



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
LECTINA EXTRAÍDA DA ESPONJA MARINHA *Pseudosuberites* sp.**

FORTALEZA

2022

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DA ESPONJA MARINHA *Pseudosuberites* sp.

Trabalho supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda
Sampaio.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T117p Tabosa, Pedro Arthur Sousa.
Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma lectina extraída da esponja marinha Pseudosuberites
sp / Pedro Arthur Sousa Tabosa. – 2022.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Esponja. 2. Lectina. 3. Biotecnologia. I. Título.

CDD 639.2

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DA ESPONJA MARINHA *Pseudosuberites* sp.

Trabalho supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro de Pesca. Área de concentração:
Biotecnologia marinha.

Aprovada em: 10 / 02 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Criador e à minha família, que sempre estiveram ao meu lado ao longo dessa longa caminhada. Em especial, agradeço aos meus pais, Ednaldo e Vanderlúcia, e ao meu irmão, Pedro Matheus, que sempre estiveram comigo me apoiando a cada momento da minha vida.

Agradeço aos meus demais professores que tiveram um papel importantíssimo ao longo da minha trajetória, tanto no âmbito acadêmico quanto na vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, pelo voto de confiança em me orientar no desempenho dos meus trabalhos ao longo da Iniciação Científica e por auxiliar na realização do Trabalho de Conclusão de Curso.

Um agradecimento especial aos meus professores de bancada, Prof. Dr. Rômulo Farias, Prof. Dr. Celso Nagano, Dra. Renata Pinheiro, Regivânio Nascimento e Renato Cezar que sempre estiveram lá quando eu necessitava de auxílio. Muito obrigado pelos momentos de risos e descontração nas horas do café.

Um agradecimento mais que especial aos meus irmãos siameses que adotei durante o curso. Raysa Pâmela, Gabriel Cândido e Thifany Saldanha, meus irmãos do curso que sempre fizeram essa jornada ficar mais leve. Seja nos momentos de estudos, de brigas, de risos, dos lanches na Tia Graça, ou nos momentos de descontração nos bancos do departamento. Cada momento único e eternizado, seja por fotos, vídeos ou lembranças, será lembrado para sempre.

Agradeço aos outros companheiros e amigos, que conheci ao longo do curso e que também me ajudaram bastante ao longo dessa caminhada. Professor Manuel Furtado, eterna inspiração como Engenheiro de Pesca, Professor e ser humano. Gabriel Lourenço, Ana Karoline, Maria Tereza, Fernando Igor, Leonardo, e tantos outros que foram importantes em determinados passos na minha trajetória como graduando.

Aos meus companheiros de bancada ao longo desses anos como bolsista eu lhes digo, muito obrigado por cada momento de felicidade e aprendizado. Alexandra, minha primeira amiga de laboratório que teve paciência em me ensinar quando eu precisava. Vitória Lima, obrigado por compartilhar minhas aflições quando eu era um bolsista iniciante. Andressa Rocha, Victória Régia e Jéssica Duarte, minhas queridas amigas que a UFC me deu, agradeço por cada momento de paciência comigo, pelos momentos de aprendizado e comemorações ao longo desses anos. Juliana, Philippe, Vinícius, Lívia, Maria Luiza e Pedro Abílio, obrigado por tornarem meus dias mais leves e alegres ao longo dessa caminhada.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

- Sócrates.

RESUMO

Os organismos pertencentes ao filo Porifera, são animais filtradores e sésseis. Eles podem possuir muitas características morfológicas distintas, incluindo tamanhos, cores e formas. O Filo Porifera compreende um grupo de animais com mais de 9.400 espécies. A maioria das espécies conhecidas pertencem ao habitat marinho. Nas últimas décadas, a busca por compostos bioativos tem se intensificado em larga escala. Dentre esses compostos, as lectinas de esponjas marinhas possuem um alto potencial biotecnológico. As lectinas são um grupo de proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos, sem causarem alterações nos mesmos. As lectinas podem atuar de diversas maneiras no organismo, inclusive no sistema imunológico de invertebrados. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar uma lectina presente na esponja marinha *Pseudosuberites* sp. A lectina foi isolada a partir da combinação de precipitação proteica com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica, em matriz DEAE-Sephacel, sendo denominada PssL (*Pseudosuberites* sp. lectin). A nova lectina possui atividade hemaglutinante estável até 40°C, ocorrendo variações na atividade lectínica quando aquecida acima dessa temperatura, perdendo 50% da atividade a partir de 50°C, apresentando atividade hemaglutinante ótima em pH 9. Em SDS-PAGE apresentou duas bandas proteicas (17 kDa e 33 kDa) em condições não redutoras e três bandas proteicas (17 kDa, 30 kDa e 33 kDa) em condições redutoras.

Palavras-chave: esponja; lectina; biotecnologia.

ABSTRACT

The organisms belonging to the phylum Porifera are filtering and sessile animals. They can possess many distinct morphological characteristics, including sizes, colors, and shapes. The Phylum Porifera comprises a group of animals with more than 9,400 species. The most known species belong to the marine habitat. In the last decades, the search for bioactive compounds has intensified on a large scale. Among these compounds, marine sponge lectins have a high biotechnological potential. Lectins are a group of proteins capable of reversibly binding to carbohydrates, without causing changes to them. Lectins can participate in several processes in the organism, including the invertebrate immune system. The objective of this work was to purify and characterize a lectin present in the marine sponge *Pseudosuberites* sp. The lectin was isolated from the combination of protein precipitation with ammonium sulphate and ion exchange chromatography, in DEAE-Sephacel matrix, called PssL (*Pseudosuberites* sp. lectin). The new lectin has stable hemagglutinating activity up to 40°C, with variations in lectin activity occurring when heated above this temperature, losing 50% of the activity from 50°C and showing optimal hemagglutinating activity at pH 9. In SDS-PAGE two protein bands (17 kDa and 33 kDa) under non-reducing conditions and three protein bands (17 kDa, 30 kDa and 33 kDa) under reducing conditions.

