



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILMES BACTERIANOS DE UMA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA
MARINHA *Aptos* sp.

FORTALEZA

2017

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILMES BACTERIANOS DE UMA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA MARINHA
Aaptos sp.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

FORTALEZA

2017

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)

A444p Almeida, Alexandra Sampaio de.
Purificação, caracterização bioquímica e efeito na inibição de biofilmes bacterianos de uma lectina isolada da esponja marinha *Aaptos* sp. / Alexandra Sampaio de Almeida. – 2017.
62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Esponjas marinhas. 2. Lectina. 3. Biofilme. I. Título.

CDD 639.2

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILMES BACTERIANOS DE UMA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA MARINHA
Aaptos sp.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Engenharia de Pesca da
Universidade Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de mestre
em Engenharia de Pesca. Área de
Concentração: Biotecnologia e Genética de
Organismos Aquáticos.

Aprovada em: 20 / 04 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por renovar todos os dias as minhas forças.

A minha mãe Nelda, por todo amor, paciência e por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava.

A minha irmã Ester, por sempre me apoiar e ficar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu pai Alexandre e meu irmão Gabriel, pelo carinho e compreensão e por permanecerem ao meu lado.

Ao meu namorado Pedro Nogueira (bêbê), por seu amor, apoio, cuidado e principalmente pela paciência que teve comigo durante o mestrado. Sou muito grata por ter você em minha vida.

Ao meu Orientador Alexandre Sampaio, pela oportunidade e principalmente pela disposição em me orientar em mais um trabalho. Sempre serei grata por ter me aceitado como orientanda desde os tempos de graduação.

Ao professor Celso Nagano, pelos ensinamentos, incentivo e principalmente por todas as vezes que me ajudou no decorrer do mestrado, sei que eu perturbava muito mas o senhor sempre estava disposto a me ajudar.

Ao meu chefe Rômulo Farias que desde da graduação me aguenta. Obrigada chefe por todas as vezes que você me ajudou, me ensinou, me incetivou, serei eternamente grata tudo que você fez por mim nesses anos.

Ao Mayron Vasconcelos, por aceitar participar da banca e por ter me ajudado bastante na reta final do mestrado.

As minhas amigas lindas Dayara e Karolina, muito obrigada por tornar meus dias melhores, vocês foram um presente que o mestrado trouxe para minha vida, ao lado de vocês essa caminhada ficou mais fácil e divertida. E que a nossa amizade continue pelo resto da vida.

Aos meu amigos de bancada André, David, Lucas, Renato, Túlio, Winnie, Hilde por toda ajuda, companhia e por tornar meus dias de trabalho mais divertido.

Ao pessoal do LIBS, Alexandre, Anna, Alisson e Rafael, por me ajudarem nos últimos experimentos dessa dissertação e principalmente pela paciência em me ensinar.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

Pertencentes ao filo porifera (do latim *porus*, poro, + *fera*, portador de), as esponjas são os animais multicelulares mais primitivos do planeta. São sésseis, bentônicas, sendo predominantemente marinhas. Nas últimas décadas, as esponjas têm se revelado como uma abundante e promissora fonte de compostos bioativos, como por exemplo as lectinas. As lectinas podem ser definidas como proteínas/glicoproteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados e substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície celular, não alterando a estrutura covalente das ligações glicosídicas, de forma reversível e não covalente. Dessa forma, objetivo do presente trabalho foi purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o efeito na inibição de biofilmes bacterianos de uma lectina isolada da esponja marinha *Aaptos* sp. A nova lectina (AL – *Aaptos Lectin*) foi isolada a partir da combinação das cromatografias de afinidade em matriz goma de Guar seguida por cromatografia de exclusão molecular em sistema UPLC. AL foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho nativos e tratados enzimaticamente, sendo inibida por galactosídeos. A proteína é estável em pH neutro a alcalino e perde a atividade a partir de 40°C. A massa molecular determinada por espectrometria de massas foi de 13.655 +/- 2 Da. Análises de dicroísmo circular sugerem que a lectina é constituída de 28% de α -hélice, 26% de folha- β , e de 46% de região randômica. AL não foi tóxica contra náuplios de artemia e não foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes bacterianos, mas foi capaz de reduzir o número de células viáveis da bactéria *E. coli*. Estudos posteriores serão necessários para elucidação da estrutura da lectina e para se descobrir possíveis aplicações biotecnológicas da nova proteína.

Palavras-chave: Esponjas marinhas. Lectina. Biofilme.

ABSTRACT

Belonging to the porifera phylum (from Latin porus, pore, + beast, bearer of), sponges are the most primitive multicellular animals on the planet. They are sessile, benthic, being predominantly marine. In recent decades, sponges have proved to be an abundant and promising source of bioactive compounds, such as lectins. Lectins can be defined as proteins/glycoproteins of nonimmune origin that bind and/or precipitate carbohydrates and glycoconjugates and substances containing them, free in solution or on the cell surface, without changing the covalent structure of the glycosidic bonds, reversibly and not covalent. Thus, the objective of the present work was to purify, characterize biochemically and test possible biological activities of a lectin present in the marine sponge *Aaptos* sp. The novel lectin (AL - Aaptos Lectin) was isolated from the combination of affinity chromatography on Guar gum matrix followed by molecular exclusion chromatography on UPLC system. AL was able to agglutinate native and enzymatically treated rabbit erythrocytes and was inhibited by galactosides. The new protein is stable at neutral to alkaline pH, is thermolabile by totally losing its activity at 40 ° C, and its molecular mass determined by spectrometry was 13.655 ± 2 Da. According to circular dichroism the lectin consists of 28% α -helix, 26% β -sheet, and 46% random region. AL was nontoxic against artemia nauplii and was not able to inhibit bacterial biofilm formation but was able to reduce the number of viable *E. coli* bacteria cells. Further studies will be needed to elucidate the structure of the lectin and to discover possible biotechnological applications of the new protein.

