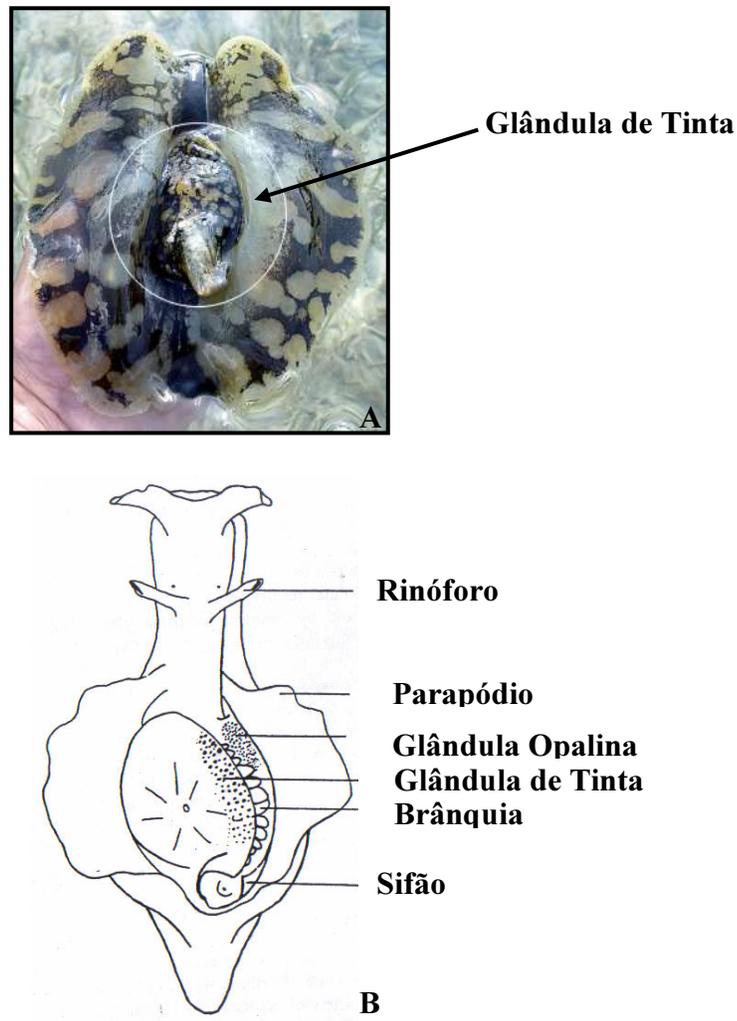


FIGURA 3 – A: Localização da glândula de tinta da lesma-do-mar *Aplysia dactylomela*.

B: Desenho esquemático, segundo JOHNSON *et al.* (1999).

As glândulas são compostas de três tipos de vesículas (vermelho-púrpura, âmbar e clara) e três tipos de células (células ricas em retículo endoplasmático rugoso, células granulares e células da vesícula) além de matriz de colágeno e músculo (PRINCE *et al.* (1998).

A tinta é liberada através de poros na superfície ventral da glândula e o fluxo direcionado para baixo dentro da cavidade do manto (PRINCE *et al.*, 1998) onde pode ser direcionada pelo sifão e bombeada para fora do manto (WALTERS & ERICKSON, 1986).

A composição da tinta tem sido examinada por vários autores (CHAPMAN & FOX, 1969; TROXLER *et al.*, 1981; MACCOLL *et al.*, 1990; PAUL & PENNING, 1991; PRINCE *et al.*, 1998). A tinta é em sua maioria composta por pigmentos derivados de algas vermelhas, sendo o componente majoritário, a ficoeritrina (CHAPMAN & FOX, 1969).

A tinta púrpura de *A. californica* é composta de 65 % de r-ficoeritrobilina de sua massa seca (TROXLER *et al.*, 1981), mas com uma grande quantidade de material protéico de função desconhecida. PRINCE *et al.* (1998) têm sugerido que esse componente protéico pode ser produzido nas células RER da glândula de tinta e estocada em vesículas âmbar, entretanto, ambas as hipóteses precisam ser testadas.

Recentemente, a composição da tinta de *A. dactyломela* foi caracterizada constituindo cerca de 99,5% de água. A análise química da sua massa seca foi composta principalmente de proteína (acima de 60%), e o restante distribuído entre carboidratos, lipídeos e cinzas (BEZERRA *et al.*, 2004).

Várias hipóteses têm sido propostas para a função da tinta em *Aplysia* e outras lesmas relacionadas. A tinta pode ser um método de eliminar produtos indesejáveis da digestão de algas vermelhas, como pigmentos da bile (CHAPMAN & FOX, 1969). Foi sugerido também que a tinta atuaria como uma cortina de fumaça, escondendo a lesma de predadores visuais (EALES, 1921; HALSTEAD, 1965), hipótese que seria efetiva apenas em poças calmas, visto que a tinta seria diluída rapidamente em águas sublitorais turbulentas (CAREW & KANDEL, 1977). No entanto, a tinta parece não esconder as lesmas mesmo em pequenas poças de maré naturais (KUPFERMANN & CAREW, 1974), embora possa permanecer brevemente ao redor do animal por seu componente mucoso. Como estes animais são lentos e não possuem a habilidade de fazer um recuo rápido, como

os cefalópodos, seria mais vantajoso que a tinta atuasse para repelir potenciais predadores (DiMATTEO, 1982).

Recentemente, KICKLIGHTER *et al.* (2005) estudaram a relação das secreções tinta-opalina de *A. californica* e observou que elas facilitam o escape das lesmas por uma combinação de mecanismos, através de falsos estímulos alimentares e por transtorno sensorial em lagostas. Essas secreções têm quantidades milimolares de aminoácidos que estimulam o sistema nervoso das lagostas, impedindo assim a sua predação por esses animais.

Outros autores sugerem que a tinta seja desagradável ou impalatável para os predadores, agindo, portanto como preventivo da ingestão das lesmas (DiMATTEO, 1981; 1982; PENNING, 1994; NOLEN *et al.*, 1995).

Duas outras funções foram investigadas na tinta púrpura de *A. dactylomela*, como irritação sensorial e depressor metabólico. Embora esta última não tenha sido encontrada, o fluido age como irritante para várias espécies de invertebrados e peixes. As observações anteriores de impalatabilidade da tinta não são incompatíveis com esta nova função, em alguns casos os mesmos dispositivos sensoriais poderiam estar envolvidos (CAREFOOT *et al.*, 1999).

A tinta poderia desempenhar um papel social, comunicando informação sobre o estado reprodutivo, visto que animais solitários liberam tinta com menor frequência do que aqueles em grupos (TOBACH *et al.*, 1965). A tinta poderia funcionar ainda como um sinal apossemático aos potenciais predadores, alertando para outras propriedades tóxicas da lesma (AMBROSE *et al.*, 1979) e como um sinal de alarme intra-específico para a presença de um predador nas proximidades (FIORITO & GHERARDI, 1990; STOPFER *et al.*, 1993). Estas diferentes funções atribuídas a tinta não são surpreendentes, pois o uso de vários meios de defesa não é incomum em invertebrados (EDMUNDS, 1966).

## 2.6. *Aplysia dactylomela*

A espécie *A. dactylomela* Rang 1828 (Figura 4) é classificada no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Opisthobranchia, ordem Anaspidae, família Aplisiidae, subfamília Aplisiinae, gênero *Aplysia*. Esta espécie pode ser encontrada no mundo inteiro, especialmente em regiões tropicais, sendo uma das três espécies cosmopolitas do gênero, além de *A. parvula* e *A. juliana* (CAREFOOT, 1987). No continente americano, ocorre desde o Sul da Flórida, nos Estados Unidos, até o Caribe e no Brasil, do Maranhão a São Paulo, juntamente com as espécies *A. brasiliiana*, *A. parvula* e *A. juliana* (KANDEL, 1979; RIOS, 1994).

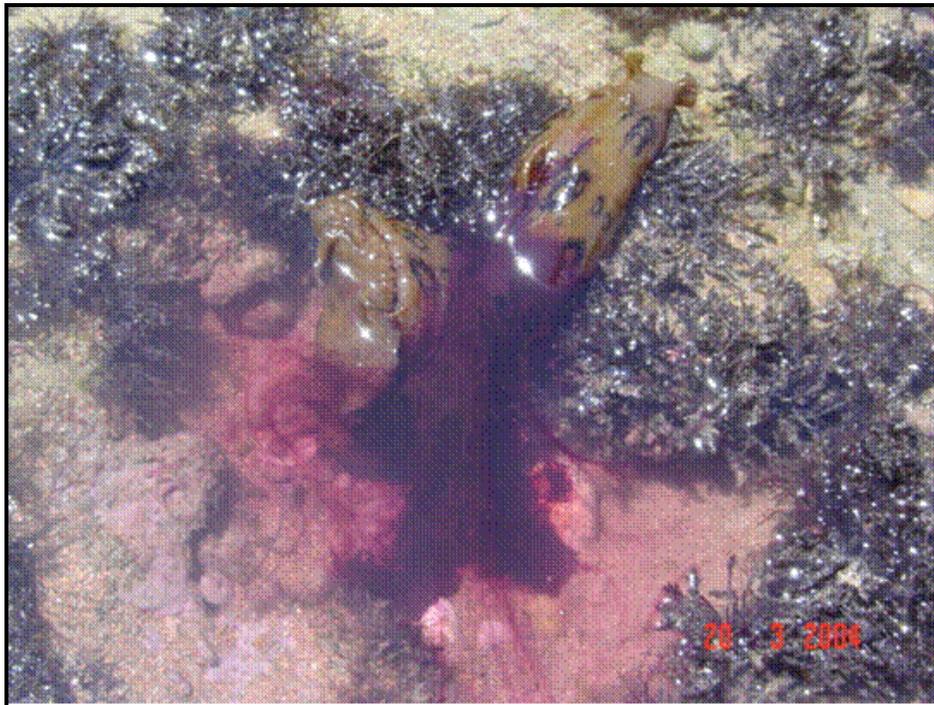


FIGURA 4 – *Aplysia dactylomela* encontrada na praia de Fleixeiras, Trari, Ceará no momento da liberação de tinta.

As aplísias são herbívoras, alimentando-se de macroalgas verdes e vermelhas. Muitas vezes encontradas enterradas em poças de maré baixa, e são mais ativas no período noturno (CAREFOOT, 1989). No litoral cearense, a espécie *A. dactylomela* é geralmente encontrada nas regiões intertidal e sublitoral, onde algas verdes do gênero *Ulva* ocorrem abundantemente, embora se alimentem também de várias algas vermelhas, dependendo da disponibilidade do ambiente (BEZERRA *et al.*, 2004).

O sistema nervoso destes moluscos é muito utilizado em experimentos de neurofisiologia, pelo fato dos seus neurônios serem muito grandes, facilitando a experimentação. São hermafroditas, simultâneos ou protândricos, ocorrendo copulação com dois ou mais indivíduos. A fertilização é interna e a postura dos ovos ocorre na forma de uma fita muscilaginosa muito longa (RUPPERT & BARNES, 1996).

O ciclo de vida das aplísias tem início com a fertilização dos ovos, seguido do período de desenvolvimento embrionário, eclosão dos ovos, desenvolvimento da larva veliger, metamorfose larval, fase juvenil e adulta (KANDEL, 1979).

## 2.7. Proteínas Isoladas de Lesmas-do-Mar

Várias proteínas com diferentes atividades biológicas já foram isoladas de diversas secreções e tecidos das lesmas, como atividades antibacteriana e antineoplásica na glândula de albúmen e em ovos de *A. kurodai*, (KAMIYA *et al.*, 1986, KISUGI *et al.*, 1987) e na secreção da superfície do corpo de *A. juliana* (KAMIYA *et al.*, 1989), bem como atividade antineoplásica no fluido celômico e atividade citolítica na glândula de albúmen, superfície do corpo de *Dolabella auricularia* (KISUGI *et al.*, 1989; IJIMA *et al.*, 2003).

A partir da tinta púrpura de lesmas-do-mar foram isoladas várias proteínas com diferentes atividades biológicas, entre elas atividade antineoplásica e antibacteriana em *Aplysia kurodai*, denominada de Aplysianina-P, citolítica em *Dolabella auricularia*, Dolabelanina-P (YAMAZAKI *et al.*, 1986; 1989; 1990), antibacteriana e antineoplásica em *A. Punctata*, conhecida por APIT (NISTRATOVA *et al.*, 1992; BUTZKE *et al.*, 2004), antibacteriana e hemaglutinante em *A. Dactylomela*, Dactylomelina-P (MELO *et al.*, 1998; 2000), antimicrobiana em *A. Californica*, denominada de Escapina, (YANG, *et al.*, 2005) e

atividade antiviral (RAJAGANAPATHI, *et al.*, 2002b) em *Bursatella leachii*, a Bursatelanina-P.

Segundo MAYER & HAMANN (2005), somente nos anos de 2001-2002 cerca de 106 compostos bioativos têm sido isolados de organismos marinhos, com diferentes atividades biológicas entre elas, antihelmíntico, anticoagulante, antimalarial, antiprotozoário, antituberculose, antitumoral, antiviral, antifúngica e antibacteriana.

A resistência a antimicrobianos em populações bacterianas tem sido um dos grandes problemas enfrentados pela Saúde Pública atualmente. Encontra-se um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de rotina utilizadas em clínicas, mas que apresentam agora resistência à maioria dos fármacos disponíveis no mercado, como demonstrado por várias bactérias multiresistentes.

Fontes promissoras de moléculas candidatas que exibem atividade antimicrobiana tem sido isoladas nos últimos 20 anos de muitas plantas, insetos e outras espécies de animais (ZASLOFF, 2002). É de grande interesse a pesquisa de compostos biologicamente ativos a partir de produtos naturais, já que desde antiguidade, esses recursos são utilizados com propósitos medicinais.

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel das proteínas da tinta da lesma *Aplysia dactylomela* no mecanismo de defesa do animal.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Analisar a composição de proteínas da tinta;
- Purificar e caracterizar a dactylomelina-P;
- Determinar o espectro de ação da dactylomelina-P, sua concentração inibitória mínima e sua interação com a bactéria *Staphylococcus aureus*;
- Determinar as propriedades biológicas da tinta e da dactylomelina-P;
- Verificar o potencial tóxico da dactylomelina-P;
- Determinar a localização da dactylomelina-P no animal;

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Materiais Biológicos

#### 4.1.1. *Aplysia dactylomela*

Os espécimes do molusco *A. dactylomela* foram coletados na praia de Fleixeiras, no município de Trairi, durante marés de sizígea 0,0 ou 0,1 de acordo com a tábua de marés fornecida pela Capitania de Portos do Estado do Ceará.

#### 4.1.2. Microrganismos

As bactérias e fungos utilizados foram provenientes do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.1.3. Coelho, Camundongos e Ratos

Coelho da raça Nova Zelândia com três meses de idade foi utilizado para imunização. O animal foi adquirido junto ao biotério do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Camundongos da raça *swiss* e ratos da raça *wistar* albinos foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

### 4.2. Reagentes e Outros Materiais

#### 4.2.1. Proteínas

Albumina sérica bovina (BSA), Marcadores de massa molecular foram adquiridos da Sigma Co, St Louis, USA.

#### 4.2.2. Meios de Cultura

Agar Nutritivo, Agar Muller-Hinton, Ágar Batata e Caldo Nutritivo foram obtidos da Difco, Becton, Dickinson and Company, USA.

#### 4.2.3. Matrizes para Cromatografias

DE 52 Dietilaminoetil Cellulose e Phenyl Sepharose *Fast Flow* foram adquiridas da Sigma Co, St. Louis, USA e Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia.

#### 4.2.4. Reagentes para Eletroforese

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina), Trizma-base, Metilenobisacrilamida, Acrilamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, Coomassie brilliant blue R-250 e G-250, Nitrato de prata, Sulfato de amônio e demais reagentes foram comprados das empresas Amersham Biosciences, Piscataway, USA, Sigma Chemicals Co, St Louis, USA ou Acros Organics, Geel, Belgium.

#### 4.2.5. Materiais para “Dot” e “Western-blotting”

Membranas de PVDF, anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase e os substratos para peroxidase foram adquiridos da Sigma Co, St. Louis, USA.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Coleta e Tratamento da Tinta

A tinta foi coletada através do simples manuseio de espécimes de *A. dactyломela* encontrados na praia de Fleixeiras, Município de Trairi, Estado do Ceará, em marés de sizígia 0.0 e 0.1. O tratamento inicial da tinta foi feito segundo a metodologia sugerida por MELO *et al.* (2000). Para tanto, o *pool* de tinta foi dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana de diálise de 12 kDa de *cut off*, a 4 °C, e centrifugado a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante foi testado quanto à atividade biológica contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (Item 5.6.1.), armazenado e congelado até o uso.

### 5.2. Eletroforese Bi-Dimensional da Tinta

A eletroforese bidimensional foi realizada segundo metodologia de GÖRG *et al.* (2000). Inicialmente, amostras foram dissolvidas em uma solução de solubilização (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de CHAPS, 25 mM de DTT, 2% de anfólitos pH 4 a 7 e 10 mM de Perfabloc) e homogeneizadas por 30 min, à temperatura ambiente. Para a primeira dimensão, focalização isoeétrica, aproximadamente 20 µg de proteína total foram carregadas diretamente no gel de focalização com gradiente de pH imobilizado, na faixa de 4 a 7 (Immobiline IPG strips – Amersham Bioscience, Piscataway, USA). A focalização das proteínas foi feita em um equipamento Multiphor II (Amersham Pharmacia Biosciences) acoplado a um circulador termostático. A segunda dimensão foi feita com gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS, conforme LAEMMLI (1970), empregando o sistema vertical Hoefer (Amersham Pharmacia Biosciences). A detecção das proteínas resolvidas em 2-D/SDS-PAGE foi feita através da afinidade das proteínas pela prata, conforme BLUM *et al.* (1987). A análise dos géis bi-dimensionais foi feita, inicialmente, através da digitalização das imagens captadas em ScanJet 4C (Hewlett Packard). Os géis foram comparados e os “spots” de proteínas tiveram seus atributos determinados (massa molecular e pI) com o emprego do Software ImageMaster Total Lab (Amersham Bioscience).

### 5.3. Determinação de Proteína

As determinações de proteínas foram realizadas pelo método proposto por BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica (BSA) bovina como padrão.

### 5.4. Purificação da Dactylomelina-P

#### 5.4.1. Precipitação da Tinta com Sulfato de Amônio

A tinta foi tratada com sulfato de amônio até 30 % de saturação. Após descanso de 12 h a 4 °C, a suspensão foi centrifugada, o precipitado foi ressuspenso em Tris-HCl 50mM, pH 7,0 e o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio no intervalo de 30-60 %. A fração 60-90 % foi obtida de forma semelhante. Todas as frações foram dialisadas contra água destilada e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1976) e a ensaios de antibiogramas (BAUER *et al.*, 1966).