Keywords: sponge; lectin; biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel da fração F(0-70)	20
Figura 2 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante	22
Figura 3 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante	22
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de PssL na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante do extrato bruto da esponja marinha <i>Pseudosuberites</i> sp. contra eritrócitos humanos (U.H./mL)	21
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Esponjas	12
1.2	Lectinas	13
1.2.1	<i>Definição e aplicações</i>	13
1.2.2	<i>Lectina de animais</i>	14
1.2.3	<i>Lectinas de esponjas</i>	15
2	METODOLOGIA	17
2.1	Coleta dos animais	17
2.2	Preparo do extrato bruto	17
2.3	Purificação da lectina	17
2.4	Caracterização bioquímica	18
2.4.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	18
2.4.2	<i>Inibição da atividade hemaglutinante</i>	18
2.4.3	<i>Efeito da temperatura, pH e EDTA</i>	19
2.4.4	<i>Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE</i>	19
3	RESULTADOS	20
3.1	Purificação da lectina	20
3.2	Caracterização bioquímica	20
3.2.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	20
3.2.2	<i>Inibição da atividade hemaglutinante</i>	21
3.2.3	<i>Efeito da temperatura, pH e EDTA</i>	21
3.2.4	<i>Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE</i>	23
4	DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

Porífera (do latim *porus* = “poro”; *ferre* = “possuir”) é um filo compreende um conjunto diversificado de organismos aquáticos, sésseis, que não possuem órgãos, tecidos, células sensoriais ou nervosas, nem linhagens germinativas predeterminadas. São compostos por um conjunto de células que desempenha funções individualmente, dentre elas: sustentação, revestimento, alimentação e excreção. Estas células estão embebidas em uma matriz extracelular e sustentadas por um esqueleto de espículas aculeiformes e proteínas. As esponjas, como são chamadas usualmente, possuem um sistema aquífero formado por células flageladas, que executam o bombeamento de água pelo seu corpo para obtenção de alimento, efetuar trocas gasosas e excreções (FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016; HICKMAN; ROBERTS; KEEN, 2016).

Dentre as mais de 9.400 espécies válidas descobertas, a maioria são espécies de ambientes marinhos. Estas podem ser encontradas em todos os mares, em diversas profundidades e podem apresentar várias formas e tamanhos. Os indivíduos pertencentes a esse filo são divididos em quatro Classes: Calcarea, Hexactinellida, Homoscleromorpha e Demospongiae (PECHENIK, 2016; VAN SOEST *et al.*, 2022).

A Classe Demospongiae é a mais diversificada e compreende a maioria desses organismos. Geralmente as esponjas pertencentes a essa classe possuem espículas e fibras de sustentação compostas por espongina e/ou sílica. Além disso, também é responsável por abranger a maioria das espécies de água doce (PECHENIK, 2016).

Espécies de esponja pertencentes ao gênero *Pseudosuberites* estão distribuídas em todo o globo terrestre. Além do Brasil, já foram evidenciados espécimes no Japão, Namíbia, Chile e em diversos outros países. A variabilidade de formas, cores, tamanhos e nível de incrustação estará diretamente relacionado com a espécie, podendo possuir várias características morfológicas externas distintas (NASCIMENTO, 2019).

Recentemente, a busca por compostos naturais bioativos tem se intensificado em larga escala. Dentre os invertebrados marinhos, os organismos do filo Porífera passaram ser uma fonte de novos compostos de interesse devido ao potencial de aplicações biotecnológicas dos mesmos (PECHENIK, 2016; CARNEIRO *et al.*, 2017), tais como: anticâncer (QUEIROZ *et al.*, 2009), atividade antibiótica (MARQUES *et al.*, 2018) e outros (SIPKEMA *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2019). Porém, em relação ao número de espécies

do filo porífera há poucas espécies onde foram realizados estudos aprofundados.

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição e aplicações

Originalmente, as lectinas foram primeiramente denominadas como fitohemaglutinas, por serem detectadas inicialmente em extratos de plantas. No que se refere à substâncias que são capazes de realizar humaglutinação, têm-se documentado indicativos desde o final do século XIX. Dentre essas evidências, as principais estão relacionadas as substâncias oriundas de plantas (SHARON; LIS, 2004). O termo “lectina” (do latim *legere* = escolher ou selecionar) foi proposto pela primeira vez para definir aglutininas com capacidade de distinguir eritrócitos de tipos sanguíneos distintos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Em 1980, foi proposto que o termo lectina deveria ser usado para se referir a proteína que se ligam a carboidratos ou glicoproteínas de origem não-imune com capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Porém esse termo excluiu proteínas monovalentes ligantes a carboidratos tais como: ricina e abrina (KILPATRICK, 2002; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Anos mais tarde, Sampaio e colaboradores definiram lectinas como proteínas capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura dos mesmos. Sendo estas, proteínas ubíquas, podendo ser encontradas em plantas, bactérias, fungos e animais (SAMPAIO *et al.*, 2002).

Ao longo do século XX, pesquisas sobre novos compostos, com capacidade de hemaglutinação, foram altamente amplificadas e analisadas. Em 1919, foi obtida, pela primeira vez, uma hemaglutinina na forma pura chamada concanavalina A, extraída de sementes de *Canavalia ensiformis* (SHARON; LIS, 2004). Na década de 60, foram realizadas duas grandes descobertas no estudo de lectinas. A lectina PHA, extraída de sementes de feijão *Phaseolus vulgaris*, se mostrou um agente mitogênico sobre linfócitos, estimulando estes a sofrerem mitose (NOWELL, 1960). Essa descoberta teve impacto sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos não possuíam capacidade de se dividir ou se diferenciar. A segunda descoberta refere-se a capacidade da lectina encontrada no gérmen de trigo (WGA) de realizar aglutinação de células malignas (AUB; TIESLAU; LANKESTER, 1963; AUB; SANFORD; COTE, 1965; TSANEVA; VAN DAMME, 2020)

Outra descoberta bastante promissora foi a da conglutinina bovina. Esta foi a primeira lectina que foi associada ao sistema imune animal. Além desta, a descoberta das

lectinas ligantes de manana (MBLs) foi um grande feito no século passado. Em 1989, ficou comprovado a relação entre a atividade opsônica e as MBLs, tornando estas uma das lectinas mais estudadas e meticulosamente caracterizadas nesse século. (KILPATRICK, 2000).