Keywords: Marine sponges. Lectin. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais estruturas do sistema aquífero em uma esponja hipotética.....	15
Figura 2 -	Exemplos das classes de esponjas.....	16
Figura 3 -	<i>Aaptos</i> sp.....	17
Figura 4 -	Cromatografia de afinidade em goma de Guar.....	37
Figura 5 -	Cromatografia de exclusão molecular.....	38
Figura 6 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS (SDS-PAGE).....	42
Figura 7 -	Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular.....	43
Figura 8 -	Efeito do pH na atividade hemaglutinante da AL.....	44
Figura 9 -	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da AL.....	45
Figura 10-	Determinação da massa molecular da AL por MS.....	47
Figura 11-	Dicroísmo circular da AL.....	48
Figura 12-	Dicroísmo circular da AL.....	49
Figura 13-	Formação do biofilme bacteriano na presença de AL em diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	51
Figura 14-	Efeito da lectina em diferentes concentrações no número de células viáveis expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL^{-1}).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação das lectinas de animais em famílias de acordo com suas características.....	23
Tabela 2-	Tabela de purificação da lectina presente na esponja marinha <i>Aaptos</i> sp.....	39
Tabela 3-	Atividade hemaglutinante da lectina presente na esponja marinha <i>Aaptos</i> sp.....	40
Tabela 4-	Inibição da atividade hemaglutinante da AL por açúcares e glicoproteínas	41
Tabela 5-	Peptídeos sequenciados da AL.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Esponjas.....	15
1.2	Taxonomia.....	16
1.3	Compostos bioativos obtidos de esponjas.....	17
1.3.1	<i>Compostos bioativos do gênero Aaptos.....</i>	18
1.4	Lectinas.....	19
1.4.1	<i>Histórico.....</i>	19
1.4.2	<i>Definição e importância.....</i>	20
1.4.3	<i>Lectinas de animais.....</i>	21
1.4.3.1	<i>Famílias de lectinas de animais.....</i>	21
1.4.3.2	<i>Lectinas de invertebrados.....</i>	25
1.4.3.3	<i>Lectinas de esponjas.....</i>	26
1.4.3.4	<i>Lectinas do gênero Aaptos.....</i>	27
2	METODOLOGIA.....	29
2.1	Coleta da esponja.....	29
2.2	Purificação da lectina.....	29
2.3	Preparação dos eritrócitos e atividade hemaglutinante.....	30
2.4	Inibição da atividade hemaglutinante.....	30
2.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular.....	31
2.6	Caracterização físico química.....	31
2.6.1	<i>Efeito do pH na atividade hemaglutinante.....</i>	31
2.6.2	<i>Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante.....</i>	32
2.6.3	<i>Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante.....</i>	32
2.6.4	<i>Teor de carboidratos.....</i>	32
2.7	Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas.....	32
2.8	Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS).....	33

2.9	Dicroísmo circular.....	34
2.10	Ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.	34
2.11	Inibição da formação de biofilmes bacterianos.....	35
2.11.1	<i>Micro-organismos utilizados</i>	35
2.11.2	<i>Condições de cultivo</i>	35
2.11.3	<i>Atividade da lectina sobre o crescimento planctônico</i>	35
2.11.4	<i>Ação da lectina sobre a formação de biofilmes</i>	35
2.11.5	<i>Quantificação da biomassa</i>	36
2.11.6	<i>Enumeração da células viáveis</i>	36
2.11.7	<i>Análise estatística</i>	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1	Purificação da lectina	37
3.2	Sumário de purificação	39
3.3	Atividade hemaglutinante	39
3.4	Inibição da atividade hemaglutinante	40
3.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular	41
3.6	Caracterização físico química	43
3.6.1	<i>Efeito do pH na atividade hemaglutinante</i>	43
3.6.2	<i>Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante</i>	44
3.6.3	<i>Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante</i>	45
3.6.4	<i>Teor de carboidratos</i>	46
3.7	Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas	46
3.8	Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)	47
3.9	Dicroísmo circular	48
3.10	Ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.	49
3.11	Inibição da formação de biofilmes bacterianos	50

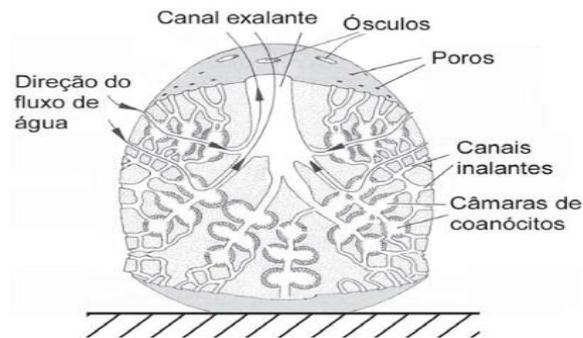
4	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

As esponjas são os animais multicelulares mais primitivos do planeta e pertencem ao filo porífera (do latim *porus*, poro, + *fera*, portador de). São sésseis, bentônicas, sendo predominantemente marinhas. As esponjas são filtradoras, dessa forma utilizam células flageladas chamadas de coanócitos para gerar uma corrente unidirecional de água através de um sistema de canais exclusivo do filo, o sistema aquífero. É por meio do sistema aquífero que são feitas as trocas entre esponja e ambiente (nutrição, respiração, excreção, reprodução), o sistema aquífero é um conjunto tridimensional de canais ramificados que levam água para todo o corpo da esponja (Figura 1) (HICKMAN *et al.*, 2004; MURICY *et al.*, 2007).

Figura 1 – Principais estruturas do sistema aquífero em uma esponja hipotética.



Fonte: Atlas de Invertebrados Marinhos da Região Central da Zona Econômica Exclusiva Brasileira – Parte 1.

As esponjas possuem organização em nível celular, sem a formação de tecidos complexos ou órgãos. Mas as células das esponjas agem de forma coordenada para realizar funções complexas como a reprodução e a geração do fluxo de água pelos coanócitos. A forma do sistema aquífero está em constantemente reorganização, o que se traduz em uma grande plasticidade morfológica das esponjas em diferentes ambientes. (MURICY *et al.*, 2007).