#### 5.4.2. Cromatografia de Troca Iônica

A F<sub>30/60%</sub> foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DE 52 dietilaminoetil cellulose (15,5 x 3,5 cm). O gel foi previamente tratado com NaOH 0,5 M por 30 minutos, lavado com água destilada, tratado com HCl 0,5 M por uma hora, lavado novamente com água destilada até que atingisse o pH neutro e, finalmente, equilibrado com o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0. A F<sub>30/60%</sub> foi centrifugada a 15.000 g por 10 minutos a 4 °C e 10 ml do sobrenadante foram aplicados à coluna. Inicialmente a coluna foi percolada com tampão de equilíbrio, sendo em seguida, aplicado NaCl nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 M o equivalente a 2 x o volume da coluna, para eluição de qualquer material adsorvido. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 40 ml/h, sendo coletados 3 ml por tubo. Após a eluição do último pico foram aplicados NaOH 0,5 M, água destilada e HCl 0,5 M, para eluição de algum material ainda ligado. Além das leituras de absorvância a 280 nm, os tubos da cromatografia foram submetidos a ensaios de atividade antibacteriana com

*Staphylococcus aureus*. Os tubos concentrando a atividade antibacteriana (Item 5.6.1.) foram reunidos, dialisados contra água destilada e liofilizados.

#### 5.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

O pico rentendo atividade antibiótica foi submetido a uma cromatografia de interação hidrofóbica em uma coluna de Phenyl Sepharose *Fast Flow* (20 x 1,8 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0 com 1,7 M de sulfato de amônio. A amostra foi dissolvida no tampão de equilíbrio, centrifugada a 15.000 g por 10 minutos a 4 °C e 10 ml do sobrenadante foram aplicados à coluna. Inicialmente a coluna foi percolada com tampão de equilíbrio, sendo em seguida, aplicadas concentrações decrescentes de sal (1,0, 0,2 e 0 M de sulfato de amônio), e finalmente água destilada, para eluição do material adsorvido. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 40 ml/h, sendo coletados 3 ml por tubo. Após a eluição do último pico foi aplicado NaOH 0,5 M para eluição de algum material ainda ligado. As leituras de absorbância foram feitas a 280 nm, os tubos da cromatografia submetidos a ensaios de atividade antibacteriana contra *St. aureus*. Os tubos concentrando a atividade antibacteriana foram reunidos, dialisados contra água destilada e liofilizados.

### 5.5. Caracterização da Dactylomelina-P

#### 5.5.1. Estimativa da Massa Molecular por PAGE-SDS

A massa molecular da dactylomelina-P foi estimada por eletroforese em gel de poli(acrilamida), na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Os géis de aplicação e separação encerravam 5% e 12,5% de acrilamida, respectivamente. A proteína (1mg/ml) foi dissolvida em Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS, glicerol, azul de bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol, aquecida a 100 °C, durante 10 minutos, e centrifugada a 10.000 g durante 5 minutos, a 4 °C. Foram aplicados 20  $\mu$ l por poço e a corrida conduzida a uma corrente constante de 20 mA por placa, durante

1,5 hora. As bandas protéicas foram visualizadas corando-se os géis com uma solução a 0,25 % de azul brilhante de Coomassie R-250. Em seguida, fez-se a descoloração com uma mistura de ácido acético, metanol e água (1:3:7). A massa molecular aparente da dactylomelina-P foi estimada a partir da curva padrão construída com os Rfs, calculados segundo as especificações do fabricante (Sigma Co, St Louis, USA), dos seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24,0 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa), lisozima (14,3 kDa).

#### 5.5.2. Determinação do Ponto Isoelétrico

O ponto isoelétrico da dactylomelina-P foi determinado por eletroforese bidimensional como descrito no item 5.2.

#### 5.5.3. Composição de Aminoácidos

A análise de aminoácidos da proteína foi conduzida em um sistema Biochrom 20 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia). A amostra de proteína liofilizada foi hidrolisada com HCl 6 N (1 ml), contendo 1% (m/v) de fenol. A hidrólise foi feita em ampolas de vidro seladas, sob atmosfera de Nitrogênio, a 110 °C em estufa, durante 22 horas. Após a hidrólise, a ampola foi aberta e o HCl e fenol evaporados, sob pressão reduzida, em presença de NaOH. O hidrolisado foi lavado com água grau milli-Q e seco sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo. Depois de seca, a amostra foi redissolvida em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m (Millipore) e submetida à análise. O conteúdo de aminoácidos foi determinado pelo método de SPACKMAN *et al.* (1958), adaptado para o uso do Sistema Biochrom 20 da Pharmacia-LKB.

#### 5.5.4. Determinação de Carboidratos

O conteúdo de carboidrato da proteína foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), no qual se utiliza uma curva padrão de glucose como referência. A natureza glicoprotéica da proteína também foi avaliada por coloração pelo ácido periódico de Schiff, realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo do “Kit de detecção de glicoproteína da Sigma” (JAY *et al.*, 1990).

#### 5.5.5. Estabilidade Térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da proteína, uma solução de 1mg/ml foi preparada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 foi aquecida a 45, 50, 55 e 60 °C, em banho-maria. A cada 5 minutos, durante o intervalo de 1 hora, foram retiradas alíquotas, que após serem imediatamente resfriadas, foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, e os sobrenadantes utilizados em ensaios de atividade antibacteriana, pelo método de difusão com discos contra *St. aureus* (BAUER *et al.*, 1966).

#### 5.5.6. Influência do pH na Atividade da Proteína

A estabilidade da proteína em diferentes pHs foi avaliada dissolvendo-se a proteína liofilizada nos seguintes tampões: Glicina-HCl 0,05 M, pH 2,0 e 3,0; Acetato de Sódio 0,05 M, pH 4,0 e 5,0; Tris-HCl 0,05 M, pH 6,0 e 7,0; Glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,0 e 10,0 e Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 11,0 e 12,0. As amostras (100 µg/ml) foram mantidas, nestas condições, a 4 °C por 30 min (KAMIYA *et al.*, 1989). Após este período, as soluções foram dialisadas exaustivamente contra tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0, liofilizadas e, então, testadas em ensaio de atividade antibacteriana contra *St. aureus*, como descrito anteriormente.

#### 5.5.7. Resistência a Protease

Uma amostra de proteína encerrando 1mg/ml foi incubada com 1mg de protease inespecífica (Sigma Co, St Louis, USA) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 à

temperatura ambiente por 18 horas. Após a incubação esta amostra foi submetida a ensaios de atividade antibacteriana contra *St. aureus* (RAJAGANAPATHI *et al.*, 2002).

## 5.6. Atividades Biológicas da Tinta e da Dactylomelina-P

### 5.6.1. Atividade Antibacteriana em Meio Sólido

Os ensaios de atividade antibacteriana da tinta e da dactylomelina-P foram realizados pelo método de difusão em discos descrito por BAUER *et al.* (1966). Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Sarcina* sp. Entre as bactérias Gram-negativas testadas estavam *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *E. gergoviae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, também foram testadas cepas de bactérias marinhas, isoladas do ambiente onde as lesmas foram encontradas. Culturas de bactérias na concentração de  $10^7$  UFC/ml foram semeadas em placas de ágar Muller-Hinton. Em seguida, discos de papel de filtro embebidos com 30  $\mu$ l da amostra (100  $\mu$ gP/ml) foram colocados sobre o meio, sendo as placas então incubadas a 37 °C por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela formação de halos de inibição ao redor dos discos.

### 5.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Mecanismo de Ação

A concentração inibitória mínima foi determinada segundo NAKAJIMA *et al.* (2003) com modificações. Inicialmente, a turbidez de uma cultura de *St. aureus* de 18 h foi ajustada para uma absorbância de 0,01 a 600 nm ( $10^6$  células) em espectrofotômetro, e essa cultura diluída 1000x com o próprio meio antes do uso. Para o ensaio, uma solução encerrando 1 mg/ml de dactylomelina-P foi diluída seriadamente (1:2; 1:4; 1:8...) em caldo nutritivo em tubos. 90  $\mu$ l de cada diluição foram incubados com 10  $\mu$ l da cultura a 35°C, por 18 h. Após o período de incubação, o crescimento da bactéria foi estimado através de comparação da turbidez com a cultura controle. Após a determinação da CIM, foi

verificado o mecanismo de ação, se bactericida ou bacteriostático. Para tanto as células foram subcultivadas em meio sem a proteína, e incubadas a 35 °C, por 24 horas, e o crescimento observado através da presença ou ausência de turbidez.

A concentração inibitória mínima também foi determinada pelo método de difusão com discos pelo método de BAUER *et al.* (1966), como descrito previamente.

### 5.6.3. Atividade Antifúngica em Meio Sólido

Os ensaios de atividade antifúngica da tinta e da dactylomelina-P foram realizados pelo método de difusão em discos descrito por BAUER *et al.* (1966) para leveduras. As cepas utilizadas nos ensaios foram *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. parapsilosis*, *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis-similar* e *Saccharomyces cerevisiae*. Culturas de leveduras em concentração de  $10^7$  células/ml foram semeadas em placas de ágar Batata. Em seguida, discos de papel de filtro embebidos com 30 µl das amostras (1 mgP/ml) foram colocados sobre o meio, sendo as placas então incubadas a 37 °C por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela formação de halos ao redor dos discos.

Para os ensaios com fungos filamentosos, realizados segundo ROBERTS & SELITRENNIKOFF (1990), foram usados: *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. musae*, *C. gloesporioides*, *C. truncatum*, *C. kikuchi*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. chevalier*, *Penicillium hergeui*, *P. oligandrum*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp., *Dreschlera* sp., *Neurospora* sp., *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp. As culturas de fungos foram inoculadas como pelets de 8 mm no centro de placas de ágar Batata. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 48 horas ou mais, dependendo da velocidade de crescimento de cada fungo. Após o crescimento inicial, discos de papel de filtro embebidos com 30 µl das amostras (1 mgP/ml) foram colocados sobre o meio, a aproximadamente 5 mm da borda. As placas foram novamente incubadas a temperatura ambiente até o crescimento restante dos fungos em presença da proteína. A formação de halos ao redor dos discos indicou inibição do crescimento fúngico.

#### 5.6.4. Atividade Antifúngica em Meio Líquido

Para o ensaio de atividade antifúngica em meio líquido, foram testados os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. musae*, *Aspergillus niger*, *Neurospora* sp., *Mucor* sp., *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Para a extração de esporos, inóculos dos fungos filamentosos foram colocados no centro de placas de Petri contendo ágar Batata e mantidos em temperatura ambiente por vários dias, dependendo da velocidade de crescimento de cada espécie. Após o período de crescimento, foram espalhados 5 ml de solução de NaCl 0,15 M estéril sobre o crescimento micelial. Uma alíquota de cada suspensão de esporos resultante foi quantificada em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para  $3 \times 10^6$  esporos/ml. Para cada amostra, foram adicionados 50 µl da suspensão de esporos em 250 µl da proteína em caldo malte e outros 50 µl de esporos em 250 µl de caldo malte, usado como controle. Como controle positivo foi utilizado a tinta púrpura (BARREIRA, 2003). Os tubos de *eppendorf* contendo as amostras foram incubados em temperatura ambiente durante 72 horas. Em seguida, foram centrifugados a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, descartando-se os sobrenadantes e adicionando água destilada para retirar o excesso de amostra. Após nova centrifugação, os precipitados foram usados no preparo de lâminas coradas com lactofenol azul de algodão para análise em microscópio óptico.

Para os ensaios em meio líquido com as leveduras foram utilizados os microrganismos: *Candida tropicalis*, *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*. Para cada amostra, foram adicionados 50 µl da cultura de levedura ( $2 \times 10^6$  cél/ml) em 250 µl da proteína em caldo malte e outros 50 µl da cultura de levedura em 250 µl de caldo malte, usado como controle. Os tubos contendo as amostras foram incubados em temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, foram observadas a turbidez das culturas em comparação com o controle e além da observação do crescimento no subcultivo em agar batata.

#### 5.6.5. Extração dos Peptídeos da Tinta

A secreção foi inicialmente precipitada com sulfato de amônio para obtenção da fração  $F_{0/70\%}$  de saturação. Em seguida, esta fração foi submetida à centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C e o precipitado ressuspenso em 5 ml de água destilada. Este extrato foi levado ao banho-maria a 80 °C por 15 minutos e centrifugado novamente a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado e o sobrenadante foram então submetidos à diálise em membrana de 1 kDa de *cut off* e liofilizados para posteriormente serem submetidos a ensaios de atividade antibiótica (TERRAS *et al.*, 1992).

#### 5.6.6. Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada segundo a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977), adaptada para o uso de tubos de ensaio. As amostras de proteína (1mg/ml) e tinta bruta foram diluídas seriadamente com NaCl 0,15 M (1:2; 1:4; 1:8.; 1:16 etc) e cada diluição foi misturada (1:1) com uma suspensão a 2 % de eritrócitos de coelho, camundongos e ratos, tratados previamente com protease. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 minutos e, depois, por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2.000 g por 1 minuto e a aglutinação visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como título de hemaglutinação, o qual foi definido como o recíproco da maior diluição que é capaz de provocar aglutinação visível, ou como a quantidade mínima de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) capaz de induzir aglutinação visível. Essa concentração foi denotada como uma unidade de atividade hemaglutinante (UH).

#### 5.6.7. Atividade Anticoagulante

O ensaio de pesquisa de atividade anticoagulante foi realizado de acordo com a descrição de RAJAGANAPATHI & KATHIRESAN (2002), com algumas modificações. Foi utilizado neste ensaio sangue total de rato, onde determinou-se o tempo de coagulação

imediatamente após sua retirada. A tinta púrpura e a dactylomelina-P foram ressuspensos em NaCl 0,15 M (1mgP/ml) e adicionado 1 ml do sangue em cada amostra.

O tempo de coagulação sanguínea de cada amostra foi cronometrado imediatamente após a adição de sangue.

#### 5.6.8. Determinação da Atividade $\beta$ -1,3 Glucanásica

##### 5.6.8.1. Preparação do Reagente de Cobre

O reagente de cobre para determinação de açúcares redutores foi preparado segundo metodologia descrita por SOMOGY (1952). A preparação envolve inicialmente a mistura de 24 g de carbonato de sódio e 12 g de tartarato de potássio dissolvidos em 250 ml de água destilada. Em seguida 40 ml de uma solução a 10 % de sulfato de cobre foram adicionados à mistura, seguidos pela adição de 16 g de bicarbonato de sódio. Após preparação desta solução, uma solução de sulfato de sódio (0,05 M) em 500 ml de água destilada foi fervida por 5 minutos e deixada resfriar até a temperatura ambiente. Em seguida as duas soluções foram reunidas e o volume levado a 1000 ml.

##### 5.6.8.2. Preparação do Reagente de Arsenomolibdato

O reagente de arsenomolibdato foi preparado segundo metodologia descrita por NELSON (1944). Inicialmente 25 g de molibdato de amônio foram dissolvidos em 450 ml de água destilada adicionando-se 21 ml de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida 3 g de arsenato de sódio dissolvidos em 25 ml de água destilada foram adicionados à solução. A mistura foi incubada a 37 °C em estufa por 48 horas.

##### 5.6.8.3. Ensaio para $\beta$ -1,3 Glucanase

A determinação da atividade  $\beta$ -1,3 glucanásica na solução de proteína (1mg/ml) foi feita segundo metodologia descrita por FINK *et al.* (1988). O meio de reação foi composto por 50  $\mu$ l da amostra, 125  $\mu$ l de laminarina (2 mg/ml em tampão acetato de sódio

50 mM, pH 5,0) e levado a um volume final de 500 µl com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A mistura foi incubada a 37 °C em estufa por 12 horas. Após o período de incubação foram adicionados 500 µl do reagente de cobre e a mistura fervida em banho-maria por 10 minutos, deixada à temperatura ambiente e adicionados 1000 µl do reagente de arsenomolibdato. A densidade óptica foi medida a 500 nm. As provas em branco foram feitas de maneira semelhante, com exclusão da laminarina que foi substituída pelo tampão de ensaio. Uma unidade de atividade glucanásica foi definida como sendo a concentração da enzima que fornece uma absorbância de 0,001 quando lida a 500 nm.

#### 5.6.9. Análise de Atividade Quitinásica

A análise da atividade quitinásica foi determinada por fluorimetria. A solução estoque do substrato (4-metilumbeliferil-β-D-N'-N''-N'''-triacetilQuitotri-ose) foi preparada segundo O'BRIEN & COLWELL (1987). A reação padrão foi feita pela adição de 50 µl de amostra e 5 µL da solução do substrato em presença de 2 ml de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 à temperatura ambiente. A metilumbeliferona liberada foi medida em espectrofluorímetro utilizando-se um filtro primário (excitação 320 nm) e um filtro secundário (emissão 460 nm). Uma unidade da atividade foi definida como 1 nmol de metilumbeliferona liberada por minuto.

#### 5.6.10. Detecção de Atividade Quitinásica Inespecífica em SDS-PAGE

A detecção de atividade quitinásica em gel foi feita segundo a metodologia descrita por TRUDEL & ASSELIN (1989). Uma eletroforese em gel de poliacrilamida seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970) foi realizada, porém para este ensaio o gel continha ainda 200 µl de glicolquitina 1 %. Após a corrida, o gel foi incubado por 24 horas a 37 °C com tampão acetato 0,1 M pH 5,0 contendo 1 % de Triton X-100 (preparada imediatamente antes do uso). Ao término da incubação, o gel foi lavado em solução reveladora (calcofluor 0,01 % em 0,5 M Tris-HCl pH 8,9, recém preparada). Após 5 minutos, a solução reveladora foi retirada e o gel incubado em água destilada por 1 hora à temperatura ambiente. Para a visualização do resultado, o gel foi exposto à luz UV.

## 5.7. Avaliação do Potencial Tóxico da Dactylomelina-P

### 5.7.1. Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica da proteína foi investigada segundo descrito por BERNHEIMER (1988) e MERKER & LEVINE (1986) com algumas modificações. Suspensões de eritrócitos de camundongos, ratos e coelhos a 1 % foram diluídas em proporção de 1:10 (p/v) em NaCl 0,15 M contendo várias concentrações da proteína. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora. O grau de hemólise foi calculado pela liberação de hemoglobina, medida por absorbância a 540 nm, após centrifugação a 1000 g por 5 minutos. A lise completa (100 %) foi obtida por diluição da suspensão de células com água destilada e/ou ainda um controle negativo com solução de NaCl 0,15 M. Uma unidade hemolítica foi definida como a concentração de proteína requerida para produzir 50 % de hemólise em suspensão de células a 1 % durante 1 hora.

### 5.7.2. Atividade Citotóxica

A citotoxicidade da dactylomelina-P foi avaliada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983). Foram utilizadas 4 placas de 96 cavidades por experimento, uma para cada linhagem celular, do Instituto nacional do Câncer, MD (USA), nas seguintes concentrações (células/ml): MDA/MB-435 (carcinoma mamário humano), CEM (leucemia linfocítica):  $0,1 \times 10^6$ ; HCT-8 (carcinoma de cólon):  $0,7 \times 10^5$  e HL-60 (leucemia):  $0,3 \times 10^6$ . As substâncias previamente diluídas em DMSO foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,39-25 µg/ml) sendo adicionado 100 µl por poço. Após o período de incubação de 72 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µl da solução de MTT 10 % em RPMI, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante aspirado e o precipitado ressuspensionado em 150 µl de DMSO e agitado por 10 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm.