Com a introdução da técnica de cromatografia de afinidade, que se baseia na capacidade da lectina de se ligar especificamente à carboidratos, o número de lectinas purificadas se tornou cada vez maior (SHARON, 2008). Isso resultou em um aumento das pesquisas para descobrir quais são as funções biológicas de cada proteína e como estas podem ser aplicadas ao uso biotecnológico.

1.2.2 Lectina de animais

Com relação a lectinas de animais, estudos sugerem que a primeira atividade lectínica foi observada com uma proteína extraída do veneno de cobra por S.W Mitchell, por volta de 1860. Com o passar dos anos, as lectinas de veneno de cobra foram sendo cada vez mais estudadas. Apenas em 1980 que a primeira lectina de veneno de cobra foi isolada na forma pura. Esta foi extraída de *Bothrops atrox* e foi denominada de trombolectina (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980; KILPATRICK, 2002).

Durante a metade do século XX, já haviam sido publicados estudos relacionados a lectinas de outros animais. Dentre elas, a lectina isolada de *Anguilla anguilla*, que se tornou bastante evidente no âmbito científico. Watkins e Morgan, em 1952, demonstraram que a lectina possuía especificidade a fucose, sendo uma importante descoberta para os estudos relacionados aos carboidratos presente nos grupos sanguíneos humanos, em especial ao Grupo O (GERCKEN; RENWRANTZ, 1994). Na década de 60, houve os primeiros relatos científicos sobre lectinas de animais com especificidade ao Grupo A, sendo a mais notória é a lectina extraída do caracol *Helix pomatia* (KILPATRICK, 2002).

No final da década de 80, tendo como base o conhecimento sobre as estruturas primárias de lectinas animais, era possível concluir que a maioria poderia ser classificada em dois grupos principais: Lectinas do Tipo C e Lectinas do Tipo S. O primeiro grupo requeria uma dependência de Ca^{2+} para possuir atividade lectínica, enquanto que o segundo grupo era dependente de ligação à beta-galactosídeos. Naquele momento, as poucas exceções que não se encaixavam nos grupos principais eram agrupadas em um grupo heterogêneo denominado Lectinas Tipo-N (KILPATRICK, 2002).

Atualmente, ainda referente as classificações das lectinas, estas podem ser reunidas no grupo das Galectinas, ou lectinas do Tipo S, que são proteínas encontradas tanto em

vertebrados quanto em invertebrados e exibem uma alta especificidade por resíduos de galactosídeos. Diferentemente das demais lectinas encontradas em outros animais, estas podem criar moléculas complexas na presença de Ca^{2+} , além de possuir uma alta afinidade para sacarídeos contendo *N*-acetil-galactosamina. Além das galectinas, as Lectinas do Tipo C são lectinas comuns tanto em bactérias quanto em animais. Este grupo de lectinas possuem ligações aos resíduos de carboidratos, condicionados pela presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} , presentes no ambiente. Por serem uma das famílias de lectinas mais bem estudadas do mundo, as lectinas do Tipo C podem compartilhar de algumas características estruturais típicas, tais como o domínio de reconhecimento a carboidrato, posições da ponte dissulfeto e local de ligação de cálcio. As lectinas ainda podem pertencer ao grupo das Tachylectinas. Este grupo de proteínas geralmente possui atividade antimicrobiana contra procariotos, devido a sua ligação com os carboidratos presentes na membrana dos mesmos. Além disso, exibem seis domínios repetidos. (GARDÈRES *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2021; WU; LIU, 2018).

Lectinas de animais podem desempenhar várias funções. A mais frequente, está relacionada ao funcionamento do sistema imunológico. Essas moléculas podem agir de diversas formas, defesa direta (semelhante a anticorpo e/ou complemento); reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico; regulação imunológica (supressão ou aumento); e prevenção da autoimunidade. (KILPATRICK, 2002).

Nos vertebrados, já foram evidenciadas a presença de lectinas, na hemolinfa ou no fluido celomático, em quase todos os filos (SANTOS *et al.*, 2014). Diversas outras lectinas já foram isoladas de invertebrados, tais como: insetos (KOMANO; MIZUNO; NATORI, 1980), poríferos (CARNEIRO *et al.*, 2019), cnidários (IMAMICHI; YOKOYAMA, 2010), moluscos (SIVAKAMAVALLI *et al.*, 2021), crustáceo (DENIS *et al.*, 2016) e equinodermos (DUARTE, 2018). Nos vertebrados, já foram isoladas lectinas de peixes (DARA *et al.*, 2021), reptéis (DOS SANTOS NUNES *et al.*, 2011) e outros organismos. Na espécie humana em particular, existem muitas lectinas de diferentes tecidos que já foram isoladas e caracterizadas (SANTOS *et al.*, 2014), tais como da placenta humana (HIRABAYASHI; KASAI, 1984) ou do plasma sanguíneo (CLEMMENSEN; PETERSEN; KLUFT, 1986).

1.2.3 Lectinas de esponjas

No que se refere às lectinas de invertebrados, há menos informações sobre essas do que sobre lectinas de vertebrados. Entretanto, alguns filos podem possuir mais trabalhos científicos do que outros. Dentre as pesquisas publicadas, há um número notável e crescente de

trabalhados relacionados a lectinas de esponjas marinhas (CARNEIRO *et al.*, 2013a; DE MELO *et al.*, 2014).