Os poríferos são abundantes em todos os oceanos, onde colonizam rochas, conchas, esqueletos mortos de corais e outros substratos consolidados. Nos canais do sistema aquífero das esponjas pode se encontrar uma rica fauna associada, que inclui crustáceos, poliquetos, moluscos, equinodermos e muitos outros animais. Muitas esponjas abrigam também bactérias simbiotes. Algumas espécies de esponjas podem até mesmo contribuir para a produção primária em recifes de coral, através de simbiose com cianobactérias ou zooxantelas (MURICY *et al.*, 2007; WILKINSON, 1987).

1.2 Taxonomia

O filo porífera pode ser dividido em três classes segundo Hooper *et al* 2002: Hexactinellida (organização corpórea sincicial, esponjas de vidro), Demospongiae (as espículas possuem simetria monaxônica ou tetraxônica) e Calcarea (as espículas têm simetria monaxônica, triaxônica ou tetraxônica) (Figura 2).

Figura 2 – Exemplos das classes de esponjas.



Hexactinellida

Demospongiae

Calcarea

Fonte: <https://www.emaze.com/@ATLIWWT/zoology-Project>;
<http://www.seawater.no/fauna/porifera/Demospongiae.html>;
<http://meioambiente.culturamix.com/ecologia/esponjas-calcarias-e-demosponjas>

A classe Demospongiae é a maior, abrangendo cerca de 95% das espécies de esponjas. De forma geral, as esponjas pertencentes a esta classe possuem espículas de sílica ou espongina, mas algumas espécies são desprovidas de esqueleto. As espículas possuem simetria monaxônica ou tetraxônica (com um ou quatro eixos, respectivamente) e as espécies desta classe costumam apresentar cores diversas e vistosas. Na classe Demospongiae encontram-se as esponjas de banho (*Spongia* e *Hippospongia*) que são comercialmente importantes (HICKMAN *et al.*, 2004; MURICY *et al.*, 2007).

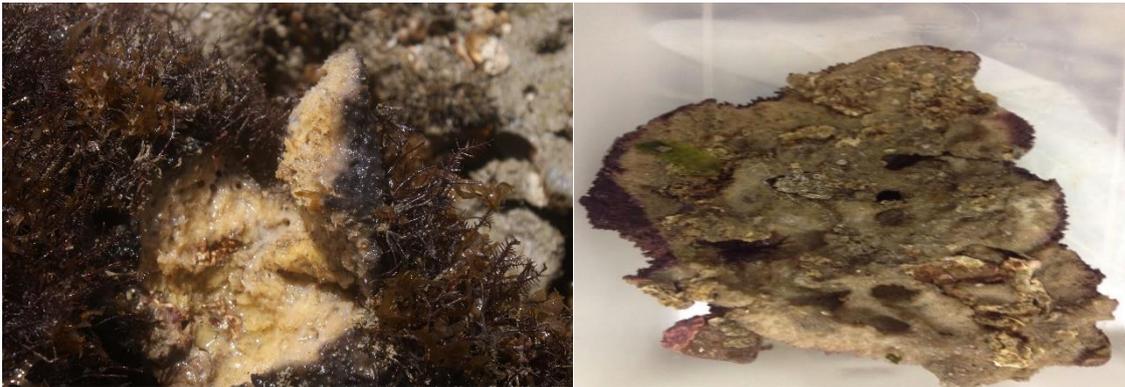
A família Suberitidae é caracterizada por apresentar espécies de esponjas de interesse na área da farmacologia. Apesar da sua importância é uma das famílias menos estudadas, provavelmente devido à dificuldade de identificação taxonômica (COBO, 2015).

Esponjas marinhas do gênero *Aaptos* constituem a única fonte natural de alcalóides do tipo 1H-benzo-[de][1,6]-nafti-ridínicos, também denominados de aaptaminas, apresentando assim um grande interesse farmacológico (GRANATO *et al.*, 2010).

A espécie utilizada no presente trabalho, *Aaptos* sp. (Figura 3), foi encontrada no litoral oeste do Ceará e ao que tudo indica é endêmica do Brasil e possivelmente uma nova

espécie do gênero *Aaptos*, sendo assim necessários mais estudos taxonômicos para confirmar esta hipótese. A esponja de estudo apresenta coloração escura por fora e mais clara por dentro, tem textura macia, mas possui bastantes espículas.

Figura 3 – *Aaptos* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

1.3 Compostos bioativos obtidos de esponjas

Nas últimas décadas, as esponjas têm se revelado como uma abundante e promissora fonte de compostos bioativos, sendo importante destacar que estes animais foram os primeiros invertebrados marinhos a fornecer substâncias de interesse médico-farmacológico (HAJDU *et al.*, 2004).

A descoberta de compostos bioativos obtidos a partir de esponjas é bastante relevante, pois estes animais têm potencial para fornecer futuros medicamentos contra doenças importantes, como câncer, uma série de doenças virais, malária e inflamações (SIPKEMA *et al.*, 2005).

A utilização de esponjas com finalidades médicas é relatada desde muitos séculos, onde os médicos as utilizavam para estimular a coagulação sanguínea. No século XVIII médicos russos, ucranianos e poloneses passaram a utilizar uma esponja de água doce para tratar doenças pulmonares e reumatismo (SCHRODER, 1942). Além disso, as esponjas eram utilizadas também contra todos os tipos de ferimentos, fraturas ósseas, hidropisia, dores de estômago e doenças infecciosas (HOFRICHTER; SIDRI, 2001).

O interesse farmacêutico nas esponjas foi despertado no início da década de 50, devido à descoberta de dois nucleosídeos (*spongothymidine* e *spongouridine*) oriundos da esponja marinha *Cryptotethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1950). Estes nucleosídeos

foram a base para a síntese da Ara-C, o primeiro agente anti-câncer derivado de um composto marinho, e a droga antiviral Ara-A (PROKSCH *et al.*, 2002). Atualmente o Ara-C é utilizado no tratamento de pacientes com leucemia e linfoma, e um de seus derivados fluorado também têm sido utilizado em pacientes com câncer de pâncreas, mama, bexiga e de pulmão (SCHWARTSMANN, 2000). Ara-A é utilizada para combater doenças virais como por exemplo o herpes, sendo licenciada como o primeiro nucleosídeo antiviral para o tratamento de infecção sistêmica por vírus do herpes e uma das três drogas derivadas do ambiente marinho aprovada pela Food and Drug Administration - FDA (EUA) (SANG VO *et al.*, 2011).