A análise do MTT determina a viabilidade metabólica das células pela análise da atividade redutiva mitocondrial. Foi descrito primeiramente por MOSMANN (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico de uma célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial, nas células metabolicamente ativas em um cristal azul/preto. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

### 5.7.3. Atividade Tóxica em Camundongos

Camundongos pesando entre 20–25 g foram usados para avaliação da toxicidade aguda por via intraperitoneal. Os camundongos foram observados num intervalo de 48 h após a administração da dactylomelina-P. A toxicidade foi expressa em mg de proteína/Kg de massa corpórea necessária para produzir morte em 50 % dos animais testados (LITCHIFIELD & WILCOXON, 1949).

## 5.8. Localização da Dactylomelina-P na Lesma *Aplysia dactylomela*

### 5.8.1. Produção de Anticorpos Policlonais

A dactylomelina-P foi acumulada para fabricação de anticorpos policlonais em coelho, que foram usados nos estudos de imunolocalização. Um coelho albino de três meses de idade da raça Nova Zelândia foi inicialmente submetido à sangria através de um corte na veia marginal da orelha. O sangue foi deixado coagular a temperatura ambiente e o soro recolhido centrifugado a 3000 g por 2 minutos. Após este procedimento, o soro clarificado e livre de hemácias foi armazenado a -20 °C. O animal foi imunizado, por via intramuscular, com a proteína, na concentração de 1 mgP/ml (0,5 ml de NaCl 0,15 M + 0,5 ml de adjuvante completo de Freund). Após 14 dias da

imunização foi aplicado um reforço por via subcutânea de 1mgP/ml, mas sem adjuvante. A partir do primeiro reforço, foram aplicadas doses semanais nas mesmas condições. O coelho foi sangrado nos dias 21, 28, 35 e 42 para obtenção dos soros imunes.

### 5.8.2. Determinação dos Títulos dos Soros Anti-Dactylomelina-P

A determinação dos títulos de anticorpos foi realizada pela técnica do *Dot blot*. Para tanto, 10 µl das soluções de proteína foram aplicados sobre membranas de PVDF. Em seguida, as membranas foram incubadas nos soros anti-dactylomelina-P puros e diluídos, incubadas por 2 horas a 37 °C. As membranas foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 % de leite desnatado e 0,05 % de Tween 20, a intervalos de 10 minutos. Após a lavagem, foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase), a 37 °C, por 1 hora. Foram feitas novas lavagens e ao término, foi adicionada a solução reveladora (OPD e peróxido de hidrogênio, Sigma Chemicals Co, St Louis, USA) preparada de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram lavadas com água grau milli-Q, secas e os títulos estimados. Provas em branco foram feitas substituindo-se os imunossoros pelo soro pré-imune.

### 5.8.3. Estudos de Imunolocalização

#### 5.8.3.1. Preparação de Extratos da Hemolinfa e de Órgãos da *Aplysia dactylomela*

Inicialmente, a hemolinfa foi retirada com seringa da cavidade do coração da lesma. O animal foi colocado no refrigerador para diminuir seu metabolismo de forma a facilitar a sua dissecação. Foram retirados, cuidadosamente, a glândula de tinta, glândula opalina, glândula digestiva, glândula de albúmen, papo e coração. Esses órgãos foram macerados em gral com 5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 0,15 M de NaCl. Após maceração, os extratos foram centrifugados a 15.000 g por 10 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante. A hemolinfa foi diluída 1:2 no tampão e centrifugada nas mesmas

condições dos sobrenadantes. Esses extratos foram utilizados para determinação de proteínas e ensaios imunológicos.

#### 5.8.3.2. *Western blot*

A presença da dactylomelina-P na hemolinfa e/ou nos demais órgãos da *A. dactylomela* foi estudada pela técnica de *western blot* de acordo com a metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979). Após eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma unidade de transferência semi-seca (Multiphor II, Pharmacia). A eletrotransferência foi feita a corrente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup>, por 4 horas. A eficiência da transferência foi checada corando-se as membranas com vermelho de Ponceau 0,5 % até o aparecimento das bandas protéicas. Em seguida, a membrana foi lavada com água grau milli-Q para remoção do corante e procedeu-se o ensaio imunológico.

A membrana foi bloqueada durante 1 hora, à temperatura ambiente, com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e leite em pó desnatado 2 % (m/v). Em seguida, foi incubada com anticorpo anti-dactylomelina-P diluído (1:100) no tampão bloqueador por 16 horas, sob refrigeração. Após a incubação, a membrana foi lavada 4x, a intervalos de 10 minutos com o mesmo tampão, isento de leite. A membrana foi, então, incubada com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase), diluído (1:500) no tampão bloqueador, por 2 horas, à temperatura ambiente, após o que, foi lavada como anteriormente. A reação foi visualizada após adição da solução reveladora (OPD e peróxido de hidrogênio, Sigma Chemicals Co, St Louis, USA), preparada de acordo com as instruções do fabricante. Após o aparecimento da cor, a membrana foi lavada com água grau milli-Q, secas e guardadas ao abrigo da luz, até serem fotografadas.

### 5.8.3.3. Localização da Dactylomelina-P na Glândula de Tinta por Imunohistoquímica

Glândulas de tinta retiradas de animais recém dissecados foram embebidas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 preparado em água do mar estéril por 1 h e, então fixada por 2 h, no mesmo tampão contendo 4 % paraformaldeído e 0,01 % glutaraldeído. Após a fixação, o material passou por três lavagens (de 1 h cada) em tampão calcodilato de sódio 50 mM pH 7,2 e foi desidratado e infiltrado com resina LR *Gold*. Para desidratação e infiltração as amostras foram incubadas em concentrações crescentes de metanol e posteriormente de LR *Gold* (ao abrigo da luz), da seguinte forma: metanol 50 % por 30 minutos, metanol 70 % por 1 hora, metanol 90 % por 1 hora, metanol 50 % + 50 % de LR *Gold* por 4 horas, metanol 30 % + 70 % de LR *Gold* por 18 horas e 100 % de LR *Gold*, por 3 dias. Após esse período, as amostras foram deixadas polimerizar em resina LR *Gold* contendo 0,05 % de benzil e 0,05 % de peróxido de benzoil (catalizadores) sob a incidência de luz branca por um período de 5 dias. Todas as etapas foram feitas a - 20 ° C.

Uma vez emblocadas, as amostras foram seccionadas em micrótomo de navalhas de aço. Cortes seriados de 1 a 3 µm de espessura foram coletados em lâminas e, montados para análise histoquímica. Os cortes foram incubados em cloreto de amônio 50 mM pH 5,05 por 30 min, para bloqueio de carga., incubados em tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e BSA 1 % por 20 min para bloqueio de sítios não específicos e, depois, com o soro pré-imune de coelho (1:100) em PBS-BSA por 20 min. Ao final, foi adicionado o anticorpo anti-dactylomelina-P (1:50, 1:100) em PBS-BSA por 2 h, em câmara úmida. O material foi lavado com PBS-BSA (10x, 10 minutos). Após as lavagens, o material foi incubado, em câmara úmida, com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho 1:100 conjugado com ouro coloidal 10 nm) em PBS-BSA por 2 h. O material foi novamente lavado com PBS-BSA (10x, 10 minutos), com PBS (2x, 10 minutos) e, finalmente, lavado com água grau milli-Q (2x, 10 minutos).

Após esses procedimentos, foi retirado o excesso de água das lâminas e feita a revelação da reação imunológica através da precipitação de prata, reunindo quantidades iguais de cada um dos substratos adquiridos comercialmente (*Kit Inten SE<sup>TM</sup>BL Silver enhancement*) e a mistura vertida sobre as lâminas. Após 8 min, as lâminas foram lavadas,

abundantemente com água destilada, secas e observadas em microscópio óptico de campo claro. As provas controles de marcação foram feitas usando o soro pré-imune de coelho.

#### 5.9. Interação da Dactylomelina-P com a bactéria *Staphylococcus aureus* por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A interação da dactylomelina-P com a bactéria *St. aureus* foi visualizada em microscópio eletrônico de transmissão. As células foram pré-incubadas com a dactylomelina-P (500µg/ml) e lavadas, sob centrifugação, com Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 (5x). Em seguida, foram lavadas 3 vezes (10 minutos) com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3. As células foram, então, fixadas com uma solução 0,1 % de glutaraldeído e 2 % de paraformaldeído preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, foram novamente lavadas com o tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3, como anteriormente. O material foi desidratado em uma série de metanol a 30 % (30 min), 70 % (1h) e 90 % (1 h), à temperatura ambiente e infiltrado em resina LR *Gold*: 50 % de metanol e 50 % de resina (1 h), 30 % de metanol e 70 % de resina (7 h) e 100 % de resina (12 h) em câmara fria a -20 °C. O material foi incluído em resina contendo catalisador, por um período de 4 dias, a -20 °C, realizando-se trocas a cada 24 horas. Após este tratamento, o material foi polimerizado na presença de luz ultravioleta, a -20 °C, cortado em secções ultrafinas (60nm) e colocadas sobre grades de níquel forradas com filme *formvar* cobertas com carbono. O material foi incubado com tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM, pH 7,4 com NaCl 0,15 M e 1 % de BSA por 30 minutos e depois, com o anticorpo anti-dactylomelina-P (1:100) por 2 horas. Foram feitas lavagens com PBS-BSA (5x, 10 minutos). Após as lavagens o material foi incubado com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho *Gold* (1:50) por 2 horas. O material foi novamente lavado PBS-BSA (5x, 10 minutos) e com água deionizada (5x, 5 minutos). Provas de automarcação foram feitas substituindo-se o anticorpo anti-dactylomelina-P pelo soro pré-imune. A observação e confecção das micrografias foram feitas em um microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS 900).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Composição de Proteínas da Tinta de *A. dactylomela*

A análise da tinta por eletroforese bi-dimensional revelou a presença de aproximadamente 41 “spots” de proteínas (Figura 5) com predominância de pontos isoelétricos ácidos e massa moleculares abaixo de 70 kDa. Três regiões do gel merecem destaque: a primeira na faixa de 60 kDa e pI 5,0, onde se observa a presença de um único “spot” forte e arrastado; a segunda região onde se concentram a maioria das proteínas, com massas abaixo de 30 kDa e pIs entre 4,0 e 5,0 e a terceira na região de baixa massa molecular e pI próximo a pH 7,0, onde se destaca um “spot” proeminente em torno de 15 kDa.

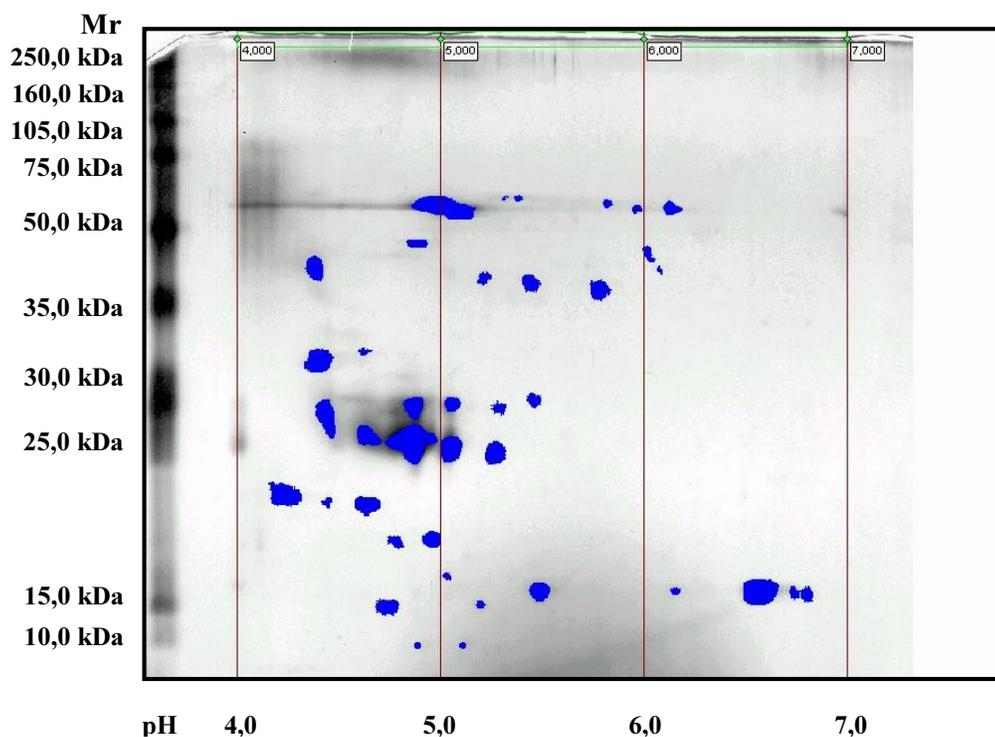


FIGURA 5 – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida da tinta (20 µgP) de *A. dactylomela*. A focalização isoelétrica da amostra foi feita em membrana de pHs 4,0 a 7,0. Marcadores de massa molecular: 250 kDa, 160 kDa, 105 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 15 kDa e 10 kDa.

## 6.2. Purificação da Dactylomelina-P

Antes de iniciar a purificação da dactylomelina-P, a tinta bruta foi dialisada exaustivamente contra água destilada, para eliminação de substâncias de baixas massas moleculares e pigmentos. A tinta dialisada foi submetida a um ensaio preliminar de atividade antibacteriana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a fim de confirmar a reatividade do princípio ativo.

A purificação da dactylomelina-P foi feita de acordo com a metodologia descrita por MELO *et al.* (2000), com modificações. A tinta dialisada foi precipitada com sulfato de amônio para obtenção da fração 30-60%, rica em dactylomelina-P, e submetida à cromatografia de troca iônica seguida de interação hidrofóbica.

Os resultados das determinações de proteína e atividades antibacteriana das frações obtidas da precipitação estão mostrados na tabela 1.

TABELA 1 – Teor de proteínas e atividade antibacteriana contra *St. aureus* das frações protéicas obtidas a partir da precipitação da tinta de *A. dactylomela* com sulfato de amônio.

<b>Frações</b>	<b>Proteína Total (mg/100 ml de Tinta)</b>	<b>Diâmetro do halo (mm) (30 µl/disco)</b>
<b>F<sub>0/30%</sub></b>	<b>42,1</b>	<b>15</b>
<b>F<sub>30/60%</sub></b>	<b>140,5</b>	<b>18</b>
<b>F<sub>60/90%</sub></b>	<b>0,76</b>	<b>0</b>
<b>Sob. Final</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Os resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Melo *et al.* (2000), com as frações 0-30% e 30-60% detendo toda a atividade antibacteriana (Figura 6). Entretanto, como a fração 30-60% é mais potente e concentra três vezes mais proteínas, esta foi utilizada para a purificação da dactylomelina-P.

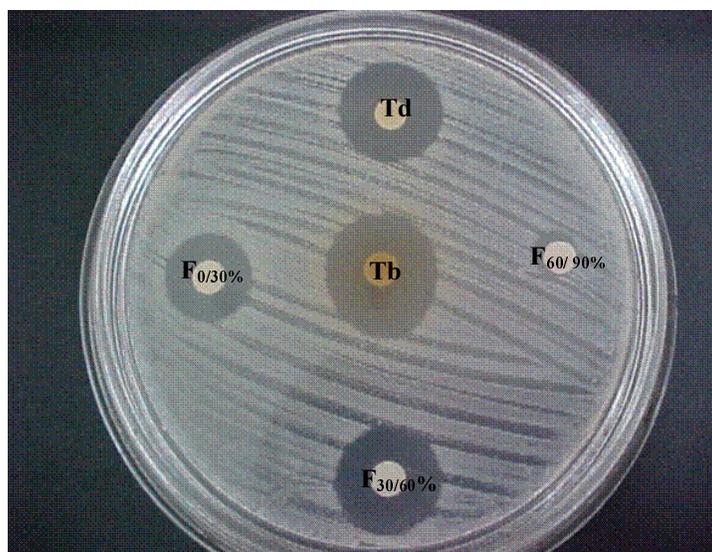


FIGURA 6 – Atividade das frações protéicas e da tinta de *A. dactylomela* contra a bactéria *St. aureus*. Tb: tinta bruta; Td: tinta dialisada; Frações obtidas por fracionamento da tinta com sulfato de amônio: F<sub>0/30%</sub>, F<sub>30/60%</sub> e F<sub>60/90%</sub>. Todos os discos receberam uma alíquota de 30  $\mu$ l.

O resultado da cromatografia de troca iônica da fração 30-60% está mostrado na Figura 7. Foram obtidos quatro picos, eluídos sequencialmente com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 contendo 0,2 M , 0,5, e 1,0 de NaCl, e NaOH 0,5 M. A cromatografia foi monitorada através de medidas de absorbância a 280 nm e atividade antibacteriana contra *St. aureus*.

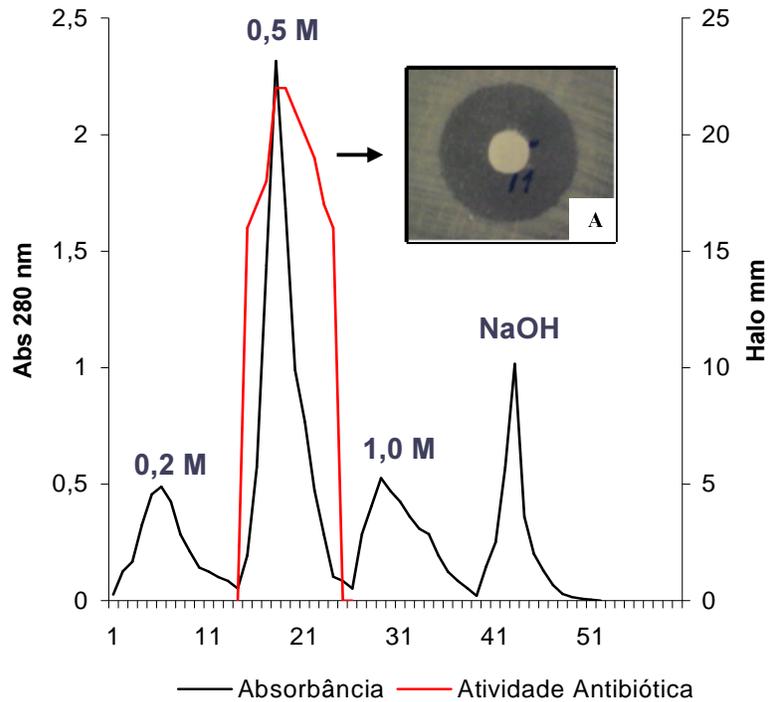


FIGURA 7 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DE52-Metilcelulose da F<sub>30/60%</sub> obtida pela precipitação da tinta de *A. dactylomela* com sulfato de amônio. 60 mg de proteínas da fração foram dissolvidos em 10 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, e aplicados a coluna (15,5 x 3,5 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. O pico (DEII) foi eluído com 0,5 M de NaCl incluído no tampão. Foram coletadas frações de 3,0 ml/tubo a um fluxo constante de 40 ml/h. Absorbância (A<sub>280nm</sub>). Atividade antibiótica (medida em mm do halo de inibição de *St. aureus*).