Algumas lectinas de esponjas são consideradas glicoproteínas, já que podem possuir de 0,5% a 27,6% de quantidade de carboidratos em sua estrutura. Referente as características bioquímicas, inúmeras lectinas isoladas de esponjas marinhas possuem uma alta resistência térmica e as variações de pH do meio (GOMES FILHO *et al.*, 2015).

Ainda referente a classificação das lectinas, as do Tipo S podem ser encontradas nas esponjas *Geodia cydonium* e *Halichondria okadai* (GARDÈRES *et al.*, 2015). Foi evidenciado uma lectina do Tipo C, na esponja *Aphrocallites vastus*, (AvL), que apresentou na sua estrutura primária, semelhanças com algumas lectinas do Tipo C de metazoa, além de exibir locais para ligação de Ca²⁺, locais para ligação de ponte dissulfeto e um domínio N-terminal hidrofóbico (GUNDACKER *et al.*, 2001; GARDÈRES *et al.*, 2015). Com relação as Tachylectinas, duas lectinas semelhantes a esse grupo foram isoladas de *Suberites domuncula* e *Ephydatia fluviatilis*, denominadas de Sd lectin e Ef lectin (SCHRÖDER *et al.*, 2003; FUNAYAMA *et al.*, 2005; GARDÈRES *et al.*, 2015).

Dentre os estudos sobre os papéis fisiológicos das lectinas de esponjas, ficou constatado que estas podem desempenhar diversas funções, dentre elas: atuação na morfogênese, espiculogênese, defesa da esponja ou comunicação com organismos associados a esponja (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Ao longo das últimas décadas, foram publicados muitos trabalhos relacionados a detecção e caracterização de lectinas de esponjas. Por exemplo, a lectina isolada de *Chondrilla caribensis*, CCL, (MARQUES *et al.*, 2018), a lectina de *Aplysina fulva* (AFL) (CARNEIRO *et al.*, 2019) ou a lectina isolada de *Fasciospongia cavernosa*, FCL, (SADANANDAN; RAUF, 2018). Além dos estudos envolvendo a purificação e caracterização, muitas dessas lectinas apresentaram um enorme potencial biotecnológico. Por exemplo, o efeito citotóxico de HOL-18, lectina de *Halichondria okadai*, e de CvL, lectina de *Cliona varians*, contra linhagens celulares derivadas da leucemia. (MATSUMOTO *et al.*, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo principal purificar e caracterizar bioquimicamente uma nova lectina presente na esponja marinha *Pseudosuberites* sp.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta dos animais

Os espécimes da esponja marinha *Pseudosuberites* sp. foram coletados no Parque Estadual Ecológico Pedra da Risca do Meio no município de Fortaleza, Ceará. A coleta do material de estudo foi regulada e autorizada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-8). Após a coleta, as esponjas foram transportadas em recipientes térmicos até o laboratório e armazenadas a -20°C para uso posterior.

2.2 Preparo do extrato bruto

Os exemplares foram lavados, cortados em pequenos pedaços e embebidos em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e CaCl_2 20 mM (TBS/ Ca^{2+}) na proporção 1:2 (p/v). O material foi macerado com o auxílio de cadinho e pistilo até o material se tornar homogêneo. Posteriormente, a mistura foi filtrada em malha de nylon para retenção de partículas de tamanhos maiores e em seguida, centrifugada a $9.000 \times g$, por 30 minutos, a 4°C . O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi denominado extrato bruto e armazenado a -20°C para utilização posterior.

A preparação do material foi autorizada e regulada pelo órgão ambiental competente (SISGEN ID: A9D15EA).

2.3 Purificação da lectina

O extrato bruto foi submetido a uma precipitação com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)\text{SO}_4$) a uma saturação de 70%, por 4 horas, a 4°C . Em seguida, o material foi centrifugado a $9.000 \times g$, por 30 min. O sobrenadante foi então descartado, o precipitado foi solubilizado em tampão TBS/ Ca^{2+} , pH 7,6 e denominado Fração 0-70 (F0-70). Em seguida, a fração F(0-70) foi dialisada contra água destilada e submetida a uma cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (1,0 x 3,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e os eluatos foram monitorados por espectrofotometria a 280 nm e coletados em frações de 3 mL. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante (P2-DEAE) foram eluídas com a adição de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM. As frações de P2-DEAE, com valores superiores

a 0,1 na absorvância a 280 nm, foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas posteriormente.

2.4 Caracterização bioquímica

2.4.1 Atividade hemaglutinante

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados com eritrócitos humanos, do sistema A e O, obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Os testes de hemaglutinação foram realizados com suspensões de eritrócitos humanos, a uma concentração de 3% (v/v), em placas de microtitulação de fundo cônico (“V”), segundo metodologia padrão (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998). Para obtenção das suspensões de hemácias nativas e tratadas, os eritrócitos foram lavados 6 vezes em NaCl 150 mM, na proporção de 1:10 (v/v). Em seguida as hemácias foram suspensas e os volumes aferidos para atingir uma concentração de eritrócitos em NaCl a 3% (v/v).

Para obtenção das hemácias tratadas com enzimas proteolíticas, as suspensões a 3%, preparadas previamente, foram incubadas com tripsina, por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, as suspensões foram lavadas por 6 vezes e os eritrócitos foram suspensos novamente em NaCl 150 mM a uma concentração de 3% (v/v).

2.4.2 Inibição da atividade hemaglutinante

Tanto o extrato bruto quanto P2-DEAE (solubilizado em tampão TBS/Ca²⁺, pH 7,6) foram submetidos ao teste de inibição para determinar especificidade da lectina por carboidratos e glicoproteínas.