Compostos bioativos obtidos a partir de esponjas podem apresentar atividade anti-inflamatória, antitumoral, imunossupressora, antiviral, antimalárica, antibiótica (SIPKEMA *et al.*, 2005).

Podemos observar que a utilização de esponjas não é recente e mesmo após tantos anos ainda se têm muito a explorar e uma infinidade de novas substâncias para serem descobertas e utilizadas nos mais distintos fins.

Nesse contexto surge o interesse nas lectinas, que são moléculas bioativas que podem desempenhar uma série de atividades biológicas, sendo assim de grande relevância e, especificamente, as esponjas são uma rica e pouca explorada fontes de lectinas.

1.3.1 Compostos bioativos do gênero Aaptos

As esponjas do gênero *Aaptos* constituem uma fonte natural de alcalóides do tipo 1H-benzo-[de][1,6]-nafti-ridínicos, também denominados de aaptaminas. Os mesmos pesquisadores que descobriram as aaptaminas isolaram dois outros derivados, a desmetilaaptamina 2 e a desmetiloxiaaptamina 3, a partir da mesma esponja *Aaptos aaptos* (GRANATO *et al.*, 2010).

Os alcalóides heteroaromáticos isolados da esponja *A. aaptos* apresentam atividades biológicas como bloqueadores de receptores α -adrenérgicos, ação citotóxica e atividade antimicrobiana (GRANATO *et al.*, 2010). Dessa forma, podemos sugerir que as esponjas pertencentes a este gênero podem ser fontes de compostos bioativos.

1.4 Lectinas

1.4.1 Histórico

A existência de proteínas com habilidade de aglutinar eritrócitos é conhecida desde o final do século XIX, tais proteínas foram denominadas de hemaglutininas ou fitohemaglutinas, pois geralmente eram encontradas em extratos de plantas (SHARON; LIS, 2004). No entanto, o primeiro relato de hemaglutinação no mundo teria ocorrido por volta de 1860, onde o veneno da serpente *Croatalus durissus* apresentou atividade hemaglutinante. Um dos fatos que marcou os estudos de lectinas foi a descoberta da ricina em 1888 por Peter Hermann Stillmark em seu doutorado, a ricina é altamente tóxica e foi isolada a partir de sementes de *Ricinus communis*, depois foi descoberto que a ricina se tratava de uma proteína contendo duas cadeias, uma parte tóxica e uma parte não tóxica que era responsável pela aglutinação (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, James B. Sumner obteve a primeira hemaglutinina pura, a partir, de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), e foi denominada de Concanavalina A (SUMNER, 1919). Quase vinte anos depois Sumner em parceria com Howell (1936), relataram que a Concanavalina A, além de aglutinar células como eritrócitos e leveduras, também possui habilidade de precipitar glicogênio em solução, sendo inibida por sacarose demonstrando assim pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcar (SHARON; LIS, 2004).

Na década de 40, Boyd e Renkonen de forma independente constataram a especificidade de diferentes hemaglutininas de sementes por determinado tipo sanguíneo humano (sistema ABO) (SHARON; LIS, 2004). A especificidade das hemaglutininas por tipo sanguíneo teve um papel fundamental nos estudos iniciais sobre a base estrutural dos antígenos associados ao sistema ABO (SHARON; LIS, 2004). A habilidade de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos realizada pelas aglutininas levou Boyd e Shapleigh, em 1954, a propor o termo lectina (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) para denominar tais proteínas (BOYD; SHAPLEIGH, 1972). Anos mais tarde o termo lectina foi utilizado para designar todas as aglutininas específicas a açúcar, de origem não imune, independente da sua origem (SHARON; LIS, 1972).

Duas descobertas deixaram as lectinas em evidência no meio científico, a primeira foi realizada por Peter C. Nowell (1960) onde descobriu que a lectina do feijão vermelho *Phaseolus vulgaris*, a PHA, estimulava os linfócitos a entrarem em mitose, tal descoberta teve um grande impacto na imunologia, pois contrariou a ideia de que os linfócitos eram células

incapazes de se dividir ou de se diferenciar (NOWELL, 1960). A segunda importante descoberta foi realizada por Joseph C. Aub que mostrou que a aglutinina do gérmen de trigo (*wheat germ agglutinin* – WGA) tinha a capacidade de aglutinar células preferencialmente malignas (AUB *et al.*, 1965), estudo onde mostrou que lectinas são capazes de reconhecer células malignas podendo ser utilizadas como ferramentas no estudo do câncer.

No início dos anos 70, já havia sido relatada a presença de aglutininas em vários organismos, principalmente em plantas. Em animais poucas lectinas haviam sido purificadas e caracterizadas como as isoladas da enguia (SPRINGER; DESAI, 1971), do caracol (HAMMARSTROM; KABAT, 1969) e do caranguejo ferradura (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968). A primeira lectina animal isolada foi da enguia européia *Anguilla anguilla* (WATKINS; MORGAN, 1952) que demonstrou ser específica a L-fucose. Em 1975, foi relatado o isolamento de uma aglutinina presente na enguia elétrica *Electrophorus electricus* (TEICHBERG *et al.*, 1975), sendo esta lectina o primeiro membro da família específica a β -galactosídeos, denominadas de galectinas (BARONDES *et al.*, 1994).

1.4.2 Definição e importância

No ano de 1995, foi proposta por Peumans e Van Damme uma definição bem aceita e utilizada até hoje, considerando as lectinas como “proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com pelo menos um sítio não catalítico de ligação que reconhecem e interagem de forma reversível com carboidratos específicos” (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Contudo esta definição se encaixa mais adequadamente quando se trata de lectinas de plantas, pois como veremos adiante nos animais as lectinas podem ter função imune.