O pico DE-II, concentrando toda a atividade antibiótica, foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose. O resultado desta cromatografia está mostrado na Figura 8. Inicialmente foi aplicado o mesmo tampão de equilíbrio, tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 contendo 1,7 M de sulfato de amônio, seguido da eluição com este tampão mas com 0,2 M de sal. Após a saída do primeiro pico e da leitura voltar a linha de base, foram aplicados nesta ordem, tampão sem sal, água destilada

e NaOH 0,5 M. A cromatografia foi monitorada através de medidas de absorvância a 280 nm e atividade antibacteriana contra *St. aureus*.

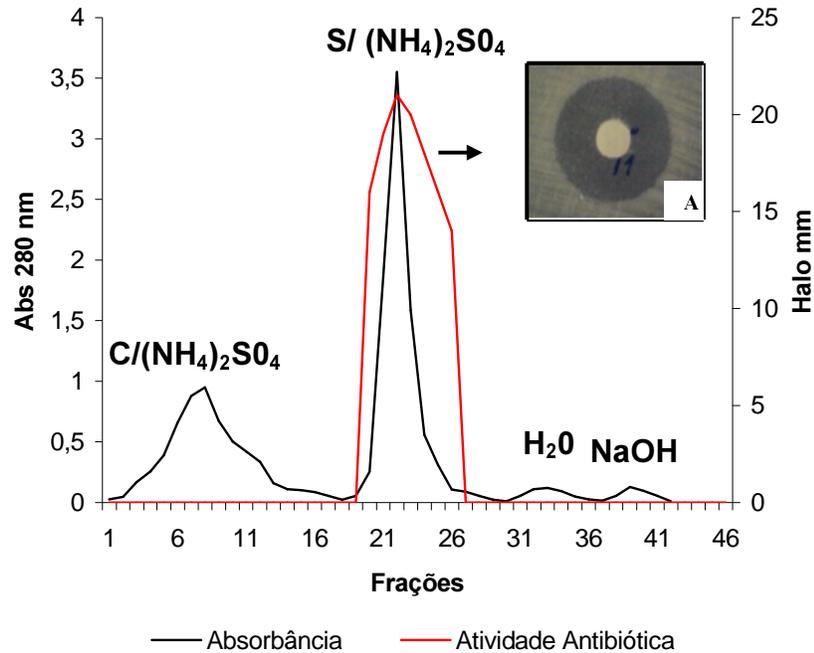


FIGURA 8 – Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose do pico DEII obtido da cromatografia de troca iônica. 10,0 mg de proteínas foram dissolvidos em 5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, com 1,7 M de sulfato de amônio e aplicados a coluna (10,0 x 2,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. O pico (PHSII) foi eluído com tampão sem sulfato de amônio. Foram coletadas frações de 3,0 ml/tubo a um fluxo constante de 40 ml/h. Absorvância ( $A_{280\text{nm}}$ ). Atividade antibiótica (medida em mm do halo de inibição de *St. aureus*).

Os teores de proteínas dos picos das cromatografias estão mostrados Tabela 2.

TABELA 2 – Purificação<sup>a</sup> da proteína com atividade antibacteriana da tinta de *Aplysia dactylomela*.

Fração <sup>a</sup>	Proteína <sup>b</sup>		Atividade Antibacteriana
	mgP/100ml	mg/ml <sup>c</sup>	Índice de Purificação <sup>d</sup>
Tinta bruta	241	2,4	1,0
F <sub>30-60%</sub>	140	0,8	3,0
DEII	103	0,05	48,0
PHSII <sup>c</sup> (dactylomelina-P)	25	0,010	240

<sup>a</sup> Estágios de purificação como descritos em Métodos.

<sup>b</sup> mg de proteína referente a 100 ml de tinta.

<sup>c</sup> Concentração de proteína capaz de inibir o crescimento de *St. aureus* com formação de halo de inibição de 16-18 mm.

<sup>d</sup> Índice de purificação calculado a partir da razão entre concentrações da tinta pelas frações protéicas.

<sup>e</sup> Dactylomelina-P isolada por cromatografia de interação hidrofóbica em gel de Phenyl-Sepharose.

Os ensaios de atividade antibacteriana das frações e picos das cromatografias estão reunidos na Figura 9 e a estratégia de purificação utilizada está sumarizada na Figura 10.

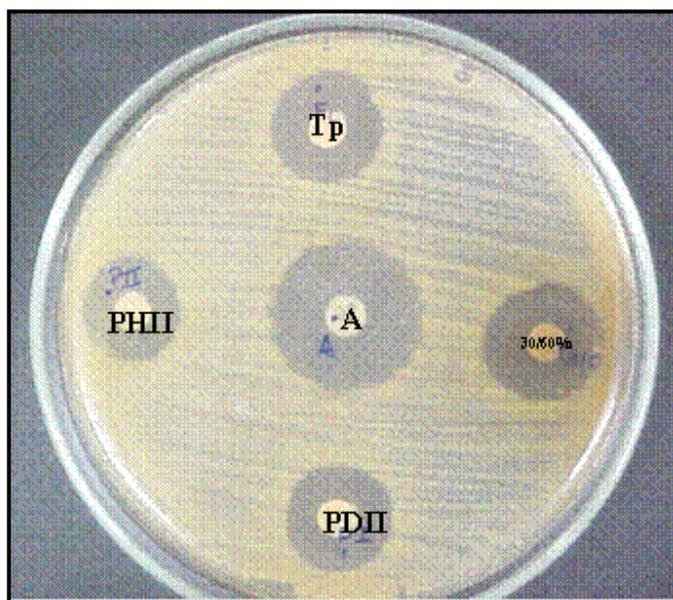


FIGURA 9 – Atividade dos picos obtidos das cromatografias de troca iônica (DEII), interação hidrofóbica (PHSII), da F<sub>30/60</sub> % e da tinta (Tp) do molusco *A. dactylomela* contra bactéria *St. aureus*. A: antibiótico controle: Vancomicina.

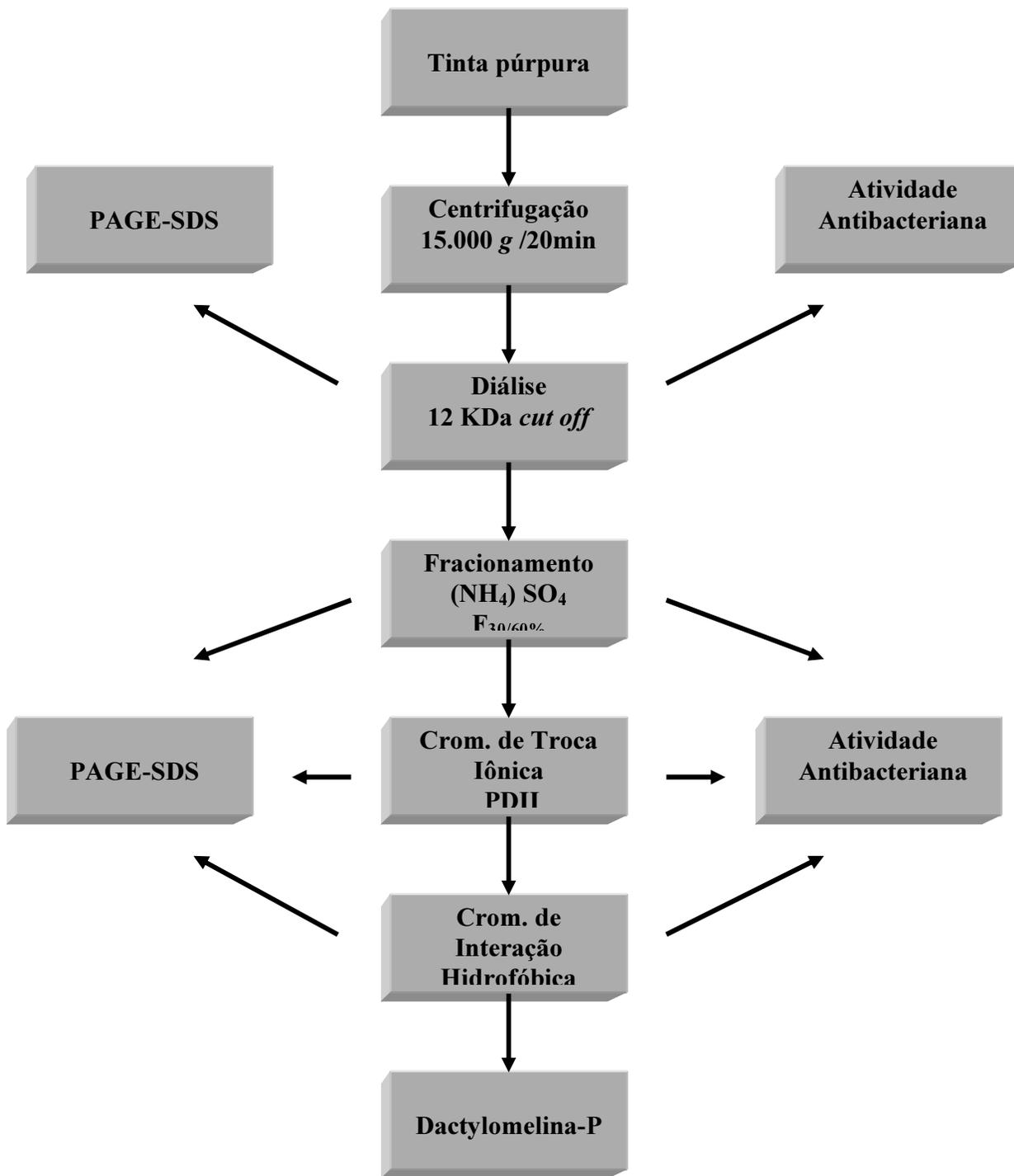


FIGURA 10 – Esquema de purificação adotado para o isolamento da dactylomelina-P, uma proteína com atividade antibacteriana presente na tinta do molusco *Aplysia dactylomela*.

### 6.3. Caracterização da Dactylomelina-P

#### 6.3.1. Estimativa da Massa Molecular

A massa molecular aparente da dactylomelina-P, calculada a partir do Rf em gel de poliacrilamida em presença de SDS, foi 59,8 kDa. A proteína mostra o mesmo perfil na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, tratando-se, portanto, de uma proteína monomérica (Figura 11).

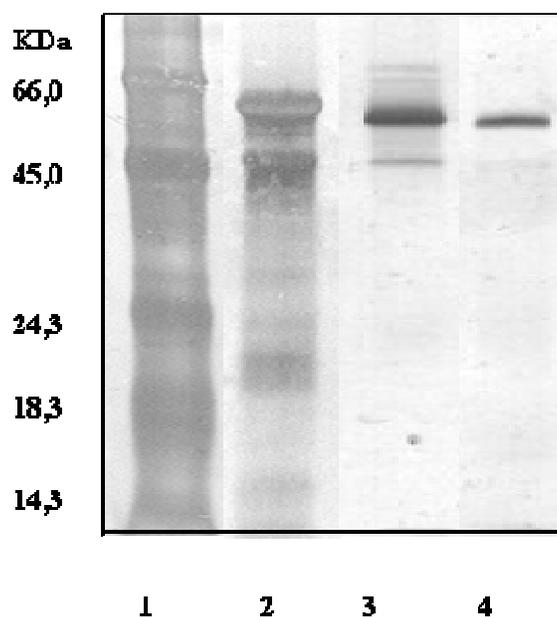


FIGURA 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da fração protéica e picos das cromatografias obtidos durante a purificação da dactylomelina-P. Raia 1 – Marcador molecular; Raia 2 – F<sub>30/60%</sub>; Raia 3 – Pico DEII e Raia 4 – Pico PSII. Amostras: 20  $\mu$ g/poço.

### 6.3.2. Ponto Isoelétrico

A eletroforese bidimensional da dactylomelina-P confirmou a sua massa molecular e revelou tratar-se de uma proteína ácida de pI 5,0 (Figura 12).

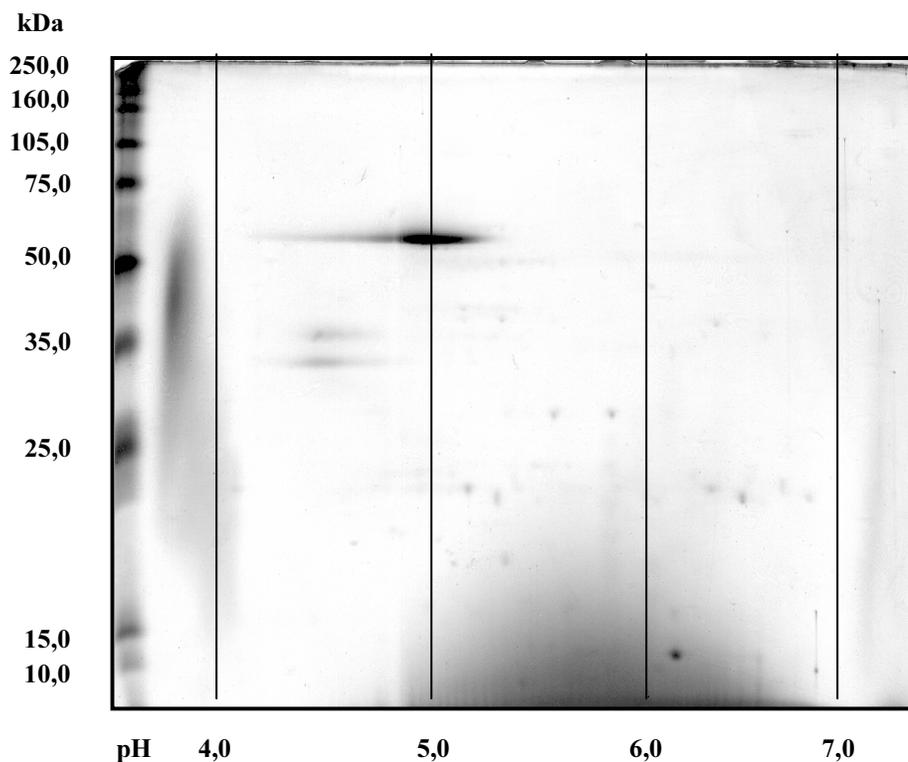


FIGURA 12 – Ponto isoeletrico (pI 5,0) e massa molecular da dactylomelina-P (60 kDa) determinados em gel de poliacrilamida por eletroforese bidimensional.

### 6.3.3. Composição de Aminoácidos

Na composição de aminoácidos da dactylomelina-P destacam-se as contribuições majoritárias dos aminoácidos metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, tirosina, serina e prolina, e baixíssimos teores de histidina e cisteína (Tabela 3).

TABELA 3 – Composição de aminoácidos da dactylomelina-P. Os valores estão expressos em mg para cada 10 g de proteína liofilizada.

<b>Aminoácido</b>	<b>Dactylomelina-P</b>
Ácido glutâmico	132,42
Ácido aspártico	123,74
Prolina	107,41
Leucina	74,72
Valina	67,86
Treonina	75,27
Glicina	77,42
Alanina	68,25
Serina	109,09
Tirosina	122,69
Arginina	68,05
Fenilalanina	72,39
Lisina	40,86
Isoleucina	30,68
Cisteína	17,22
Metionina	240,22
Histidina	19,87

#### 6.3.4. Determinação de Carboidratos

A dactylomelina-P apresenta um baixo teor de açúcar redutor, da ordem de 1%. A natureza glicoprotéica da dactylomelina-P não foi confirmada através da revelação com ácido periódico de Schiff em gel de poliacrilamida (Figura 13).

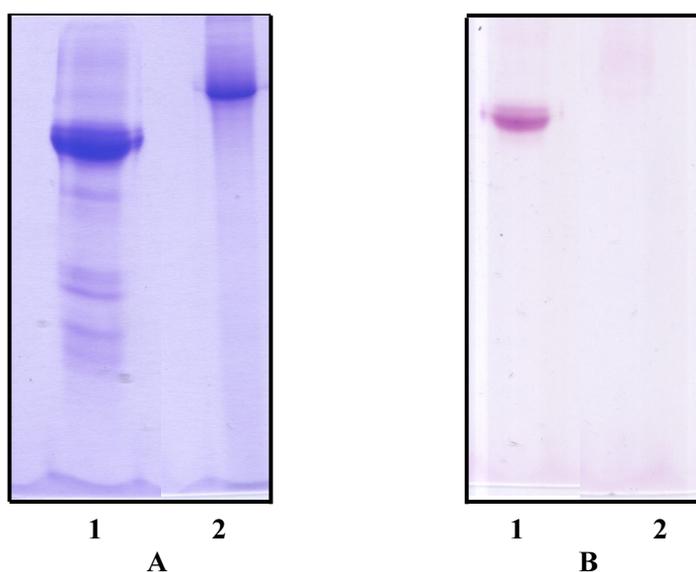


FIGURA 13 – Géis de eletroforeses em poliacrilamida da dactylomelina-P após coloração com Coomassie brilliant blue (A) e Ácido periódico de Schiff (B). Raia 1 - controle positivo, Peroxidase; Raia 2 - Dactylomelina-P. Amostras: 1mgP/ml.

#### 6.3.5. Estabilidade Térmica

A proteína manteve sua atividade biológica inalterada após aquecimento a 55 °C por 30 minutos. A atividade antibacteriana, entretanto, foi significativamente reduzida com a elevação da temperatura, sendo a proteína completamente desnaturada a 60 °C a partir de 10 min (Figura 14).