Os carboidratos e glicoproteínas utilizadas foram: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -D-lactose, β -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo e as glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina

de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), mucina submaxilar bovina (BSM), fetuína bovina e tiroglobulina.

2.4.3 Efeito da temperatura, pH e EDTA

A estabilidade térmica da lectina foi avaliada através de ensaio de atividade hemaglutinante com amostras solubilizadas em NaCl 150 mM (4,5 mg/mL), previamente aquecidas por 1 hora, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C. Em seguida, as mesmas foram submetidas a testes de hemaglutinação (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998).

A estabilidade da proteína, quanto a variações de pH, foi avaliada por meio de testes de hemaglutinação em diferentes tampões com pH distintos. A lectina (4,5 mg.mL⁻¹) foi incubada por 1 hora nos seguintes tampões: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5, fosfato de sódio 100 mM, pH 6, Tris 100 mM, pH 7 e pH 8, glicina 100 mM, pH 9 e pH 10, todos contendo NaCl 150 mM.

Também foi avaliado o efeito do íon de cálcio e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante da lectina. A proteína foi solubilizada em NaCl 150 mM na concentração (2 mg/mL) e foi submetida ao teste de hemaglutinação em tampão TBS/Ca²⁺ e em tampão Tris 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM.

2.4.4 Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE

O grau de pureza e a estimativa da massa molecular da lectina foram avaliados por eletroforese, em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e ausência de β-mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). O gel de 15% foi submetido a uma tensão de 150 V e corrente elétrica de 25 mA, durante 1 hora. A massa da proteína foi estimada por meio da comparação da migração da lectina com a migração da dos marcadores moleculares (66 kDa e 30 kDa).

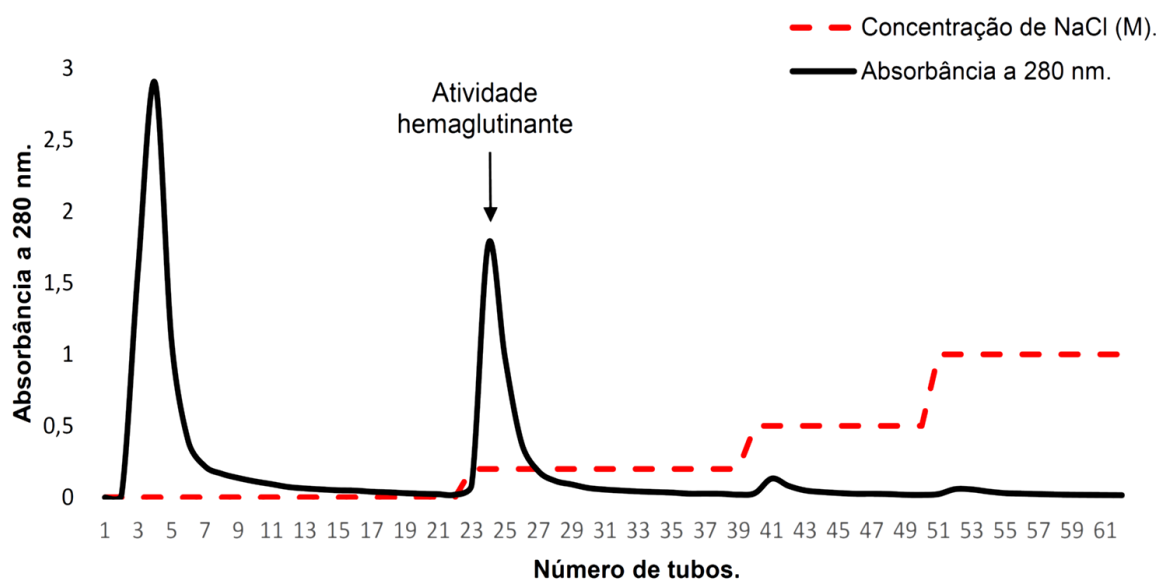
3. RESULTADOS

3.1 Purificação da lectina

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Pseudosuberites* sp., denominada PssL (*Pseudosuberites* sp. lectin), foi isolada por uma combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica.

Após a precipitação com sulfato de amônio, a fração F(0-70) foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (Figura 1) e as frações foram monitoradas por espectrofotometria a 280 nm. As frações eluídas com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM, foram as únicas que apresentaram atividade hemaglutinante.

Figura 1 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel da fração F(0-70).



Fonte: o Autor.

Foram aplicados 15 mL de F(0-70) em coluna DEAE-Sephacel (1,0cm x 3,0 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. Os eluatos que apresentaram atividade hemaglutinante foram eluídos com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM. O fluxo foi mantido constante e foram coletadas frações de 3 mL.

3.2 Caracterização bioquímica

3.2.1 Atividade hemaglutinante

O extrato bruto foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos do tipo A e O, tanto na forma

nativa quanto tratados com enzimas. A atividade hemaglutinante foi incrementada quando os eritrócitos foram tratados com tripsina (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante do extrato bruto da esponja marinha *Pseudosuberites* sp. contra eritrócitos humanos (U.H./mL)

Tipo de eritrócito	Nativo	Tratamento enzimático
		Tripsina
Humana A	16	32
Humano O	16	32
Coelho	N.H	N.T

Fonte: elaborado pelo autor.

N.H - Não apresentou aglutinação dos eritrócitos testados; N.T - A atividade hemaglutinante não foi testada para esse tipo de eritrócito.