Dessa forma, há outras definições que se adequam melhor para definir de modo geral as lectinas, como: lectinas podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados e substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície celular, não alterando a estrutura covalente das ligações glicosídicas, de forma reversível e não covalente (SAMPAIO *et al.*, 1998). A interação das lectinas com carboidratos pode ser tão específica quanto à interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima (MINKO, 2004).

Essas proteínas são capazes de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, superfícies celulares e fluídos fisiológicos e por sua capacidade de decifrar o glicocódigo, as lectinas podem ser utilizadas numa variedade de estudos biotecnológicos incluindo pesquisa sobre o câncer e imunologia (SHARON; LIS, 2004).

Até o presente momento importantes atividades biológicas desempenhadas por lectinas já foram relatadas na literatura, como por exemplo anti-HIV (MORI *et al.*, 2005), antidepressiva (BARAUNA *et al.*, 2006), atividade tóxica sobre células malignas (PAJIC *et al.*, 2002), efeito pró-inflamatório (QUEIROZ *et al.*, 2008), indução da morte celular de células cancerígenas (SUGAHARA *et al.*, 2001; RABELO *et al.*, 2012), inibição da formação do biofilme (TEIXEIRA *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2017).

1.4.3 Lectinas de animais

No ano de 2000 David Kilpatrick, propôs uma definição bastante aceita e amplamente utilizada, onde lectinas de animais são “proteínas ou glicoproteínas que reconhecem e interagem com carboidratos específicos, sem participarem do metabolismo dos mesmos e nem pertencerem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas”. (KILPATRICK, 2000).

As lectinas de animais podem ter tanto função imunológica como não imunológica, entretanto as lectinas que mais se destacam são as lectinas com funções imunológicas. Como exemplo de funções imunológicas temos: defesa, tráfego e reconhecimento celular e modulação da resposta imune, e como exemplo de funções não imunológicas desempenhadas por lectinas animal temos: mediação da endocitose, interações célula-célula, regulação do crescimento celular, tráfego intracelular de glicoconjugados, limpeza de restos celulares, ligações extracelulares (MELO, 2013), mostrando que as lectinas estão envolvidas em vários processos biológicos importantes para o animal.

As funções das lectinas nos animais estão relacionadas principalmente com o tipo de lectina presente, dessa forma, as lectinas de animais são divididas em famílias e esta divisão é realizada com base na estrutura e funções desempenhadas.

1.4.3.1 Famílias de lectinas de animais

Inicialmente as lectinas animais eram divididas em duas famílias: lectinas tipo C (lectinas dependes de Ca^{2+}) e lectinas tipo S (ligantes de galactose), também conhecidas como galectinas (DRICKAMER, 1988) e as lectinas que não se encaixavam em nenhuma das duas famílias eram reunidas em um grupo heterogêneo denominado de N-tipos.

Atualmente as lectinas de animais podem ser agrupadas em 19 famílias. Contudo, ao decorrer do tempo e a melhoria das técnicas científicas empregadas pode-se observar a existência de proteínas com diferentes funções e estrutura que deram origem a várias famílias.

Mesmo com a diversidade de famílias existentes há lectinas que não se encaixam, assim são denominadas de ‘‘órfãs’’.

Na Tabela 1 estão apresentadas as principais famílias de lectinas de animais com foco nas suas características e funções:

Tabela 1 - Classificação das lectinas de animais em famílias de acordo com suas características.

Família	Característica	Função
Anexinas ¹	Dependentes de Ca ²⁺ e ligantes de fosfolipídeos, quatro ou oito domínios repetidos com cerca de 70 resíduos aa.	Inibição da fosfolipase A2, coagulação do sangue, regulação do tráfego de membrana e excitose, ligação a proteínas do citoesqueleto.
Calnexina e Calreticulina ²	Domínio lectínico que reconhece o oligossacarídeo precursor Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂ , característico de glicoproteínas recém-formadas.	Compreendem um sistema de chaperonas moleculares do retículo endoplasmático (RE) e que asseguram a dobragem adequada de glicoproteínas recém-sintetizadas
Kaliklektinas ³	Ligantes de manose, possuindo quatro domínios repetidos por monômero, dependentes de Ca ²⁺ e apresentam-se como dímeros ligados por pontes dissulfeto	Estruturalmente semelhantes às cadeias pesadas das calicreínas plasmáticas humanas e aos fatores de coagulação XI de mamíferos
Lectinas tipo C e proteínas contendo o CTLD ⁴	Resíduos conservados nos DRCs (estrutura globular compacta), Possuem em média 130 aminoácidos, com somente 14 resíduos invariáveis e 18 posições conservadas.	Adesão celular e participação no sistema imune inato.
Lectinas tipo F ⁵	Possuem um único sítio de ligação a fucose e um motivo de ligação a Ca ²⁺	Atua no sistema imune.
Lectinas tipo F-Box ⁶	Sítio de ligação a carboidratos, específico a dissacarídeos de GlcNAc, está localizado no lado oposto do domínio de reconhecimento a ubiquitina e é formado por dois <i>loops</i> que conectam as fitas	Regulação das ubiquitinas, as ubiquitinas estão relacionadas com a regulação, localização e atividade das proteínas citoplasmáticas mal formados
Lectinas tipo H ⁷	Incluem a lectina isolada do caracol <i>Helix pomatia</i> , a lectina do octocoral <i>Simularia lochmodes</i> e as discoïdinas isoladas de <i>Dictyostelium discoïdenum</i> . Essas lectinas compartilham cerca de 30% de identidade, além da afinidade por galactose	Simbiose.
Lectinas tipo I ⁸	São proteínas de membrana do tipo I caracterizadas por um domínio do tipo imunoglobulina no amino terminal que contém o sítio de ligação a ácido siálico	A função das Siglecs varia consideravelmente, uma vez que sua especificidade por ácidos siálicos é significativamente diferente, Siglecs relacionadas à CD33 e CD22 são receptores inibidores de sinalização.
Lectinas tipo L ⁹	Possuem o DRC similar aos das lectinas de leguminosas, as células animais expressam quatro tipos de lectinas tipo-L.	Tráfego e secreção de glicoproteínas.
Lectinas tipo M ¹⁰	Ligam-se aos glicanos de manose de glicoproteínas do lúmen do RE, mas não têm função catalítica.	-
Lectinas do tipo P ¹¹	Especificidade do DRC por manose-6-fosfato (M6P); são exclusivamente intracelulares.	Envolvidas no transporte de proteínas pós-Golgi e degradação de glicoproteínas