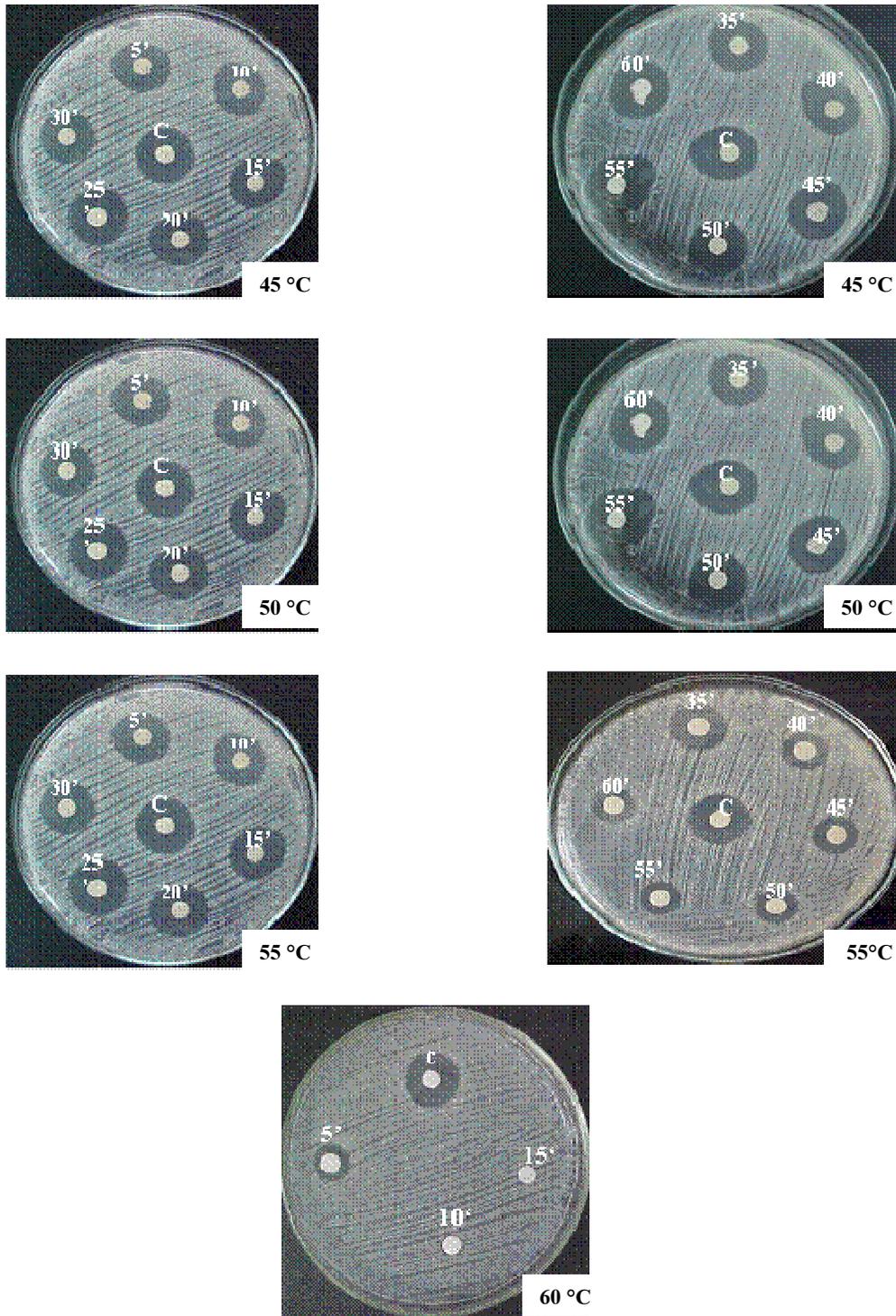


FIGURA 14 – Ação do calor na atividade antibacteriana da dactylomelina-P. C: disco com 30  $\mu$ l de dactylomelina-P (100 $\mu$ g/ml) não aquecida; e discos com 30  $\mu$ l de dactylomelina-P (100 $\mu$ g/ml) aquecida a 45, 50, 55 e 60  $^{\circ}$ C por diferentes períodos de tempo.

### 6.3.6. Influência do pH na Atividade da Dactylomelina-P

A dactylomelina-P teve sua atividade reduzida em meio ácido, sendo completamente desnaturada a pH 2,0. Ao contrário, sua atividade manteve-se completamente inalterada em meio alcalino (Figura 15).

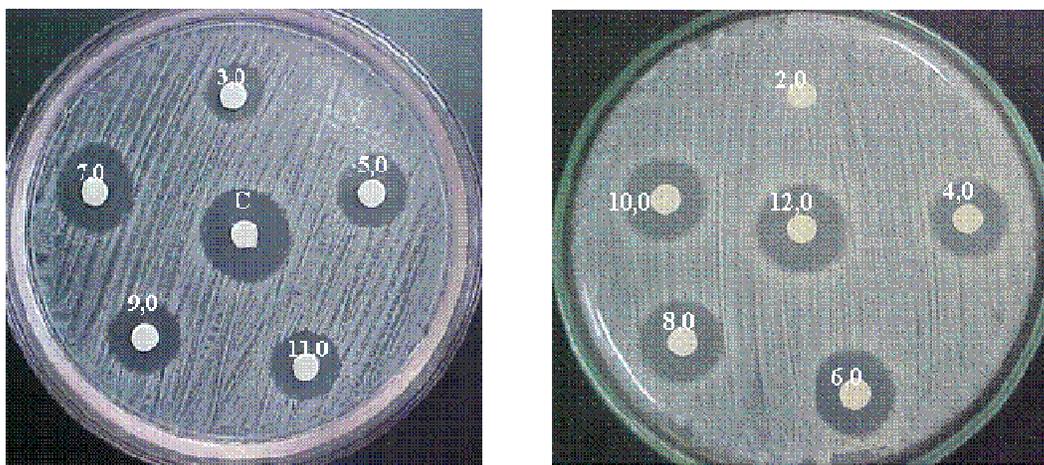


FIGURA 15 – Influência do pH na atividade da dactylomelina-P contra *St. aureus*. C: disco com 30  $\mu$ l de dactylomelina-P (500 $\mu$ g/ml) em pH 7,0; discos com 30  $\mu$ l de dactylomelina-P (500 $\mu$ g/ml) previamente tamponada em diferentes pHs: 2,0 a 12,0.

### 6.3.7. Resistência a Protease

Não foi detectada nenhuma alteração na atividade antibacteriana da dactylomelina-P após seu tratamento com protease, mostrando ser a mesma resistente à digestão com essa enzima.

6.4. Atividades Biológicas da Tinta e Dactylomelina-P

## 6.4.1. Espectro de Ação

A tinta bruta e a dactylomelina-P exibiram ação antibacteriana de amplo espectro, agindo contra todas as bactérias testadas, incluindo Gram-positivas, Gram-negativas e algumas cepas marinhas (Tabela 4). Dentre os microrganismos testados, as gram-positivas foram mais sensíveis, especialmente a bactéria *St. aureus*.

TABELA 4 – Espectro de atividade antibacteriana da tinta do molusco *A. dactylomela* e da dactylomelina-P.

BACTÉRIAS	HALO DE INIBIÇÃO (mm)		
	Tinta Bruta (30 µL/disco)	Dactylomelina-P (100µg/ml)	
<b>Gram – Positivas</b>			
<i>Bacillus cereus</i>	8,1 ± 0,7	16 ± 0,9	
<i>B. subtilis</i>	7,9 ± 1,0	15 ± 0,5	
Cepa Marinha 02	11,5 ± 1,0	25 ± 1,9	
<i>Sarcina sp.</i>	11,5 ± 2,1	17 ± 1,2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,5 ± 1,2	21 ± 1,3	
<b>Gram - Negativas</b>			
<i>Acinetobacter sp.</i>	10,3 ± 0,8	15 ± 1,0	
Cepa Marinha 01	11,7 ± 1,0	19 ± 1,7	
Cepa Marinha 03	11,0 ± 1,3	17 ± 1,1	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9,8 ± 0,8	10 ± 0,6	
<i>E. agglomerans</i>	9,2 ± 1,2	10 ± 0,3	
<i>E. cloacae</i>	10,5 ± 1,0	13 0,3	±
<i>E. gergoviae</i>	9,2 ± 0,8	10 ± 0,8	
<i>Escherichia coli</i>	8,7 ± 0,8	11 ± 0,8	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,6 ± 1,1	10 ± 1,2	
<i>Proteus mirabilis</i>	9,7 ± 1,0	15 ± 1,6	
<i>Salmonella enteritidis</i>	9,3 ± 1,0	13 ± 0,6	
<i>S. typhi</i>	8,3 ± 1,2	13 ± 0,2	
<i>S. typhimurium</i>	10,0 ± 0,5	13 0,5	±
<i>Serratia marcescens</i>	10,4 ± 0,9	14 0,9	±
<i>Shigella flexneri</i>	9,0 ± 0,6	13 ± 0,9	
<i>V. Cholerae</i>	10,0 ± 0,6	13 0,3	±
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9,0 ± 0,3	15 ± 0,5	

A tinta e a dactylomelina-P não apresentaram qualquer atividade contra as leveduras testadas. Entretanto, a tinta bruta inibiu de forma significativa o crescimento vegetativo do fungo filamentoso *Mucor* sp. (Figura 16), embora não tenha mostrado qualquer efeito sobre as demais espécies testadas (Tabela 5). Já a dactylomelina-P não mostrou nenhuma atividade sobre o crescimento vegetativo de nenhum fungo filamentoso.

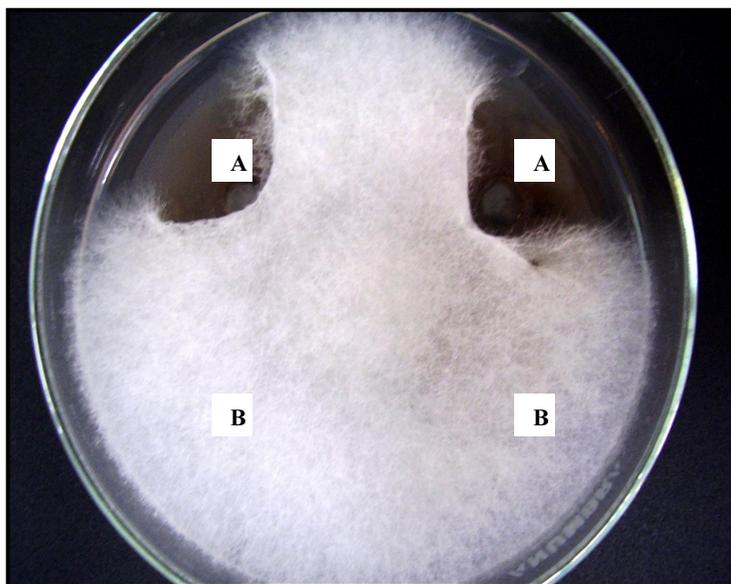


FIGURA 16 – Ação da tinta bruta e da dactylomelina-P sobre o crescimento vegetativo do fungo *Mucor* sp. A: tinta bruta (30  $\mu$ l); B: dactylomelina-P (1 mg/ml).

TABELA 5 – Atividade antifúngica em meio sólido da tinta e da dactylomelina-P.

<b>Fungo</b>	<b>Tinta Bruta (30 µl/disco)</b>	<b>Dactylomelina-P (1mgP/ml)</b>
<i>Aspergillus chevalier</i>	-	-
<i>A. niger</i>	-	-
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	-	-
<i>C. kikuchi</i>	-	-
<i>C. lindemuthianum</i>	-	-
<i>C. musae</i>	-	-
<i>C. truncatum</i>	-	-
<i>Dreschelera</i> sp.	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-
<i>F. solani</i>	-	-
<i>Mucor</i> sp.	+	-
<i>Neurospora</i> sp.	-	-
<i>Penicillium herguei</i>	-	-
<i>P. oligandrum</i>	-	-
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-

(+): Inibição; (-): Ausência de inibição.

A tinta bruta exibiu algum efeito sobre a germinação de conídios ou esporos fúngicos, enquanto a dactylomelina-P não mostrou nenhuma ação sobre essas células. A tinta inibiu de forma parcial ou completa a germinação dos esporos e, mesmo quando houve germinação, não se observou o desenvolvimento além do estágio de hifa primária (Tabela 6 e Figura 17).

Uma preparação da tinta enriquecida com peptídeos não apresentou nem atividade contra *St. aureus* nem contra o *Mucor* sp.

TABELA 6 – Atividade antifúngica em meio líquido da tinta bruta e da dactylomelina-P. 1: Inibição da germinação de esporos; 2: Inibição no desenvolvimento de hifas

Fungo	Tinta bruta (30 µl/disco)		Dactylomelina-P (1mg/ml)	
	Germinação	Crescimento vegetativo	Germinação	Crescimento vegetativo
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	-	-
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	+	+	-	-
<i>C. musae</i>	+	+	-	-
<i>Mucor</i> sp.	+	+	-	-
<i>Neurospora</i> sp.	-	+	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	+	-	-

(+): Inibição; (-): Ausência de inibição.

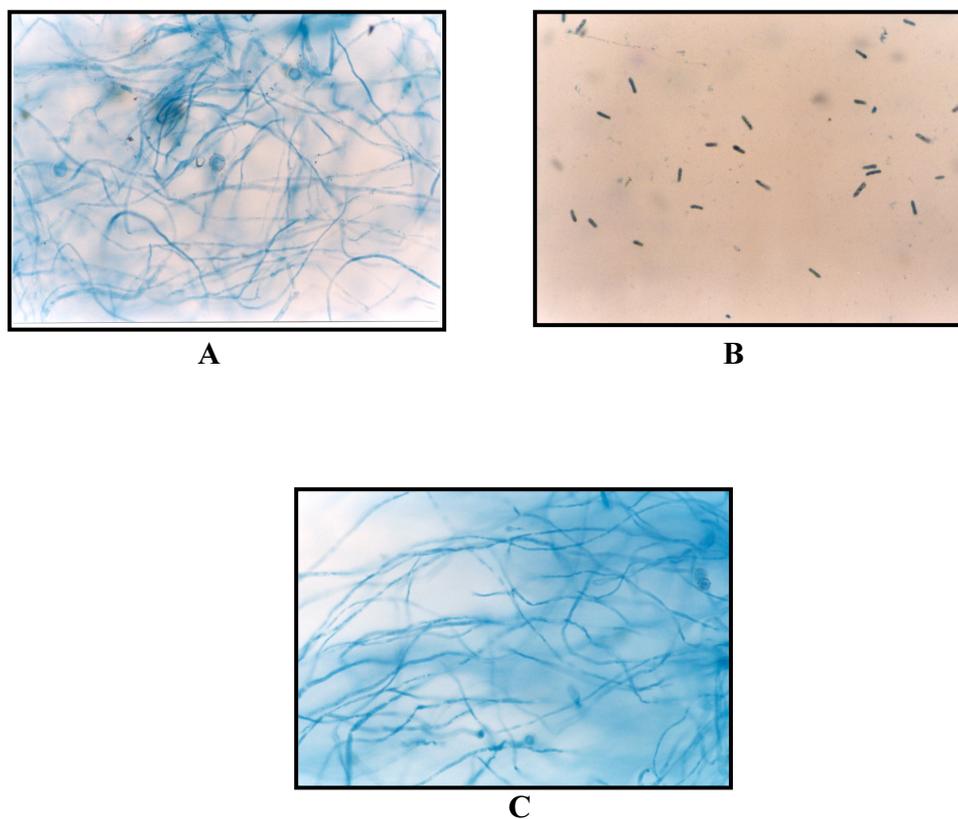


FIGURA 17 – Fotomicrografias de culturas do fungo *Colletotricum lindemuthianum* desenvolvidas a partir de conídios cultivados em meio contendo dactylomelina-P ou tinta bruta de *A. dactylomela*. (A) Controle, conídios incubados em Caldo Sabouraud; (B) Conídios incubados com a tinta bruta de *A. dactylomela* e (C) Conídios incubados com a dactylomelina-P. Esfregaços corados com lactofenol azul de algodão. Aumento: 400 x.

#### 6.4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A dactylomelina-P mostrou efeito bacteriostático contra *St. aureus* a 0,2 µg/ml, mas foi bactericida para a mesma bactéria na dose de 4,0 µg/ml. As CIM e CBM promoveram halos de inibição menor ou igual a 12 mm e maior ou igual a 14 mm, respectivamente, em ensaios por difusão em placa (Figura 18).

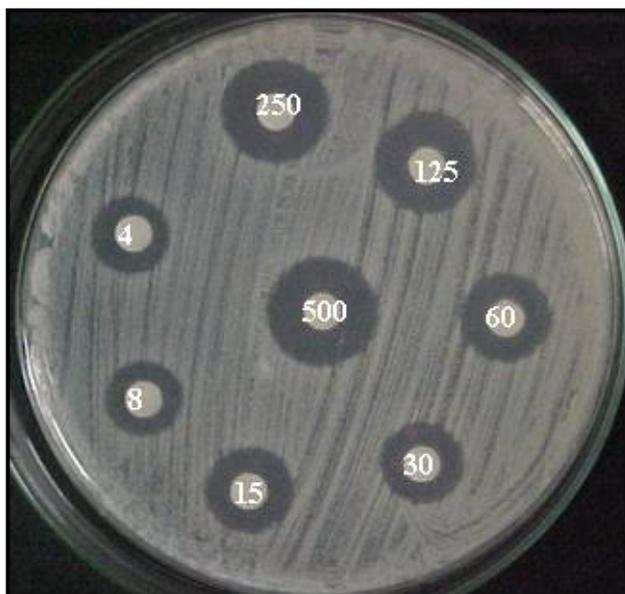


FIGURA 18 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da dactylomelina-P para *St. aureus* pelo método de difusão em placa. Discos com concentrações de dactylomelina-P variando de 4-500 µg/ml.

#### 6.5.4. Interação da dactylomelina-P com a bactéria *St. aureus*

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou uma intensa marcação da dactylomelina-P junto à parede celular e a membrana plasmática da bactéria, prováveis locais de ação da proteína (Figura 19).

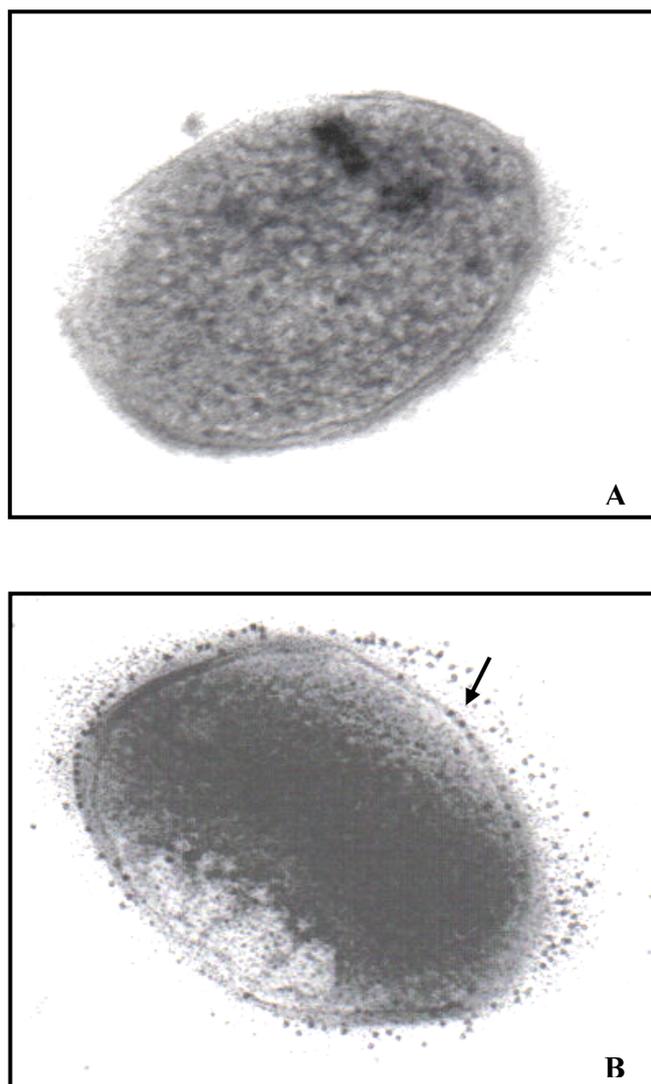


FIGURA 19 – Fotomicrografias de células de *Staphylococcus aureus* cultivadas em meio sem a proteína dactylomelina-P (A) e em meio contendo 500  $\mu\text{g/ml}$  de dactylomelina-P (B). Aumento 85.000 x.