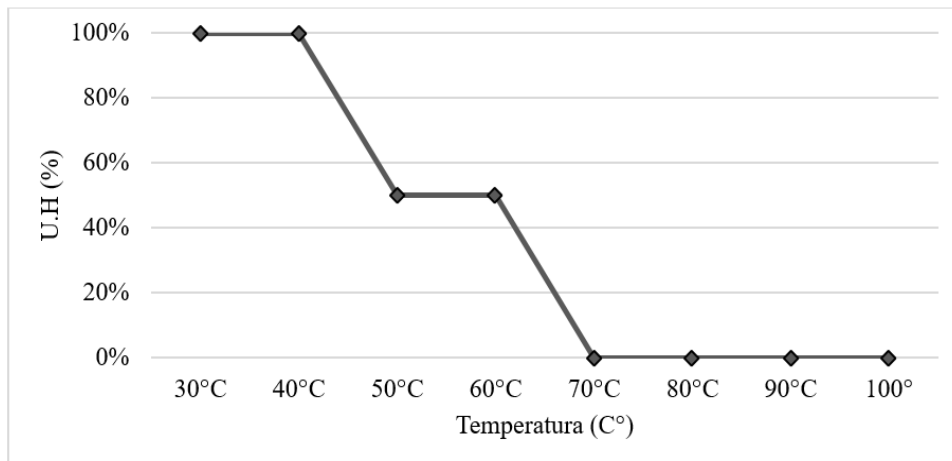
3.2.2 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante de PssL foi inibida por carboidratos e glicoproteínas. Os carboidratos L-(-)-fucose, D-melibiose, D-glicose, D-sacarose, D-xilose, *N*-acetylglucosamina (GlcNAC) e a glicoproteínas PSM II (porcine stomach mucin type II), PSM III (porcine stomach mucin type III), e BSM foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina (dados não mostrados).

3.2.3 Efeito da temperatura, pH e EDTA

No teste de termoestabilidade, a lectina manteve sua atividade quando aquecida por uma hora até 40°C, perdendo 50% da sua capacidade de hemaglutinação na temperatura de 50°C. Quando aquecida por 1 hora a 70°C, a lectina teve sua atividade completamente perdida (Figura 2).

Figura 2 - Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante.

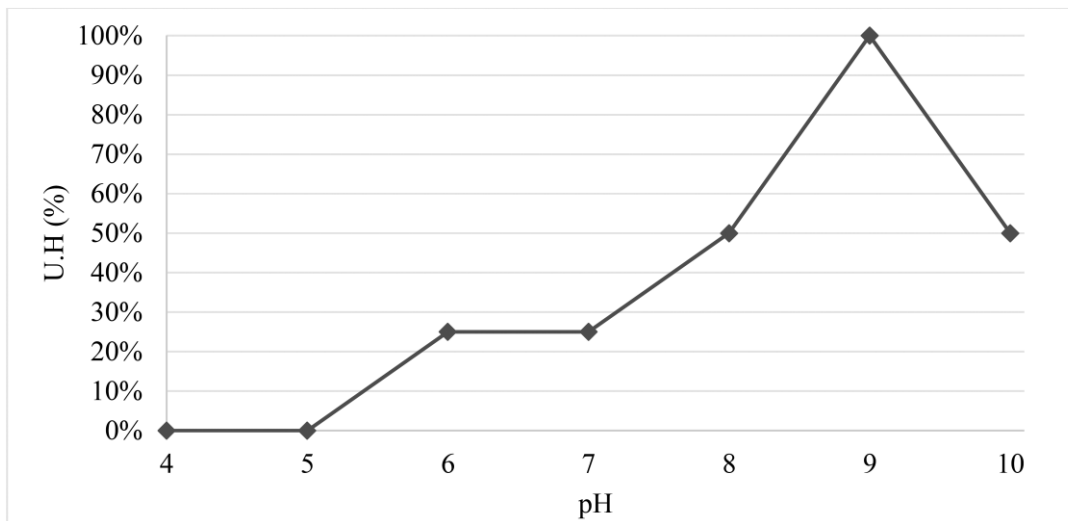


Fonte: o Autor.

Atividade hemaglutinante relativa em diferentes temperaturas. PssL foi aquecida em 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 100°C e posteriormente submetida a teste de atividade hemaglutinante.

O ótimo da atividade hemaglutinante de PssL foi observado em pH 9, perdendo 50% de sua capacidade em pH 8 e 10, enquanto que reduziu para 75% em pH 6 e 7. A atividade biológica da lectina foi totalmente abolida nos pH's 4 e 5 (Figura 3).

Figura 3 - Efeito do pH na atividade hemaglutinante.



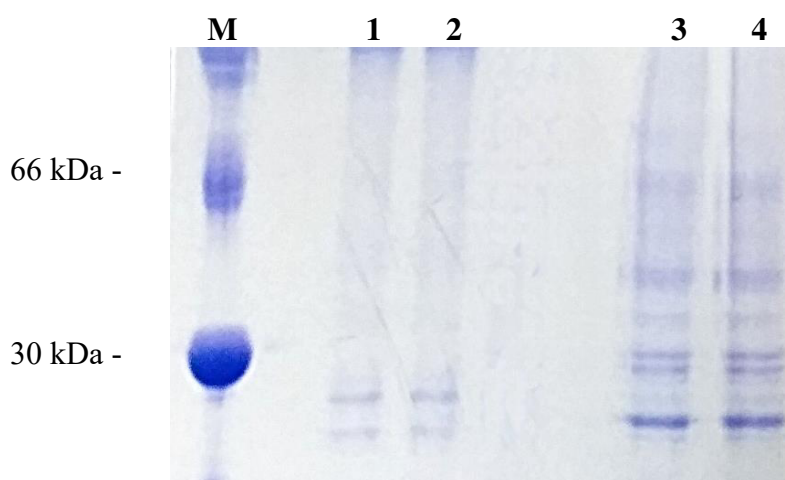
Fonte: o Autor.

A atividade hemaglutinante de PssL apresentou diferenças na presença e ausência de cátions de Ca^{2+} , não sendo capaz de aglutinar eritrócitos de sangue humano na presença de EDTA (dados não mostrados).

3.2.4 Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE

Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, PssL apresentou duas bandas principais com massa aproximada de 17 kDa e 23 kDa. Sob condições redutoras, PssL apresentou três bandas principais com massa aproximada de 17 kDa, 30 kDa e 33 kDa (Figura 3).

Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de PssL na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).



Fonte: o Autor.

(M) Marcador Molecular – 66 kDa e 30 kDa. (1 e 2) PssL na ausência de β -mercaptanol. (3 e 4) PssL na presença de β -mercaptanol.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, uma nova lectina da esponja marinha *Pseudosuberites* sp., denominada PssL, foi parcialmente purificada e isolada utilizando a combinação de precipitação com sulfato de amônio, seguido de cromatografia de troca iônica.

Cromatografias de troca iônicas são um dos principais métodos para purificação de proteínas. Porém, raramente proporcionam a obtenção da lectina purificada em uma única etapa (CHERN *et al.*, 2009). Entretanto, para PssL, GANL, lectina de *Aristichthys nobilis* (PAN; TANG; GU, 2010) e *Haliclona cratera lectin*, uma lectina de *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002), a combinação cromatografia de troca iônica e gel filtração foram essenciais para o processo de purificação dessas lectinas.

PssL aglutinou eritrócitos humanos do tipo A e O. Trabalhos evidenciaram que extratos proteicos da esponja marinha *Terpios zeteki*, pertencente à mesma família de *Pseudosuberites* sp., também se mostrou capaz de aglutinar eritrócitos humanos (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985).

Assim H-3, de *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013b), e SFL, de *Stylissa flexibilis* (LY *et al.*, 2018), PssL foi capaz de aglutinar apenas eritrócitos humanos, não sendo capaz de aglutinar eritrócitos de coelho nativos ou tratados. A atividade hemaglutinante de PssL contra eritrócitos humanos foi incrementada quando os mesmos foram tratados com tripsina. A utilização de enzimas proteolíticas para o tratamento de eritrócitos animais é um processo padronizado que visa a exposição de resíduos de carboidratos e, conseqüentemente, facilita o reconhecimento da lectina com o carboidrato presente na célula (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998). Assim como H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013b), PssL possui maior capacidade de aglutinação frente a eritrócitos tratados com tripsina.

A atividade hemaglutinante de PssL, foi inibida por carboidratos e glicoproteínas. De forma semelhante, a lectina de *Haliclona cratera* (*Haliclona cratera lectin*) também teve sua atividade hemaglutinante inibida por carboidratos semelhantes, tais como: *N*-acetylglucosamine, xilose, glicose, fucose e sacarose. Similarmente a CCL, de *Chondrilla caribensis* (MARQUES *et al.*, 2018), a atividade lectínica de PssL foi inibida por mucina de estômago de porco 2 e 3 (PSM-II e PSM-III). A inibição da atividade hemaglutinante por D-glicose, L-(-)-fucose e D-xilose, sugere que o grupo hidroxila da posição C-4 destes carboidratos sejam reconhecidos por esta lectina.

A atividade hemaglutinante de PssL foi ótima em pH 9, havendo redução da atividade lectínica abaixo ou acima do pH 9. Comportamento semelhante foi observado por

Marques *et al.* (2018) com CCL, que também exibiu atividade ótima em pH 9, ocorrendo variações na atividade hemaglutinante abaixo ou acima desse pH. O mesmo ocorre com H-1, a lectina isolada da esponja *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013a), que mostrou máxima atividade em pH 9. Algumas lectinas tendem a apresentar uma melhor atividade em pH alcalino, tais como ACL-I, de *Axinella corrugata*, e HMA, de *Haliclona manglaris*, (DRESCH *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2015). Essa estabilidade em pH alcalino é também observada em muitas lectinas isoladas de esponjas marinhas e pode estar relacionada com o habitat marinho em que estas se encontram, ou seja, um pH levemente alcalino por causa do efeito tamponante causado pelo sistema carbonato-bicarbonato (DE MELO *et al.*, 2014).

No teste de termoestabilidade, PssL apresentou atividade hemaglutinante estável em temperaturas de até 40°C, sendo sua atividade totalmente abolida a 70°C. Resultados semelhantes foram observados com a lectina H-3, apresentando atividade hemaglutinante quando aquecida até 60°C e tendo sua atividade totalmente perdida quando aquecida a 70°C por 1 hora (CARNEIRO *et al.*, 2013b). PssL também apresentou similaridades com a H-1, apresentando diminuição na sua atividade hemaglutinante quando aquecida em temperatura próxima a 70°C (CARNEIRO *et al.*, 2013a).

Contudo, PssL se diferenciou de outras lectinas de esponjas marinhas que apresentaram uma termoestabilidade até temperaturas mais elevadas, tais como CCL que teve sua atividade lectínica perdida apenas quando aquecida em temperatura acima de 90°C por 1 hora (MARQUES *et al.*, 2018).

Ao avaliar o efeito da presença e ausência de íons divalentes na atividade hemaglutinante, ficou evidenciado que a lectina foi afetada pela presença ou ausência de íons de Ca^{2+} , tornando PssL uma lectina cálcio dependente. Essa característica também observada em CvL, de *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006) assim como com a lectina de *Aphrocallistes vastus*, que se mostraram dependente de íons de cálcio e tiveram suas atividades afetadas na presença de EDTA. (GUNDACKER *et al.*, 2001; LY *et al.*, 2018).

Em SDS-PAGE, PssL apresentou duas bandas principais de 17 kDa e 23 kDa sob condições não redutoras e três bandas principais com massa aproximada de 17 kDa, 30 kDa e 33 kDa sob condições redutoras. Essa diferença nos valores da massa molecular em condições redutoras e não redutoras pode indicar a presença de pontes dissulfeto na proteína. O aumento na massa molecular sob condições redutoras, pode indicar a presença de pontes dissulfeto intracadeia, onde a lectina pode estar compactada. Porém, na presença de β -mercaptoetanol, as pontes dissulfeto são quebradas e a lectina se expande, dificultando sua migração no gel. (SOUSA, 2018).