Lectinas do tipo Quitinase ¹²	Proteínas de mamíferos que pertencem à família das 18 glicosídeo hidrolases, solúveis, intracelulares ou secretadas, que têm uma estrutura semelhante ao barril triose-fosfato isomerase.	Parecem estar envolvidas no sistema imune inato
Lectinas do tipo R ¹³	Assemelham-se as proteínas tóxicas de vegetais, como a ricina e a abrina.	-
Lectinas do tipo X ¹⁴	São dependentes de Ca ²⁺ , conservam um domínio do tipo fibrinogênio que parece estar envolvido na ligação a carboidratos.	-
Lectinas ligantes de Ramnose ¹⁵	Se ligam especificamente a L-ramnose ou D-galactose, são capazes de aglutinar bactérias Gram negativas e Gram positivas por ligarem a LPSs e ácido lipotéico, respectivamente.	Parecem ser um componente importante do sistema imune inato, atuando como PRPs (<i>Pattern recognition proteins</i> - Proteínas de reconhecimento de padrões).
Pentraxinas ¹⁶	Presença de uma estrutura anelar que pode ser encontrada em duas classes de proteínas humanas bem conhecidas: as proteínas reativas C (CRP) e os componentes séricos amilóides P (SAP).	CRP e SAP parecem estar envolvidas no sistema imune inato, atuando no início, bem como na atenuação da resposta inflamatória.
Tachylectinas ¹⁷	Proteínas com seis domínios repetidos contendo de 33 a 38 resíduos cada, com habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos (LPS).	Atuam como anticorpos naturais, formando uma primeira linha de defesa.
Lectinas do tipo S (galectinas) ¹⁸	Ligantes de β galactosídeos e que evolutivamente conservam elementos estruturais e resíduos chave no DRC	Podem desempenhar importantes papéis durante diferentes etapas de processos tumorais, podem também controlar a progressão tumoral por meio da modulação do ciclo celular, regulam a apoptose.
Ficolinas ¹⁹	Específica para grupos acetil, podendo este mesmo DRC ligar-se tanto a carboidratos (ex: ManNAc, GlcNAc e GalNAc) quanto a moléculas não glicídicas.	Representam um grupo de proteínas solúveis constituintes do sistema imune inato.

¹ ISHITSUKA *et al.*, 1998; RAYNAL; POLLARD, 1994; SWAIRJO; SEATON, 1994. ² WILLIAMS, 2006. ³ TSUTSUI *et al.*, 2011. ⁴ DRICKAMER, 1993; WEIS *et al.*, 1991. ⁵ ODOM, 2004. ⁶ DRICKAMER, 2006. ⁷ SANCHEZ *et al.*, 2006. ⁸ VASTA; AHMED, 2008. ⁹ ITIN *et al.*, 1996. ¹⁰ DRICKAMER, 2006. ¹¹ DRICKAMER, 2006. ¹² DRICKAMER, 2006. ¹³ DRICKAMER, 2006. ¹⁴ LEE *et al.*, 2004. ¹⁵ KILPATRICK, 2002; TATENO *et al.*, 2002. ¹⁶ STEEL; WHITEHEAD, 1994; BICKERSTAFF *et al.*, 1999. ¹⁷ KILPATRICK, 2002. ¹⁸ BARONDES *et al.*, 1994. ¹⁹ DRICKAMER, 2006.

Fonte: Almeida, 2014.

1.4.3.2 Lectinas de invertebrados marinhos

Nos últimos anos, um número significativo de lectinas presentes em invertebrados marinhos têm sido isoladas e estudos sugerem que elas representam um componente importante no sistema de defesa, contribuindo com o sistema imunológico inato do animal contra agentes patogênicos (KILPATRICK, 2002). Em particular o número de lectinas purificadas de invertebrados marinhos ainda é pequeno se levarmos em consideração a quantidade de filos existentes, além disso, esses estudos estão concentrados nas lectinas presentes em moluscos e crustáceos.

As lectinas obtidas a partir de invertebrados em sua maioria assemelham-se em função a anticorpos devido a sua capacidade de se ligar a bactérias ou células exógenas, dessa forma, as lectinas de invertebrados têm se destacado devido a essa habilidade de funcionarem como anticorpos naturais, auxiliando o sistema imune inato do animal. Esse papel das lectinas é bastante importante, pois os invertebrados não possuem sistema imune adaptativo (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968). Assim, as lectinas em invertebrados podem desempenhar um papel relevante nos mecanismos de defesa, reconhecendo invasores, danificando as células independentes e mediando a atividade biológica de células (VASTA *et al.*, 1994).

Vários papéis têm sido propostos para as lectinas em invertebrados, incluindo a participação na agregação de célula, fertilização, desenvolvimento embrionários, reparo de feridas, metamorfose, e transporte de açúcares complexos (RENWRANTZ, 1986; VASTA, 1992; OLAFSEN, 1996).

O filo que mais se destaca nos estudos de lectinas de invertebrados é o filo Moslluca. Esse filo é bastante numeroso o que justifica o elevado número de lectinas isoladas e caracterizadas quando comparado com outros filos de invertebrados. Além disso, algumas proteínas apresentam atividade antitumoral, antiviral e antibacteriana. Os animais que despertam mais interesse para os estudos são aqueles de valor econômico ou médico como, por exemplo, as ostras e mexilhões (CHERNIKOV *et al.*, 2013). Nos moluscos as lectinas podem ser detectadas principalmente no plasma ou em vários órgãos e tecidos. Geralmente, as lectinas encontradas no plasma são complexos protéicos multiméricos contendo vários sítios de ligação (CHERNIKOV *et al.*, 2013).