#### 6.4.3. Atividade Hemaglutinante

A dactylomelina-P e a tinta aglutinaram os eritrócitos de rato, camundongo e coelho tratados enzimaticamente até as concentrações de 250, 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

#### 6.4.4. Atividade Anticoagulante

A tinta e a dactylomelina-P não só não apresentaram atividade anticoagulante para eritrócitos de rato como promoveram a coagulação mais rápida desses eritrócitos quando comparados com o controle positivo.

#### 6.4.5. Atividades Enzimáticas

Nem a tinta nem a dactylomelina-P mostraram atividade quitinásica nem glucanásica até a concentração de 1mg/ml.

### 6.5. Potencial Tóxico da Dactylomelina-P

#### 6.5.1. Atividade Hemolítica

A dactylomelina-P não hemolisou nenhum dos eritrócitos testados até a concentração de 1mgP/ml.

#### 6.5.2. Atividade Citotóxica

A dactylomelina-P não apresentou atividade citotóxica para as linhagens de células testadas até uma concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ .

### 6.5.3. Atividade Tóxica em Camundongos

A dose letal média (DL50) da dactylomelina-P ficou entre 60-100 mg de proteína por Kg de massa corpórea, sendo considerada como moderadamente tóxica.

## 6.6. Imunolocalização da Dactylomelina-P

### 6.6.1. Produção de Anticorpos Policlonais

A via e o esquema de imunização adotados neste trabalho se mostraram apropriados para a obtenção de anticorpo policlonal anti-dactylomelina-P. Os imunossoros de 35 e 42 atingiram títulos de até 1:5000, determinados por *dot blot*. Esses anticorpos foram utilizados nos ensaios de localização da dactylomelina-P no animal e na interação desta proteína com a bactéria *St. aureus*.

### 6.6.2. Estudos de Imunolocalização da Dactylomelina-P

A Figura 20 mostra a anatomia interna da lesma *A. dactylomela* para destacar que os órgãos usados na preparação dos extratos utilizados nos estudos de imunolocalização da dactylomelina-P foram retirados sem contaminação cruzada dos mesmos.

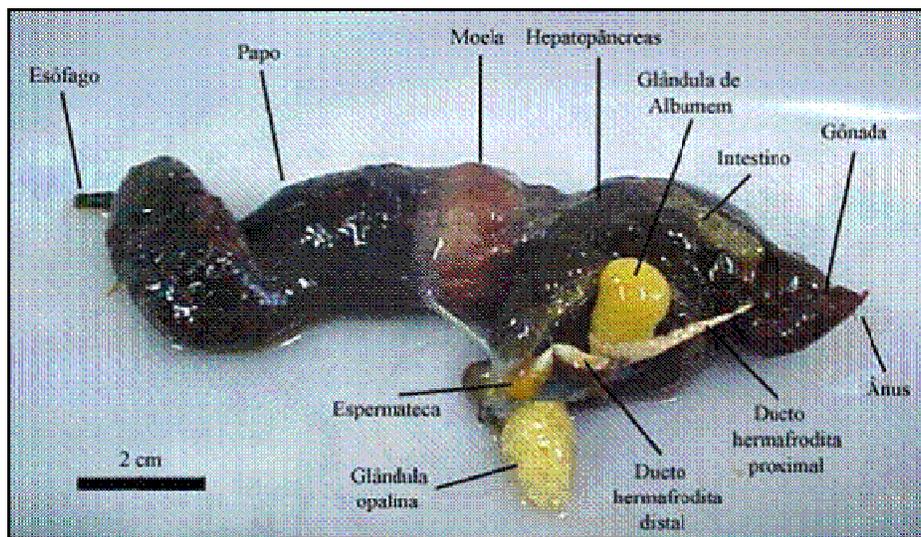


FIGURA 20 – Anatomia interna da lesma *Aplysia dactylomela*, destacando dentre outros a localização do papo, hepatopâncreas, glândula de albúmem e glândula opalina.

O ensaio de *western blot* revelou que o anticorpo anti-dactylomelina-P reconheceu proteínas de massa molecular correspondente a dactylomelina-P nas glândulas opalina, de tinta e albúmem. Entretanto, o anticorpo não reagiu com nenhuma proteína de massa molecular semelhante à dactylomelina-P nos extratos da glândula digestiva, coração, papo e hemolinfa (Figura 21).

### 6.6.3. Localização da Dactylomelina-P na Glândula de Tinta

Os ensaios de imunohistoquímica revelaram ser a vesícula de tinta o local de síntese e/ou armazenamento da dactylomelina-P, já que não foi detectada marcação em nenhuma outra estrutura da glândula da tinta (Figura 22).

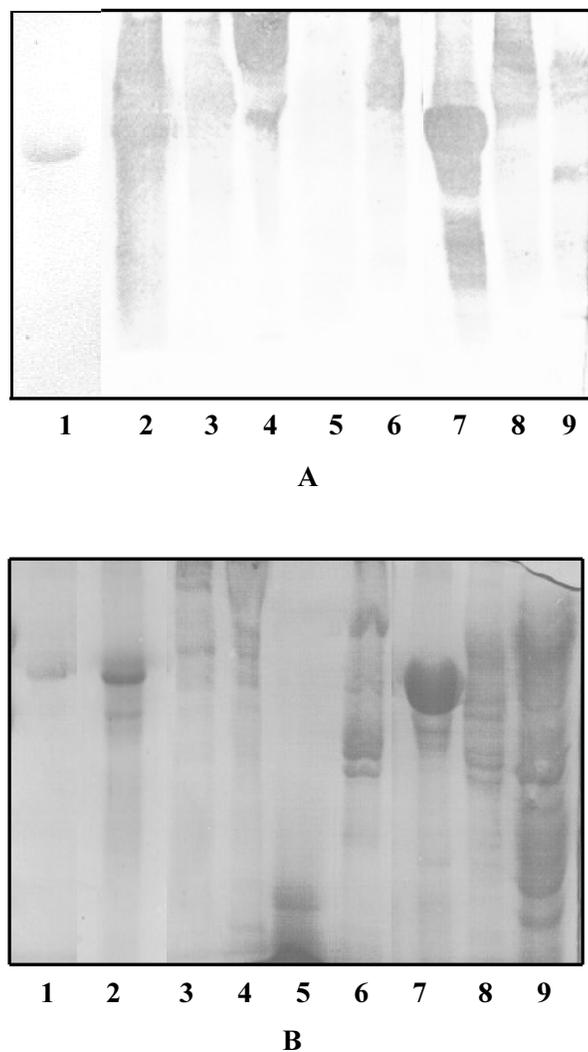


FIGURA 21 – *Western blot* de extratos de órgãos e da hemolinfa da lesma *A. dactylomela*.

A: Membrana de PVDF revelando as proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-dactylomelina-P. Raia 1: dactylomelina-P; Raia 2: Pico DEII, Raia 3: hemolinfa; Raia 4: glândula opalina; Raia 5: glândula digestiva; Raia 6: coração; Raia 7: glândula de tinta; Raia 8: glândula de albúmen e Raia 9: Papo. B: Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras para comparação, corada com Coomassie Brilliant Blue.

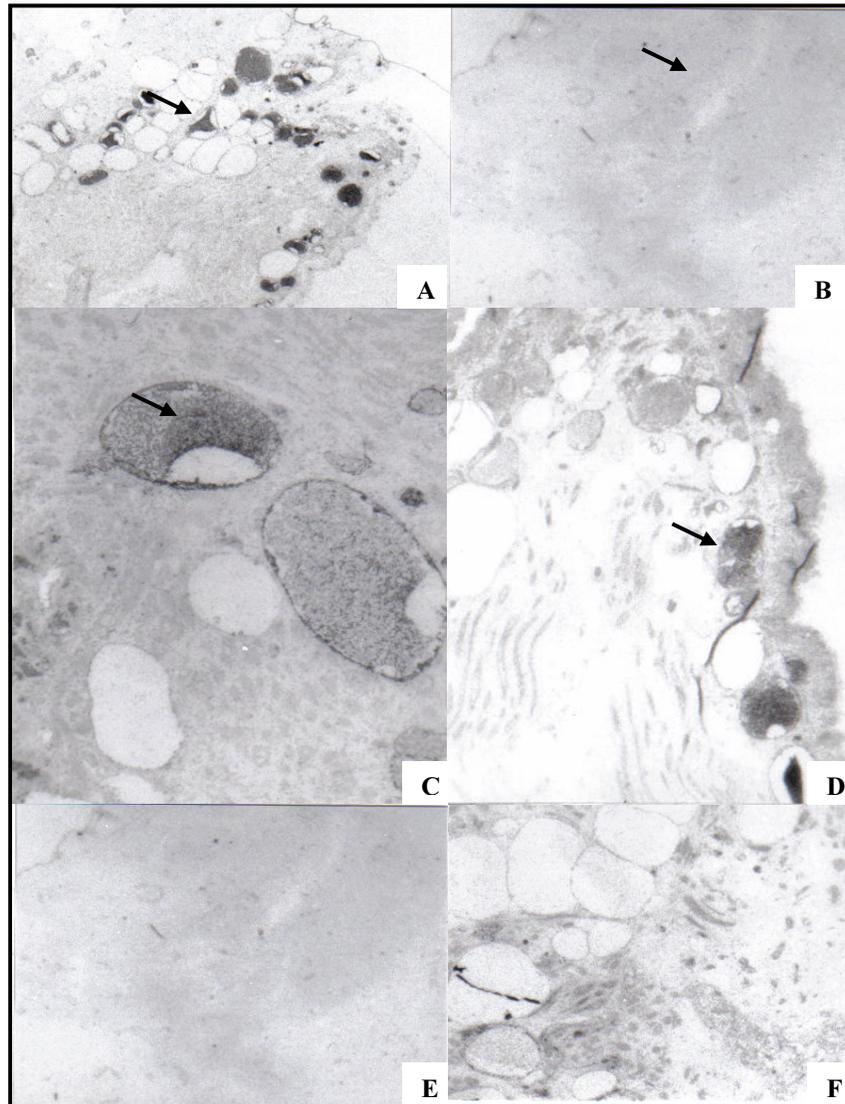


FIGURA 22 – Imunohistoquímica da glândula de tinta da lesma *A. dactylomela* revelada pelo anticorpo anti-dactylomelina-P. A, B e C: Cortes observados sem coloração (200, 400, 800x); D: Corte corado com azul de toluidina (400x) E: Corte controle, preparado com soro pré-imune, observado sem coloração (200x) e F: Corte controle, preparado com soro pré-imune, corado com azul de toluidina (400x). As setas apontam os locais da dactylomelina-P na glândula.

## 7. DISCUSSÃO

Em todos os grupos de organismos encontramos exemplos de ataque, defesa e respostas comportamentais baseados em compostos químicos. Para os invertebrados marinhos, que não são capazes de sintetizar anticorpos como os vertebrados, os compostos químicos, ao lado das defesas estruturais, representam importantes mecanismos de defesa contra patógenos e/ou predadores (PEREIRA & SOARES, 2002).

As lesmas marinhas dos gêneros *Aplysia*, *Bursatella* e *Dolabella* acumulam e/ou produzem diversos compostos biologicamente ativos incluindo fenóis, glicosídeos, aglutininas, proteínas antimicrobianas, proteínas citolíticas, proteínas antitumorais, toxinas, enzimas, etc., a partir de diferentes tecidos e secreções. Acredita-se que muitas dessas substâncias participam passivamente e/ou ativamente na defesa química desses moluscos (KAMIYA *et al.*, 1986, 1989; KISUGI *et al.*, 1989; YAMAZAKI *et al.*, 1989 ab, 1990; IJIMA *et al.*, 1995, 2003; TAKAMATSU *et al.*, 1995; MELO *et al.*, 1998, 2000; PETZELT *et al.*, 2002; RAGAJANAPATHI *et al.*, 2002; JIMBO *et al.*, 2003; BUSZKE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005).

Indiscutivelmente, a secreção mais peculiar da maioria das lesmas marinhas é a tinta que elas liberam quando importunadas. A tinta possui substâncias de baixa massa molecular, como os pigmentos derivados de algas vermelhas que esses animais consomem (CHAPMAN & FOX, 1969), bem como várias proteínas que parecem ser produzidas pelo animal (COELHO *et al.*, 1998). Dentre essas, encontram-se proteínas com atividade antiviral (RAGAJANAPATHI *et al.*, 2002), antibacteriana (MELO *et al.*, 2000), antifúngica (YANG *et al.*, 2005) e antitumoral (BUTZKE *et al.*, 2005). Embora já se conheça muito sobre as características físico-químicas de algumas dessas proteínas, com algumas delas já tendo inclusive sido seqüenciadas (YANG *et al.*, 2005; BUTZKE *et al.*, 2005), o conhecimento sobre a síntese, processamento, forma de armazenamento na glândula de tinta e, principalmente, o papel dessas proteínas no animal, ainda permanece no campo especulativo.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de trazer mais informações acerca da composição de proteínas da tinta e avançar na caracterização físico-química e biológica da dactylomelina-P, uma proteína antibacteriana de 60 kDa isolada da tinta de *A.*

*dactylomela* por MELO *et al.* (2000). Qualquer informação pertinente a esse tema será de grande contribuição para elucidação da origem desta proteína e de seu possível papel na defesa do animal.

A análise da tinta bruta por eletroforese bidimensional trouxe, pela primeira vez, novas informações acerca da riqueza de proteínas e peptídeos constituintes da tinta, além de informações pertinentes a massa molecular e ponto isoelétrico dessas moléculas. Ao todo foram discriminados 41 “spots”, a maioria de massa molecular abaixo de 70 kDa, além de alguns peptídeos de baixa massa molecular, muitos dos quais não revelados por eletroforese em uma dimensão. O “spot” correspondente a dactylomelina-P se destaca como um “spot” forte e arrastado, provavelmente devido a interação com os pigmentos da tinta, na região de 60 kDa e pI 5,0. A relativa abundância desta proteína, aliada a outras características ainda a serem discutidas neste trabalho, reforça a nossa hipótese do seu envolvimento na defesa do animal contra patógenos e/ou predadores.

Como o próprio nome indica, a tinta é muito pigmentada e isto dificulta bastante o isolamento de suas proteínas. Apesar dos pigmentos serem precipitados por solventes orgânicos e ácidos, esses foram evitados neste trabalho por causar a desnaturação da dactylomelina-P. Assim, optou-se pela diálise em membrana de 12 kDa de *cut off* para eliminação de parte dos pigmentos e retirada de compostos de baixas massas moleculares. Após a diálise, e antes de iniciar a purificação, a tinta bruta foi submetida a ensaios de atividade antibacteriana, para confirmar a reatividade do material de partida.

A tinta dialisada foi centrifugada a 15.000 g por 20 minutos e o sobrenadante precipitado nas mesmas condições sugeridas por MELO *et al.* (2000), de forma a obter a fração 30-60%, rica em dactylomelina-P. Os resultados das determinações de proteína confirmaram ser a fração 30-60% a que concentra a maior quantidade de proteínas e a mais potente atividade antibacteriana, sendo por isso utilizada nas etapas subsequentes de purificação. Neste trabalho foram usados alguns dos passos cromatográficos sugeridos por MELO *et al.* (2000), com algumas modificações.

A resolução conseguida com a cromatografia de troca iônica neste trabalho foi superior àquela conseguida por MELO *et al.* (2000). Na realidade a diferença residiu na concentração de NaCl usada para a eluição do pico retido, ou seja, o pico que concentra a atividade antibacteriana. Esse material foi completamente eluído com 0,5 M de NaCl, livre

da contaminação com as proteínas eluídas com 1,0 M de NaCl, pico III. Como MELO *et al.* (2000) aplicaram inicialmente 0,15 M de NaCl, obtiveram um pico arrastado, sem resolução e, quando aplicaram 1,0 M de NaCl, para eluição do restante do material retido, provavelmente levaram junto as proteínas contaminantes, correspondentes ao pico III deste trabalho.

Embora a cromatografia de troca iônica seja bastante eficiente para purificação da dactylomelina-P, esta ainda se apresenta bastante pigmentada. Como esses pigmentos não foram removidos por filtração em gel como mostrado por MELO *et al.* (2000), esse passo foi evitado. Assim, o pico DEII foi diretamente cromatografado em coluna de Phenyl-Sepharose. A dactylomelina-P, pico II da Phenyl-Sepharose, foi eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 sem sal, resultado semelhante ao descrito por MELO *et al.* (2000).

A massa molecular da dactylomelina-P calculada por PAGE-SDS neste trabalho, 59,8 kDa, ficou muito próximo dos 56,2 kDa, determinada por filtração em gel (MELO *et al.*, 2000).

Neste trabalho o ponto isolétrico da dactylomelina-P foi determinado por eletroforese bidimensional, revelando tratar-se de uma proteína ácida, de pI 5,0. O ponto isolétrico está de acordo com a sua composição de aminoácidos, rica em aminoácidos polares carregados negativamente (Asx e Glx) e, com o fato de após seu tamponamento a pH 7,0, ter sido adsorvida em uma matriz aniônica. O pI da dactylomelina-P é muito próximo ao pI 4,59 da APIT, uma proteína antitumoral de 60 kDa, isolada da tinta de *A. punctata* (BUTZKE *et al.*, 2005).

Uma outra característica da dactylomelina-P que merece destaque é o elevado teor de metionina, aminoácido que participa de ligações covalentes do tipo S-S nas proteínas, conferindo-lhes mais resistência à proteólise. A partir dessa informação é possível se especular que a dactylomelina-P deva possuir uma estrutura secundária estabilizada por pontes S-S e, que isso seria bastante apropriado para uma provável função de defesa contra patógenos exógenos no ambiente marinho, sujeito a diversos tipos de intempéries.

Quando se analisam algumas características das proteínas aplysianina-P, isolada da tinta de *A. kurodai* (YAMAZAKI *et al.*, 1989a), dolabelanina-P, isolada da tinta de *D.*

*auricularia* (YAMAZAKI *et al.*, 1989b), escapina, proteína de 60 kDa isolada da tinta de *A. californica*, (YANG *et al.*, 2005), APIT, proteína antitumoral de 60 kDa isolada da tinta de *A. punctata* (BUTZE *et al.*, 2005), com a dactylomelina-P (MELO *et al.*, 2000), percebe-se que elas compartilham a propriedade de apresentarem algum tipo de atividade biológica, serem liberadas pelo mesmo tipo de glândula, possuírem massa molecular semelhante (~60 kDa), serem monoméricas, estáveis a variações de pH, resistentes a proteases e desnaturadas entre 55 a 70 °C. Entretanto, diferem em suas composições de aminoácidos, no grau de glicosilação e no tipo de atividade biológica.

Dactylomelina-P contém menos de 1% de sua massa de carboidratos neutros, concentração tão baixa que não foi nem revelada como glicoproteína pelo ácido periódico de Schiff. A escapina, da *A. californica*, também possui uma baixa concentração de açúcar, menos de 0,03% (YANG *et al.*, 2005). Já aplysianina-P, dolabelanina-P e APIT são consideradas glicoproteínas, embora no caso da APIT o conteúdo de carboidrato também seja muito baixo, descobrindo-se prováveis sítios de glicosilação apenas após a seqüência da proteína (BUTZKE *et al.*, 2005). Esses resultados servem para mostrar que a glicolização não é um fator essencial para atividade biológica dessas proteínas (YANG *et al.*, 2005).