Estudos posteriores deverão ser realizados para aprofundar a informações estruturais e aplicações biológicas de PssL, visto que as lectinas isoladas de esponjas marinhas têm sido evidenciadas como potenciais moléculas com aplicações biotecnológicas.

5 CONCLUSÃO

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Pseudosuberites* sp. (PssL) foi parcialmente purificada através da combinação de precipitação proteica com sulfato de amônio somado a cromatografia de troca iônica. A lectina possui especificidade por eritrócitos humanos tratados com tripsina, mostrou uma atividade mais estável em pH alcalino e apresentou uma termoestabilidade moderada. PssL mostrou ser uma lectina dependente de cálcio, não sendo capaz de aglutinar eritrócitos na presença de EDTA. Em SDS-PAGE apresentou duas bandas, de aproximadamente 17 kDa e 23 kDa, sob condições não redutoras e três bandas, de aproximadamente 17 kDa, 30 kDa e 33 kDa, em condições redutoras.

REFERÊNCIAS

- AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 50, n. 4, p. 613, 1963.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 2, p. 396, 1965.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 1, p. 51-58, 2013a.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013b.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1368-1375, 2015.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 662, p. 169-176, 2019.
- CHERN, M.K. *et al.* Single-step protein purification by back flush in ion exchange chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 392, n. 2, p. 174-176, 2009.
- CLEMMENSEN, I.; PETERSEN, L. C.; KLUFT, C. Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 2, p. 327-333, 1986.
- DARA, M. *et al.* F-type lectin from serum of the Antarctic teleost fish *Trematomus bernacchii* (Boulenger, 1902): Purification, structural characterization, and bacterial agglutinating activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, p. 110633, 2021.
- DE MELO, A. A. *et al.* HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 435-442, 2014.
- DENIS, M. *et al.* Lectin in innate immunity of Crustacea. **Austin Biol**, v.1, n. 1, p. 1001,

2016.

DOS SANTOS NUNES, E., *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.

DRESCH, R. R. *et al.* Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 4, p. 365-370, 2012.

DUARTE, P. L. **Purificação e caracterização bioquímica de uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana**. 2018. 36 f. TCC (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. (Orgs.). **Zoologia dos Invertebrados**. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

FUNAYAMA, N.; NAKATSUKASA, M.; KURAKU, S.; TAKECHI, K.; DOHI, M.; IWABE, N.; MIYATA, T.; AGATA, K. Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. **Zoological science**, v. 22, n. 10, p. 1113-1122, 2005.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.

GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS letters**, v. 117, n. 1-2, p. 13-16, 1980.

GERCKEN, J.; RENWRANTZ, L. A new mannan-binding lectin from the serum of the eel (*Anguilla anguilla* L.): isolation, characterization and comparison with the fucose-specific serum lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 108, n. 4, p. 449-461, 1994.

GOLDSTEIN, I. J. What should be called a lectin?. **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOMES FILHO, S. M. *et al.* Marine sponge lectins: Actual status on properties and biological activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 348-357, 2015.

GUNDAKER, D. *et al.* Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2001.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L. **Princípios integrados de zoologia**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2016.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. Human placenta β -galactoside-binding lectin. Purification and some properties. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 122, n. 3, p. 938-944, 1984.

IMAMICHI, Y.; YOKOYAMA, Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lectin from the jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, n. 1, p. 12-18, 2010.

KILPATRICK, D. C. **Handbook of animal lectins**, properties and biomedical applications. Eddinburg: British library, 2000. 468p.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.

KOMANO, H.; MIZUNO, D.; NATORI, S. Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 7, p. 2919-2924, 1980.

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

LY, B. M. *et al.* Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, p. 32-38, 2018.

LIU, H. *et al.* Pathogen of *Vibrio harveyi* infection and C-type lectin proteins in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 119, p. 554-562, 2021.

MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301, 2018.

MATSUMOTO, R. *et al.* Cytotoxicity and glycan-binding properties of an 18 kDa lectin isolated from the marine sponge *Halichondria okadai*. **Toxins**, v. 4, n. 5, p. 323-338, 2012.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H. F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 955-962, 1985.

MEDEIROS, D. S. *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

NASCIMENTO, E. F. D. **Taxonomia das esponjas marinhas do Nordeste brasileiro: Expedição Canopus (1965-1966)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

PAN, S.; TANG, J.; GU, X. Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 154-164, 2010.

PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados, 7ed.** Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2016.

PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 2, p. 213-221, 2002.

QUEIROZ, A. F.S *et al.* Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1023-1033, 2009.

SADANANDAN, R.; RAUF, A. A. Isolation, Purification and Characterisation of a D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine Specific Lectin from Marine Sponge *Fasciospongia cavernosa*. **Protein and peptide letters**, v. 25, n. 9, p. 871-877, 2018.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. L. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, v. 14, p.489–495, 2002.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. 2014.

SCHRÖDER, H.C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N.L.; DIEHLSEIFERT, B.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.32810–32817, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N. Lectins: past, present and future¹. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457-1460, 2008.

SIPKEMA, D. *et al.* Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. **Journal of biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 127-139, 2003.

SIVAKAMAVALLI, J. *et al.* Purification and partial characterization of carbohydrate-recognition protein C-type lectin from *Hemifusus pugilinus*. **Carbohydrate Research**, v. 499,

p. 108224, 2021.

SOUSA, A. R. D. O. **Purificação e caracterização bioquímica de uma nova lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* Rützler, Duran & Piantoni, 2007.** 2018. 45 f. TCC (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

TSANEVA, M; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of plant lectin research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533-551, 2020.

VAN SOEST, R.W.M. *et al.* **Banco de Dados Mundial Porifera.** Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2022.

WU, N. L.; LIU, F. T. The expression and function of galectins in skin physiology and pathology. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 217-226, 2018.