O número de lectinas isoladas de esponja ainda é pouco se compararmos com as lectinas isoladas de moluscos, mas as esponjas têm se revelado como uma promissora fonte de

lectinas de invertebrados. As esponjas são cosmopolitas e possuem habilidade de realizar biossíntese de vários compostos naturais incluindo as lectinas (CARTÉ, 1996; HENTSCHEL *et al.*, 2006).

1.4.3.3 Lectinas de esponjas

A presença de hemaglutininas em esponjas foi relatada pela primeira vez em 1968 por Dodd *et al.*, quando trabalhavam com extratos das espécies *Cliona celata* e *Axinella* sp. Entretanto, a purificação das primeiras lectinas de esponja só ocorreu no ano de 1976 por Bretting e Kabat, quando trabalhavam com a espécie *Axinella polypoides*. Neste estudo foram isoladas duas lectinas (lectina I e II) através de cromatografia de afinidade em matriz Sepharose (BRETTING; KABAT, 1976). Até o presente momento já foi relatado na literatura a purificação de 40 lectinas do filo porifera, sendo 39 pertencentes a classe demospongiae e apenas 1 pertencente a classe hexactinellida (GARDÉRES *et al.*, 2015). É um número pequeno se levarmos em consideração a quantidade e diversidade de espécies existentes.

De modo geral as lectinas de esponjas possuem algumas características como baixo peso molecular, são termoestáveis com poucas exceções, a maioria é específica à galactose, e seus derivados, e podem ser glicoproteínas (GOMES FILHO *et al.*, 2015). Na maioria das vezes as lectinas de esponjas foram purificadas usando técnica de cromatografia de afinidade, seguida por cromatografia de exclusão molecular.

As lectinas geralmente são classificadas de acordo com sua estrutura primária e sua seletividade de ligação. Lectinas de esponjas podem pertencer a família das galectinas (lectinas tipo S), lectinas tipo C, tachylectinas e lectinas do tipo F. As galectinas de esponjas diferem das galectinas encontradas em outros animais, pois abrigam características estruturais específicas, ou seja, as galectinas de esponjas podem criar grandes complexos moleculares na presença de Ca^{2+} (não envolvido na ligação a carboidratos) e possuem uma afinidade elevada por açúcares contendo N-acetil-galactosamina (GARDÉRES *et al.*, 2015).

Vários estudos têm demonstrado diferentes funções fisiológicas realizadas pelas lectinas de esponjas, como associação com micro-organismos (MULLER *et al.*, 1981), interações celulares e morfogênese (GARDÉRES *et al.*, 2015), defesa (KAMIYA; MURAMOTO; GOTO, 1990), agregação celular (GUNDACKER *et al.*, 2001), formação de espículas (GARDÉRES *et al.*, 2015) e regulação do crescimento (WIENS *et al.*, 2006).

Recentemente foi relatada a ligação entre um cromóforo e uma lectina, fato evidenciado com uma lectina (H-3), da esponja marinha *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et*

al., 2013). H-3 é uma proteína azul que interage com o cromóforo 597, caracterizando essa lectina como uma proteína pigmento (CARNEIRO *et al.*, 2013). Após esse estudo outra lectina foi encontrada ligada a um cromóforo, a lectina (HMA) da esponja marinha *Haliclona manglaris* (CARNEIRO *et al.*, 2015). HMA é uma proteína lilás que interage com o cromóforo 581 e apresentou atividade antioxidante, sendo eficaz na proteção do β -caroteno. Desta forma, especula-se que o cromóforo presente em HMA esteja envolvido na fotoproteção oxidativa da esponja. HMA não possui similaridade de sequência com qualquer outra proteína conhecida. Assim, podemos observar uma outra função fisiológica lectinica nas esponjas marinhas.

Inicialmente as lectinas de esponjas eram purificadas objetivando descobrir suas funções fisiológicas. Mas ao mesmo tempo, além da capacidade dessas proteínas em aglutinar eritrócitos humanos, foram observadas outras atividades biológicas, sugerindo que essas lectinas teriam um potencial biotecnológico a ser explorado. A primeira lectina de esponja que demonstrou capacidade de estimular a divisão celular de linfócitos humanos foi isolada da esponja marinha *Geodia cydonium* (BRETTING *et al.*, 1981). Até o presente momento as lectinas isoladas de esponjas têm mostrado um amplo potencial biotecnológico com várias atividades biológicas já relatadas, incluindo modulação da atividade neural, imunomodulação em mamíferos, detecção e eliminação de câncer, atividade contra patógenos de mamíferos incluindo humanos, inibição da formação do biofilme bacteriano (GARDÉRES *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2017).

Atualmente, devido ao desenvolvimento de bibliotecas de cDNA de esponjas é possível ter acesso direto a sequências dos genes codificadores das lectinas e sua produção em sistemas heterólogos, facilitando assim a avaliação de suas bioatividades (GARDÉRES *et al.*, 2015).

Devido a esses fatos, podemos concluir que as lectinas de esponjas constituem uma fonte de moléculas interessantes do ponto de vista biotecnológico. Suas propriedades de ligação a carboidratos e suas atividades biológicas indicam que elas possuem um potencial de aplicação contra algumas doenças ou como biomarcadores específicos. (GARDÉRES *et al.*, 2015).

1.4.3.4 Lectinas do gênero *Aaptos*

No ano de 1976 foram isoladas três lectinas da espécie *Aaptos papillata* (*Aaptos lectin* I, II e III), que estão entre as primeiras lectinas de esponjas purificadas e caracterizadas no mundo. O isolamento dessas proteínas foi realizado por cromatografia de afinidade em mucina de estômago suíno. Em gel de eletroforese a *Aaptos lectin* I apresentou duas bandas

com massa molecular de 12 e 21 kDa respectivamente e *Aaptos lectin* II e III apresentaram ambas 16 kDa. A primeira lectina é específica a N-acetil-glicosamina, já as outras duas são específicas a N-acetil-galactosamina, N-acetil-glicosamina e ácido siálico. (BRETTHING *et al.*, 1976). Apesar do gênero englobar várias espécies, só há registro de lectinas isoladas da *A. papillata*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a purificação e a caracterização bioquímica de uma lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp. além de avaliar o seu potencial na inibição da formação do biofilme bacteriano.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta da esponja

Espécimes da esponja marinha *Aaptos* sp. foram coletados em poças de maré na praia de Icarai de Amontada, localizada no município de Amontada, litoral oeste do Ceará, com autorização do SISBIO Nº 33913-5. Após a coleta, as esponjas foram transportadas em sacos plásticos contendo água do mar até o Laboratório de Biotecnologia Marinha (BIOMAR-LAB) localizado no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em seguida foram limpas e armazenadas a -20°C para uso posterior.