Dactylomelina-P foi relativamente estável ao calor, preservando sua atividade biológica quando aquecida a 55 °C por 30 minutos. A partir desse tempo, houve uma redução de sua atividade, que foi completamente abolida a 60 °C após 10 minutos. Comportamento semelhante é observado para proteínas homólogas isoladas de tintas de outras espécies de lesmas, que também são desnaturadas entre 55 e 70 °C (RAJAGANAPATHI, 2002; YAMAZAKI, 1990; BUTZKE *et al.*, 2005).

Dactylomelina-P se mostrou bastante estável a variações de pH entre 3-12. Merece destaque a manutenção de sua atividade em meio alcalino, o que reforça uma possível função exógena, no meio marinho, que é tipicamente alcalino. Embora sua atividade biológica tenha sido reduzida em meio ácido, essa só foi completamente abolida a pH menor que 3,0, o que reforça sua característica de molécula resistente.

Dactylomelina-P mostrou-se resistente à digestão com protease K, uma endoprotease inespecífica. MELO *et al.* (2000) tinham relatado a resistência da dactylomelina-P à tripsina. Esses resultados também permitem inferir sobre a resistência

dessa proteína, sendo provável que a sua estrutura tridimensional, reforçada pela presença de ligações S-S, impeça o acesso dessas enzimas a seus sítios de ação. Essa hipótese é reforçada pelo comportamento da APIT, que é resistente a digestão por tripsina e protease K na forma nativa, e é digerida por essas enzimas após desnaturada pelo calor (BUTZKE *et al.*, 2005).

Todas as características físico-químicas e moleculares da dactylomelina-P descritas até aqui, isto é: proteína monomérica, com teor relativamente alto de metionina, moderadamente resistente ao calor, resistente a tripsina, protease K e a extremos de pH, aliada ao fato de ser a proteína mais abundante da tinta, reforçam sua possível participação na defesa do animal. Nesse momento, convém lembrar que as lesmas habitam a região intertidal e, portanto, estão freqüentemente expostas aos movimentos das marés e sujeitas as variações de pH, temperatura, luminosidade, salinidade e oxigênio. Portanto, é razoável supor que para uma molécula desempenhar qualquer atividade nesse meio deva ser resistente a ele.

Dactylomelina-P mostra um espectro de ação antibacteriano amplo, inibindo de forma bastante eficiente o crescimento de várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, patogênicas ou não ao homem, e bactérias marinhas. A concentração inibitória mínima (CIM), determinada para a bactéria *St. aureus*, de 0,2 µg/ml produziu um halo de inibição de 12 mm, pelo método de difusão em placa. A concentração bactericida mínima (CBM), de 4,0 µg/mL produziu halos de 14-16 mm. Portanto, neste trabalho foi possível chegar a concentração bactericida para a dactylomelina-P, ao contrário de MELO *et al.* (2000), que só conseguiram determinar a CIM. Esses resultados diferentes podem ser atribuídos ao grau de purificação das proteínas utilizadas ou até mesmo as condições do ensaio antibacteriano empregado. O fato de se comportar como uma proteína bacteriostática ou como bactericida também foi observado com a escapina, uma proteína antibacteriana isolada da tinta da lesma de *A. californica*, que pode agir de uma maneira ou de outra dependendo das condições do meio (YANG *et al.*, 2005). Interessante destacar a CIM da escapina para a bactéria *St. aureus*, 0,3 µg/mL, semelhante a CIM da dactylomelina-P, 0,2 µg/mL, contra a mesma bactéria. YANG *et al.* (2005) isolaram a dactylomelina-P e a usaram como controle em seus experimentos com a escapina. Dessa forma, os autores mostraram que a dactylomelina-P também apresenta ação bactericida, e levantaram a

hipótese dessas proteínas atuarem do mesmo modo. A confirmação dessa hipótese depende da análise comparativa de suas seqüências de aminoácidos. Entretanto, pode ser adiantado que essas proteínas possuem algumas características biológicas diferentes, como será discutido adiante.

Várias proteínas biologicamente ativas isoladas das lesmas-do-mar mostram atividade L-amino-oxidásica (IIJIMA *et al.*, 2003; JIMBO *et al.*, 2003; BUTZKE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005). As L-amino-oxidases catalisam a desaminação oxidativa de diversos aminoácidos produzindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a reação, que necessita de FAD como co-fator. No caso da APIT e escapina, que pertencem a esta classe de enzimas, os substratos preferenciais para ambas são os aminoácidos lisina e arginina (BUTZKE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005). As atividades tumoricida da APIT (BUTZKE *et al.*, 2005) e antibacteriana da escapina (YANG *et al.*, 2005) são atribuídas a toxicidade do peróxido de hidrogênio. Infelizmente, a dactylomelina-P não foi ainda submetida a ensaios para detecção de atividade L-amino-oxidásica, portanto, não é possível dizer se ela teria ou não tal atividade.

Como os genes da APIT e escapina já foram clonados e expressados em *Escherichia coli* é perfeitamente plausível que essas proteínas, com essas interessantes atividades biológicas, possam vir a ser produzidas comercialmente para várias aplicações industriais ou medicinais (YANG *et al.*, 2005).

A ação da dactylomelina-P contra diferentes espécies de bactérias é compatível com um possível papel desta proteína na defesa inespecífica do animal contra patógenos. Interessantemente, dentre todas as espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, as cepas marinhas, isoladas de poças onde foram encontradas as lesmas, foram as mais sensíveis.

Merece destaque a ação da dactylomelina-P sobre o *St. aureus*, uma bactéria patogênica, com cepas resistentes a vários antibióticos, e que também é encontrada no ambiente marinho. BATISTA (2004) testou a ação da dactylomelina-P frente a 100 cepas de *S. aureus*, resistentes a vários antibióticos, isoladas de diferentes casos clínicos de Hospitais de Fortaleza, e encontrou que 100 % das cepas eram sensíveis a dactylomelina-P. Esse resultado se reveste da maior importância quando o compara com aqueles produzidos por antibióticos comerciais tais como nitrofurantoína e eritromicina, para os quais mais de

50 % dessas cepas se mostraram resistentes. Para a penicilina, por exemplo, 100 % das cepas foram resistentes. Os isolados (100%) foram sensíveis a vancomicina e aos antibióticos de última geração como quinupristina/dalfopristina e linezolida. Portanto, a eficácia da dactylomelina-P é comparável a esses antibióticos. A atuação da dactylomelina-P também foi superior aos antibióticos rifampicina, oxacilina, cloranfenicol e clindamicina, que foram eficazes contra apenas 70 % das cepas.

A interação da dactylomelina-P com a bactéria *St. aureus* foi visualizada por microscopia eletrônica de transmissão que mostrou uma forte marcação nas proximidades da parede celular e membrana citoplasmática. Isso mostra que a proteína atravessa o peptidoglicano e chega a membrana onde deve se ligar. Considerando que essa proteína pode atuar inibindo ou matando bactérias, dependendo da concentração, é provável que sua ação seja metabólica ao invés de provocar danos mecânicos.

Considerando a potência da dactylomelina-P contra esse número significativo de cepas de *St. aureus* multiresistentes, fica claro a importância em avançar nas investigações e testes acerca desta molécula, que se apresenta como uma droga promissora para o tratamento de infecções estafilocócicas, muito comuns em ambientes hospitalares e responsáveis por muitas mortes (WISTREICH & LECHTMAN, 1980).

Nem a tinta nem a dactylomelina-P tiveram qualquer efeito sobre leveduras até a concentração de 1mg/ml. Entretanto, a tinta bruta inibiu o crescimento vegetativo do fungo *Mucor* sp. Todas as outras espécies de fungos testadas, incluindo *Rhizopus* sp. que pertence a mesma Ordem do *Mucor* (Mucorales), não foram inibidas pela tinta. Quando se testou o efeito da tinta diretamente sobre conídios ou esporos verificou-se inibição total ou parcial da germinação dessas células. Entretanto, o dano causado nessas células pareceu afetar as etapas subsequentes de desenvolvimento dos fungos, pois quando houve germinação, não se observou desenvolvimento além do estágio de hifas primárias. Dactylomelina-P não mostrou nenhum efeito sobre conídios ou esporos fúngicos. O fato da dactylomelina-P não mostrar nenhuma ação sobre leveduras e bolores a distingue da escapina que possui atividade antifúngica (YANG *et al.*, 2005).

Com o intuito de descobrir o fator responsável pela atividade antifúngica da tinta foi preparado um extrato enriquecido com peptídeos, que envolveu o aquecimento da preparação a 80 °C por 15 minutos, tratamento este que desnatura a dactylomelina-P. O

extrato não apresentou nenhum efeito sobre *St. aureus* nem tampouco sobre o *Mucor* sp. Portanto, existe um outro fator na tinta responsável pela ação antifúngica que não é nem a dactylomelina-P nem os peptídeos presentes nessa secreção.

A preparação de dactylomelina-P obtida neste trabalho foi capaz de aglutinar eritrócitos de ratos, camundongos e coelho. A aglutinação de eritrócitos de coelho também havia sido relatada por MELO *et al.* (2000), que levantaram a hipótese de tratar-se de uma quimerolectina, já que eles mostraram que as atividades antibacteriana e hemaglutinante eram exercidas por sítios independentes (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Vários invertebrados marinhos possuem aglutininas ou receptores específicos para essas proteínas que são capazes de aglutinar material estranho incluindo células sangüíneas de vertebrados, bactérias e células tumorais. Portanto, lectinas mediando defesa são efetivas contra potenciais organismos invasores. Ainda que a maioria dos estudos seja feita com eritrócitos de vertebrados, que não são obviamente potenciais invasores, são relativamente estáveis e carregam em sua superfície estruturas específicas de carboidratos que podem ser compartilhadas na natureza por outros organismos (KAMIYA & SHIMIZU, 1981).

Dactylomelina-P não apresentou atividade anticoagulante, na realidade foi observada uma aceleração no processo de coagulação sangüínea, pois amostras de sangue na presença dessa proteína coagularam na metade do tempo que o sangue em solução salina. Esse resultado reforça a hipótese do princípio de economia da natureza, onde uma determinada proteína mostra mais de uma atividade biológica, como as quimerolectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), dolabelanina-A e aplisianina-P que apresentam atividade citolítica e antimicrobiana (KISUGI *et al.*, 1989; YAMAZAKI *et al.*, 1989; 1990), dentre outras.

Nem a tinta bruta nem a dactylomelina-P mostraram atividade quitinásica ou glucanásica, até a concentração de 1,0 mg/ml, excluindo qualquer participação dessas enzimas nas atividades encontradas.

Tendo em mente o potencial da dactylomelina-P como um novo antibiótico, avaliou-se a capacidade dessa proteína em produzir hemólise, citólise e toxicidade aguda. Esses ensaios, dentre outros, são realizados para avaliação dos efeitos biológicos em um

sistema de testes *in vitro* e/ou *in vivo* no estudo pré-clínico para o desenvolvimento de uma nova droga (CORDELL, 1995).

Dactylomelina-P não causou a lise de eritrócitos de coelho, de ratos e nem de camundongos. Também não foi citotóxica para nenhuma das linhagens de células tumorais testadas, pois não houve inibição até a concentração de 25 µg/ml. De acordo como US-NCI, um extrato é considerado ativo quando possui uma CL<sub>50</sub> menor que 20 µg/ml. Para substâncias puras, esse valor cai para 4 µg/ml (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). Em relação à toxicidade aguda em camundongos, a DL<sub>50</sub> ficou entre 60-100 mg/Kg. De acordo com a classificação de HODGE & STERNER (1944), ela é moderadamente tóxica. Esses autores classificaram as substâncias conforme a toxicidade aguda para ratos, da seguinte forma: doses de 100 µg/Kg a 1 mg/Kg (extremamente tóxicas), 1 a 10 mg/Kg (altamente tóxicas), 10 a 100mg/Kg (moderadamente tóxicas), de 100 a 1 g/Kg (levemente tóxica), de 1 a 10g/Kg (praticamente não tóxicas) e >10g (relativamente não perigosas).

Estudos posteriores necessitam ser feitos para avaliar como a dactylomelina-P se comporta *in vivo*, relacionando sua dose efetiva e sua dose tóxica.

Os estudos de localização da dactylomelina-P no animal permitiram chegar a algumas conclusões interessantes. Primeiro, os resultados do *Western Blot* mostraram que o anticorpo anti-dactylomelina-P reconheceu proteínas de massa molecular correspondente a esta proteína presentes nas glândulas opalina, de tinta e albúmem.

É possível especular que haja de fato homologia entre a dactylomelina-P e as proteínas de 60 kDa dessas glândulas. Entre os moluscos, especificamente as lesmas-do-mar, já foram encontradas homologias entre proteínas de diferentes partes do corpo. Por exemplo, foi demonstrado que a APIT e a escapina, ambas isoladas de tintas de aplísias, possuem 93% de identidade em suas seqüências de aminoácidos (BUTZKE *et al.*, 2004). Escapina também possui 61% de identidade com ciplasina L, uma proteína isolada de uma preparação tinta/opalina de *A. punctata* (PETZELT *et al.*, 2002) e 61% e 60% de identidade com as aplysianinas A da glândula de albúmem de *A. kurodai* (KAMIYA *et al.*, 1986) e *A. californica* (CUMMINS *et al.*, 2004), respectivamente. Também foi encontrada 48% de identidade entre escapina e achacina, uma proteína antibacteriana isolada de uma lesma terrestre *Achatina fulica* (OBARA *et al.*, 1992). De maneira geral, observa-se uma grande homologia entre as L-amino oxidases, tendo sido relatado 21% de identidade entre a

escapina, por exemplo, e apoxina I, isolada da glândula de veneno da cobra *Crotalus atrox* (TORII *et al.*, 2000).

O anticorpo anti-dactylomelina-P não reagiu com nenhuma proteína de massa molecular semelhante presente nos extratos da glândula digestiva, coração, papo e nem na hemolinfa. Algumas fracas interações observadas com alguns componentes de massa molecular mais alta ou mais baixa, podem ser atribuídas à natureza policlonal do anticorpo, que reagiu cruzadamente com epítomos dessas moléculas.

Esses resultados reforçam a hipótese de que o local de produção da dactylomelina-P é a própria glândula de tinta onde ela é liberada juntamente com os pigmentos, que já se sabe, são de origem da dieta (COELHO *et al.*, 1998). BEZERRA *et al.* (2004) também não encontraram relação imunológica entre as proteínas da tinta e das algas da dieta.

A análise histológica da glândula de tinta de *A. dactylomela* mostrou ser esta formada de vesículas de diferentes diâmetros, permeadas por fibras em várias direções e também em volta das vesículas, além de algumas células dispersas. O conteúdo das vesículas se cora com azul de bromofenol, indicando que contém material de natureza protéica. A glândula é recoberta por um epitélio cúbico voltado para a face externa e um epitélio colunar, voltado para o manto. A presença de um epitélio colunar indica uma função secretora. O epitélio cúbico se invagina formando os ductos da vesícula, por onde a tinta é liberada (BEZERRA, 2001). A glândula de tinta de *A. californica* apresenta uma organização semelhante. Entretanto, seu estudo por microscopia eletrônica de transmissão revelou mais detalhes de seus constituintes. Destacam-se três tipos de células, sendo uma delas rica em retículo endoplasmático rugoso (RER), onde provavelmente ocorre a síntese de proteínas secretadas com a tinta. O segundo tipo é formado por células granulares, menos comuns e maiores do que as células RER. O último tipo compreende as células da vesícula que formam um estrato adjacente à camada de fibras que envolvem as vesículas liberadoras de tinta. Acredita-se que esses tipos celulares possam corresponder a diferentes estágios de desenvolvimento ou maturação de um mesmo tipo de célula. (PRINCE *et al.*, 1998).

Como revelado pela análise imunohistoquímica da glândula de tinta a dactylomelina-P se encontra apenas nas vesículas. Não foi detectada marcação em nenhum

outro local da glândula. Dessa forma, a proteína deve ser sintetizada pelas células que envolvem as vesículas e, de alguma maneira, é liberada na sua luz.

Esses resultados não permitem afirmar nada sobre o local e forma de ligação entre a dactylomelina-P e os pigmentos derivados de algas vermelhas. COELHO *et al.* (1998) mostraram que o pigmento púrpuro é separado das proteínas algais na glândula digestiva, sendo transportado pela hemolinfa até a glândula de tinta, onde é armazenado nas vesículas.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem com a idéia levantada por vários autores de que invertebrados marinhos secretam proteínas para se defenderem do ataque de patógenos e/ou predadores. A identificação dessas proteínas ou peptídeos em diferentes grupos filogenéticos, além de contribuir para a compreensão da evolução dos mecanismos de defesa dos animais, em geral, possibilita a revelação de uma variedade de novas substâncias que podem ser utilizadas diretamente no desenvolvimento de novos medicamentos e ou produtos industriais.

## 8. CONCLUSÃO

Este trabalho mostra, pela primeira vez, que a tinta secretada pela lesma-do-mar *Aplysia dactylomela* é rica em proteínas, contendo mais de 40 proteínas/peptídeos, e que a dactylomelina é a proteína mais abundante. As características físico-químicas e biológicas desta proteína corroboram com o seu envolvimento na defesa química do animal.

Na glândula de tinta a dactylomelina é encontrada nas células que envolvem as vesículas secretoras, onde é sintetizada, portanto, não tendo nenhuma relação com as algas da dieta, como os pigmentos. Nem todas as vesículas são produtoras desta proteína, já que a imunohistoquímica revelou de forma clara a existência de vesículas com e sem marcação com dactylomelina. A proteína não é encontrada em nenhum outro local da glândula, além das vesículas, onde fica acumulada até ser excretada após estímulos.

A potente atividade antibacteriana da dactylomelina-P, associada a baixa ou ausência de toxidez a vários sistemas biológicos, a distingue como uma promissora droga natural para o controle de agentes infecciosos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. Ed. Revinter, 5<sup>a</sup> Edição, 580 p., 2005.

AMBROSE, H. W.; GIVENS, R. P.; CHEN, R. & AMBROSE, K. P. Distastefulness as a defense mechanism in *Aplysia brasiliana* (Mollusca: Gastropoda). *Mar. Behav. Physiol.*, v. 6, p. 57-64, 1979.

AVILA, C. Natural products of Opisthobranchia molluscs: A biological review. *Ocean. Mar. Biol. Anni. Rev.*, v. 33, p. 487-559, 1995.

BAKUS, G. J.; TARGETT, N.M. & SCHULTE, B. Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Ecol.*, v. 12, n. 5, p. 951-987, 1988.

BARREIRA, L. A. *Composição química do fluido púrpuro do molusco Aplysia dactylomela Rang, 1828 e seu possível papel na defesa do animal*. Monografia de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 64 p. Ceará, 2003.

BATISTA, M. G. L. *Susceptibilidade de Staphylococcus aureus frente à ação da dactylomelina-P, uma proteína isolada da tinta do molusco Aplysia dactylomela*. Monografia de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 49 p., Ceará, 2004.

BAUER, A. W.; KIRB, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v. 45, p. 493-495, 1966.

BERNHEIMER, A. W. Assay of hemolytic toxins. *Methods Enzimol.*, v. 165, p. 213-217, 1988.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D. & WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemical*, v. 4, p. 14-19, 1996.

BEZERRA, L. E. A. *Biologia populacional do molusco Aplysia dactylomela Rang, 1828 (Gastropoda: Opisthobranchia) em duas praias do litoral cearense e a relação da dieta algal com a produção de fluido púrpuro*. Monografia de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, 78 p., 2001.

BEZERRA, L. E. A.; CARVALHO, A. F. U.; BARREIRA, L. A.; NOGUEIRA, V. L. R.; SILVA, J. R. F.; VASCONCELOS, I. M. & MELO, V. M. M. The relationship between seaweed diet and purple ink production in *Aplysia dactylomela* Rang, 1828 (Gastropoda: Opisthobranchia) from northeastern Brazil. *J. Shellfish Res.*, v. 23, n. 2, p. 581-584, 2004.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in poliacrilamida gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987.

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

BULET, P.; STÖCKLIN, R. & MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, v. 198, p. 169-184, 2004.

BUTZKE, D.; MACHUY, N.; THIEDE, B.; HURWITZ, R.; GOEDERT, S. & RUDEL, T. Hydrogen peroxide produced by *Aplysia* ink toxin kills tumor cells independent of apoptosis via peroxiredoxin I sensitive pathways. *Cell. Death Differ.*, v. 11, p. 608-617, 2004.

BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S. & RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon*, v. 46, p. 479-489, 2005.

CAREFOOT, T. H. *Aplysia*: Its biology and ecology. *Ocean. Mar. Ann. Rev.*, v. 25, p. 167-284. Margaret Barnes, Ed. Aberdeen University Press, 1987.

CAREFOOT, T. H. A comparison of time/energy budgeting in two species of tropical sea hares *Aplysia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 131, p. 267-282, 1989.

CAREFOOT, T. H.; PENNING, S. C. & DANKO, J. P. A test of novel functions (s) for the ink of sea hares. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v. 234, p. 185-197, 1999.

CAREW, T. J., KANDEL, E. R., Inking in *Aplysia californica*. I. Neural circuit of an all-or-none behavioral response. *J. Neurophysiol.*, v. 40, p. 692-707, 1977.

CARTÉ, B. K. Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*, v. 46, n. 4, p. 271-286, 1996.

CHAPMAN, D. J. & FOX, D. L. Bile pigment metabolism in the sea-hare *Aplysia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 4, p. 71-78, 1969.

CIMINO, G.; DE ROSA, S.; DE STEFANO, S.; MORRONE, R. & SODANO, G. The chemical defense of nudibranch molluscs. *Tetrahedron*, v. 41, n. 6, p. 1093-1100, 1985.

COELHO, L.; PRINCE, J. & NOLEN, T.G. Processing of defensive pigment in *Aplysia californica*: acquisition, modification and mobilization of the red algal pigment r-phycoerythrin by the digestive gland. *The J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 425-438, 1998.

COLWELL, R. R. Biotechnology in the marine sciences. *Science*, v. 222, n. 4619, p. 19-23, 1983.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Exp. Opin. Investig. Drugs*, v. 9, n. 12, p. 1-15, 2000.

CUMMINS, S. F.; NICHOLS, A. E.; AMARE, A.; HUMMON, A. B. ; SWEEDLER, J. V. & NAGLE, G. T. Characterization of *Aplysia* enticing and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J. Biol. Chem.*, 279, p. 25614-25622, 2004.

DiMATTEO, T. The inking behavior of *Aplysia dactylomela* (Gastropoda: Opisthobranchia): Evidence for distastefulness. *Mar. Behav. Physiol.*, v. 7, p. 285-290, 1981.

DiMATTEO, T. The ink of *Aplysia dactylomela* (Rang, 1828) (Gastropoda: Opisthobranchia) and its role as a defensive mechanism. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 57, p. 169-180, 1982.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350 -356, 1956.

DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 25, p. 447-477, 1980.

EALES, N. B. *Aplysia*. Liverpool Marine Biology Committee Memoirs, n. 24, W. A. Herdman & Johnstone, Liverpool University Press, Liverpool, 84 p., 1921.

EDMUNDS, M. Protective mechanisms in the Eolidacea (Mollusca: Nudibranchia). *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)*, v. 47, n. 308, p. 27-71, 1966.

FAULKNER, D. J. & GHISELIN, M. T. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranchs gastropods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 13, p. 295-301, 1983.

FAULKNER, D.J. Feeding deterrents in mollusks. *Mem. Cal. Acad. Sci.*, v. 13, p. 29-36, 1988.

FAULKNER, D. J. Chemical defenses in marine mollusks. *In Ecol. Rol. Mar. Nat. Prod.* Paul, V. J. (ed) Comstock, Ithaca, NY, p. 119-163, 1992.

FINK, W.; LIEFLAND, M. & MENDGEN, K. Chitinases and  $\beta$ -1,3 glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa L.*). *Plant Physiol.*, v. 88, p. 270–275, 1988.

FIORITO, G. & GHERARDI, F. Behavioral changes induced by ink in *Aplysia fasciata* (Mollusca, Gastropoda): Evidence for a social signal role of inking. *Mar. Beh. Physiol.*, v. 17, p. 129-135, 1990.

FREITAS, J. C. & MENDES, E. G. Farmacologia marinha: importância e desenvolvimento no país. *Ciênc. Cult.*, v. 38, n. 7, p. 1207-1213, 1986.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C. & BOGUTH, G. The current state of two- dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

HASTEALD, B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. *Invertebrates*, US Government Printing Office, Washington DC, v. 1, p. 20-770, 1965.

HIGUCHI, R.; MIYAMOTO, T.; YAMADA, K. & KOMORI, T. Cytotoxic and ichthyotoxic compounds from marine Opisthobranchia and soft coral. *Toxicon*, v. 36, n. 11, p. 1703-1705, 1998.

HOCHLOWSKI, J. E. & FAULKNER, D. J. Antibiotics from the marine pulmonate *Siphonaria diemenensis*. *Tetrah. Lett.*, v. 24, p. 1917-1920, 1983.

HODGE, H. C. & STERNER, J. H. tabulation of toxicity classes. *Ind. Hyd. Quart.*, v. 10, p. 94-97, 1944.

IJIMA, R.; KISUGI, J. & YAMAZAKI, M. Antifungal activity of aplysianin E, a cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 19, n. 1, p. 13-19, 1995.

IJIMA, R.; KISUGI, J. & YAMAZAKI, M. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 27, p. 305-311, 2003.

IRELAND, C. M.; ROLL, D. M.; MOLINSKI, T. F.; McKEE, T. C.; ZABRISKE, T. M. & SWERSEY, J. C. Uniqueness of the marine environment: categories of marine natural products from invertebrates. Ed. Biomedical importance of marine organisms. San Francisco. *Calif. Acad. Sci.*, p. 41-57, 1988.

IRELAND, C.; COPP, B.; FOSTER, M.; Mc DONALD, L.; RADISSKY, D. & SWERSEY, J. Biomedical potential of marine natural products. *Mar. Biotech.*, Pharmaceutical and bioactive natural products. New York, Plenum Press, v. 1, p. 1-43, 1993.

JACOBS, R. S.; CULVER, P.; LANGDON, R.; O'BRAIN, T. & WHITE, S. Some pharmacological observations on marine natural products. *Tetrahedron*, v. 41, p. 981-984, 1985.

JAY, G.D.; CULP, D. J. & JOHNKE, M. E. Silver staining of extensively glycosylated protein on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate binding dyes. *Anal. Biochem.*, v. 185, p. 324-330, 1990.

JIMBO, M.; NAKANISHI, F.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianina A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein. *Fisheries Sci.*, v. 69, p. 1240-1246, 2003.

JOHNSON, P. M. & WILLOWS, A. O. D. Defense in sea hares (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspeidea): Multiple layers of protection from egg to adult. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, v. 32, p. 147-180, 1999.

KAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. A natural agglutinin inhibitable by d-galacturonic acid in the sea hare *Aplysia* eggs: Characterization and Purification. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, v. 47, n. 2, p. 255-259, 1981.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. & YAMAZAKI, M. Aplysianin-A, an antibacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Experientia*, v. 42, p. 1065-1067, 1986.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R.; SAKAI, M.; ENDO, Y. & YAMAZAKI, M. Purification and characterization of an antineoplastic protein secretion of a sea hare *Aplysia Juliana*. *Toxicon*, v. 27, n. 12, p., 1269–1277, 1989.

KANDEL, E. R. *Behavioral Biology of Aplysia – A contribution to the comparative study of opisthobranch mollusks*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 463 p., 1979.

KICKLIGHTER, C. E.; SHABANI, S.; JOHNSON, P. M. & DERBY, C. D. Sea hares use novel antipredatory chemical defenses. *Curr. Biol.*, v. 15, p. 549-554, 2005.

KISUGI, J.; KAMIYA, H. & YAMAZAKI, M. Purification and characterization of aplysianin E, an antitumor factor from sea hare eggs. *Canc. Res.*, v. 47, p. 5649-5653, 1987.

KISUGI, J.; KAMAIYA, H.; YAMAZAKI, M. Purification of dolabellin C, an antineoplastic glycoprotein in the body fluid of sea hare *Dolabella auriculata*. *Dev. Com. Immunol.*, v. 13, p. 3-8, 1989.

KISUGI, J.; YAMAZAKI, M.; ISHII, Y.; TANSO, S.; MURATOMO, K. & KAMIYA, H. Purification of a novel cytotoxic protein from albumen gland of the sea hare *Dolabella auricularia*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 37, n. 10, p. 2773-2776, 1989.

KRIEGSTEIN, A. R. Stages in the post-hatching development of *Aplysia californica*. *J. Exp. Zool.*, v. 199, p. 275-288, 1977.

KUPFERMANN, I. & CAREW, T. J. Behavior patterns of *Aplysia californica* in its natural environment. *Behav. Biol.*, v.12, p. 317-337, 1974.

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

LITCHFIELD, J. T. J & WILCOXON, F. A simplified method for evaluation of dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therapy*, v. 96, p. 99-104, 1949.

MACCOOL, R.; GALIVAN, J.; BERNS, D. S.; NIMEC, Z.; GUARD-FRIAR, D. W. & WAGONER, D. The chromophore and polypeptide composition of *Aplysia* ink. *Biol. Bull. Mar. Biol.*, v. 179, p. 326-331, 1990.

MAYER, A. M. S. & HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprozoal, antituberculosis and antiviral

activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C, v. 140, p. 265-286, 2005.

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

MELO, V. M. M.; DUARTE, A. B. G.; CARVALHO, A. F. F. U.; SIEBRA, E. A. & VASCONCELOS, I. M. Purification of a novel antibiotic and haemagglutinating protein from purple fluid of the sea hare *Aplysia dactylomela* Rang 1828. *Toxicon*, v. 38, n. 10, p.1415-1427, 2000.

MERKER, M. P. & LEVINE, L. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and stimulates arachidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. *Toxicon*, v. 24, n. 5, p. 451- 465, 1986.

MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, v. 59, p. 783-787, 1977.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method.*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAJIMA, Y.; ISHIBASHI, J.; YUKUHIRO, F.; ASAOKA, A.; TAYLOR, D. & YAMAKAWA, M. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Bioch. Biophys Acta*, v. 1624, p. 125-130, 2003.

NELSON, N. A Photometric Adaptation of the Somogy Method of Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, v. 153, p. 375-380, 1944.

NISTRATOVA, S. N.; MITSKEVICH, I. N.; MIRABETREGALADO, M. E. & JOSEF, N. Inhibitory effect of purple fluid produced by a mollusk *Aplysia punctata* on growth of Gram-negative marine bacteria. *Microbiology*, v. 61, n. 5, p. 630-632, 1992.

NOLEN, T. G.; JOHNSON, P. M.; KICKLIGHTER, T. & CAPO, T. Ink secretion by the marine snail *Aplysia californica* enhances its ability to escape from a natural predator. *J. Comp. Physiol.*, v. 176, p. 239-254, 1995.

OBARA, K.; OTSUKA, FUCHINO, H.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T. & TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of giant African snail, *Achacina fulica* Ferussac. *Eur. J. Biochem.*, v. 209, p. 1-6, 1992.

O'BRIEN, M. & COLWELL, R. R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminide. *App. Environm. Microbiol.*, v. 7, p. 1718-1720, 1987.

OREN, Z. & SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, v. 47, p. 451-463, 1998.

PAUL, V. J. & PENNINGS, S. C. Diet-derived chemical defenses in the sea hare *Stylocheilus longicauda*. (Quoy et Gaimard 1824), v. 151, p. 227-243, 1991.

PENNINGS, S. C. & PAUL, V. J. Sequestration of dietary secondary metabolites by three species of sea hares: location, specificity and dynamics. *Mar. Biol.*, v. 117, p. 535-546, 1993.

PENNINGS, S. C. Interspecific variation in chemical defenses in the sea hares (Opisthobranchia: Anaspidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.180, p. 203-219, 1994.

PEREIRA, R. C. & SOARES – GOMES, A. *Biologia Marinha*. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 363 p., 2002.

PETZELT, C.; JOSWIG, G.; STAMMER, H. & WERNER, D. Cytotoxic cyplasin of sea hare, *Aplysia punctata*, cDNA cloning, and expression of bioactive recombinants in insect cells. *Neoplasia*, v. 4, p. 49-59, 2002.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plants defense proteins. *Plant Physiol.*, v. 109, p. 347-352, 1995.

POLATTO, J. M.; OLIVEIRA, J. S. & FREITAS, J.C. Atividade hemolítica e antimitótica da secreção púrpura de *Aplysia brasiliana* (Mollusca: Opisthobranchia): resultados preliminares. *XVII Simpósio Brasileiro de Biologia Marinha*, Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, 2002.

PRINCE, J.; NOLEN, T. G. & COELHO, L. Defensive ink pigment processing and secretion in *Aplysia californica*: concentration and storage of phycoerythrobilin in the ink gland. *The J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 1595-1613, 1998.

RAJAGANAPATHI, R., KATHIRESAN, K. Heparinase in purple fluid of the sea hare, *Bursatella leachii*. *Curr. Sci.*, v. 82, n. 3, p. 264-266, 2002.

RAJAGANAPATHI, R.; KATHIRESAN, K. & SINGH, T.P. Purification of anti-HIV protein purple fluid on the sea hare *Bursatella leachii* de Blainville. *Mar. Biotechnol.* v. 4, p. 447-453, 2002.

RIOS, E. C. *Seashells of Brazil*, 2ª Edição. Fundação Universitária do Rio Grande. Museu Oceanográfico, Rio Grande, 330 p., 1994.

ROBERTS, W. K., SELITRENNIKOFF, C. P. Zeamantin, na antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.*, v. 136, p. 1771-1778, 1990.

ROGERS, C. N.; STEINBERG, P. D. & DENYS, R. Factors associated with oligophagy in 2 species of sea hares (MOLLUSCA, ANASPIDEA). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 192, n. 1, p. 47-73, 1995.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. *Imunologia*. Ed. Manole, São Paulo, 301 p., 1989.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. Editora Rocca, São Paulo, 6<sup>a</sup> Edição, 1029 p., 1996.

SAKAMOTO, Y.; NAKAJIMA, T.; MISAWA, S.; ISHIKAWA, H.; ITOH, Y.; NAKASHIMA, T.; OKANOUE, T.; KASHIMA, K. & TSUJI, T. Acute liver damage with characteristic hepatocytes by ingestion of *Aplysia kurodai*, a sea hare. *Int. Méd.*, v. 37, n. 11, p. 927-929, 1998.

SALZET, M. Vertebrate innate immunity resembles of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.*, v. 22, p. 285-288, 2001.

SOLÉ-CAVA, A. M. & KELECOM, A. Diálogo químico nos mares. *Ciência Hoje*, v. 8, n. 46, p. 18-29, 1988.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, v. 195, p. 19-23, 1952.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

STOPFER, M.; CHEN, X. & CAREW, T. J. Evoked ink release in *Aplysia* produces inhibition of the siphon withdrawal reflex in neighbouring conspecifics. *Behav. Neural Biol.*, v. 60, p. 196-204, 1993.

SUFFNESS, S. M. & PEZZUTO, J. M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. In: K. Hostettmann (ed.), *Methods Plant Biochem.*, v. 9, p. 71-133, 1991.

TAKAMATSU, N.; SHIBA, T.; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. Molecular cloning of defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. *FEBS Lett.*, v. 377, p. 373-376, 1995.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; DE BOLLE, M. F. C.; VAN LEUVEN, F.; RESS, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. & BROEKAERT, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15301-15309, 1992.

THOMPSON, T. E. Defensive adaptations in opisthobranchs. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, v. 39, p. 123-134, 1976.

TOBACH, E.; GOLG, P. & ZIEGLER, A. Preliminary observation of the inking behavior of *Aplysia (Varria)*. *The Veliger*, v. 8, n. 1, p. 16-18, 1965.

TORII, S.; YAMAME, K.; MASHINA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M. & TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxina I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, v. 39, p. 3197-3205, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNK, B. R. & CASE, C. L. *Microbiologia*. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 6ª Edição, 827 p., 2000.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, T. & GORDON, J. Electroporetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TROXLER, R. R.; OFFNER, G. D. & CAPO, T. R. Structural studies on aplysiotoxin. *The Biol. Bull.*, v. 161, p. 339, 1981.

TRUDEL, J. & ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, v. 178, p. 362-366, 1989.

VIGERS, A. J.; ROBERTS, W. K. & SELITRENNIKOFF, C. P. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, v. 4, p. 315-323, 1991.

VIZIOLI, J. & SALZET, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *TRENDS Pharmacol. Sci.*, v. 23, n. 11, p. 494-496, 2002.

WALTERS, E. T. & ERICKSON, M. T. Directional control and the functional organization of defensive responses in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. Part A*, v. 159, p. 339-351, 1986.

WITSTREICH, G. A., LECHTMAN, M. D. *Microbiologia das Doenças Humanas*. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2ª Edição, 661 p., 1980.

YAMAZAKI, M.; KIMURA, K.; KISUGI, J. & KAMIYA, H. Purification of a cytolytic factor from purple fluid of a sea hare. *FEBS Lett.*, v. 198, p. 25-28, 1986.

YAMAZAKI, M.; KIMURA, K.; KISUGI, J.; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. Isolation and characterization of a novel cytolytic factor in the purple fluid of the sea hare *Aplysia kurodai*. *Canc. Res.*, v. 49, p. 3834-3838, 1989a.

YAMAZAKI, M.; TANSO, S.; KISUGI, J.; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. Purification and characterization of a cytolytic protein from purple fluid of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 37, p. 2179-2182, 1989b.

YAMAZAKI, M.; O HYE, H.; KISUGI, J. & KAMIYA, H. Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. *Dev. Comp. Immun.*, v. 14, p. 379-383, 1990.

YANG, H.; JOHNSON, P.M.; KO, K.C.; KAMIO, M.; GERMANN, M. W.; DERBY, C. D. & TAI, P. C. Cloning, characterization and expression of escaping, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*. *The J. Exp. Biol.*, v. 208, p. 3609-3622, 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, v. 415, p. 389-395, 2002.