2.2 Purificação da lectina

O material foi descongelado e em seguida cortado em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura, sendo homogeneizado posteriormente com o tampão tris 25 mM, pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M e CaCl₂ 20 mM (TBS/CaCl₂), na proporção de 1:3 peso/volume. A mistura foi centrifugada a 5000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato bruto) foi submetido à determinação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976) e a ensaios de hemaglutinação.

Em seguida, o extrato bruto foi novamente centrifugado e submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de goma de Guar (4,5 x 2,5 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão de extração (TBS/CaCl₂), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e monitorada a 280 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 *pro* (Amershan). O material não retido na coluna foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio até os efluentes apresentarem absorvância menor que 0,02. Já o material retido na coluna foi eluído com adição do tampão tris 25 mM, pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M e EDTA 20 mM (TBS/EDTA). As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e usadas posteriormente para a cromatografia de exclusão molecular.

Na cromatografia de exclusão molecular foi utilizada uma coluna Biosuite™ 250 HR SEC (0,78 x 30cm, tamanho de partícula 5 µm) acoplada a um sistema Acquity UPLC™ (Waters Corp.), a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão TBS/CaCl₂ pH 7,6, sendo a lectina purificada de acordo com o tempo de eluição. As frações correspondentes a lectina foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para uso posterior.

2.3 Preparação dos eritrócitos e atividade hemaglutinante

Eritrócitos humanos do sistema ABO foram obtidos junto ao HEMOCE (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará) e os eritrócitos de coelho foram provenientes de animais adultos sadios, mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

A partir dos diversos tipos de sangue foram preparadas suspensões de eritrócitos nativos (não tratados) e tratados enzimaticamente com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina). Inicialmente os eritrócitos foram lavados 6 vezes com 10 volumes de NaCl 0,15 M e, em seguida foram preparadas suspensões a 3% (v/v) em NaCl 0,15 M.

Para a preparação dos eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas, as hemácias foram incubadas separadamente com tripsina e papaína ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora, a 37°C , lavadas 6 vezes com solução salina e finalmente, ressuspensas de modo a obter uma concentração final de eritrócitos a 3% (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de microtitulação de fundo V, usando o método da dupla diluição seriada. Inicialmente foi adicionado a cada poço 50 μL de TBS/ CaCl_2 , depois 50 μL das amostras (diluídas serialmente) e finalmente 50 μL de eritrócitos foram adicionados a cada poço, as placas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente (25°C), sendo a atividade hemaglutinante observada macroscopicamente. Uma unidade de hemaglutinação (U.H.) foi definida como sendo o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 3%. (SAMPAIO *et al.*, 1998).

2.4 Inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado de acordo com o método descrito por Sampaio *et al* (1998), utilizando os seguintes açúcares e glicoproteínas: α -metil-D-galactopiranosídeo, β -metil-D-galactopiranosídeo, 4-nitro-fenil- α -D-galactosídeo, nitrofenil- β -galactosídeo, metil-galactosídeo, O-nitro-fenil- β -D-galactosídeo, nitrofenil- β -galactosídeo, α -lactose ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\alpha\text{-Glu}$), melibiose ($\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Glu}$), fucose, fenil- β -D-thiogalactopiranosídeo, L-ramnose, N-acetil-galactosamina, ribose, L-arabinose, D-galactose, D-manose, lactulose, glucosamina, D-glicose, ralfinose, frutose, sacarose, GlcNac, xilose, maltose, mucina de estômago suíno tipo II e tipo III.

Os testes foram realizados em placas de microtitulação de fundo V, onde 25 μL de lectina contendo 4 U.H. foram adicionados a 25 μL da solução de açúcares e glicoproteínas diluídos serialmente em TBS/ CaCl_2 , sendo então incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 50 μL de eritrócitos a 3% a cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente (25 $^\circ\text{C}$). Os resultados foram expressos como a concentração mínima de carboidratos ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina.

2.5 Eletroforese e estimativa da massa molecular

A determinação do grau de pureza da lectina isolada foi realizada através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e ausência de β -mercaptoetanol, corado com Comassie (LAEMMLI, 1970). Além disso, a eletroforese em SDS-PAGE foi utilizada para estimar a massa molecular da proteína sob condições de desnaturação. O gel utilizado (12%) foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1h. A massa molecular aparente da lectina foi estimada pela comparação da migração dessa proteína no gel com os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovomucóide (21 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

A massa molecular nativa da proteína foi estimada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Biosuite TM 250 HR SEC (0,78 x 30cm, tamanho de partícula 5 μm) acoplada a um sistema Acquity UPLC TM (Waters Corp.), a um fluxo de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A coluna foi equilibrada e eluída com TBS/ CaCl_2 pH 7,6, e o tempo de eluição da lectina foi determinado de acordo com a comparação com os seguintes padrões: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e lisozima (14 kDa).

2.6 Caracterização físico química

2.6.1 Efeito do pH na atividade hemaglutinante

Para avaliar o efeito do pH na atividade hemaglutinante, a lectina na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi incubada por 1 h com diferentes tampões variando o pH de 4,0 à 10,0, seguido pela determinação da atividade hemaglutinante. Para este ensaio foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 100 mM (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0); tris-HCl

100 mM (pH 7,0 e 8,0) e glicina 100 mM (pH 9,0 e 10,0) (SAMPAIO *et al.*, 1998). Em todos os tampões contia NaCl 0,15 M e CaCl₂ 20 mM.

2.6.2 Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante

O efeito da temperatura na atividade hemaglutinante foi avaliado da seguinte forma: a solução da lectina na concentração de 1 mg.mL⁻¹ foi aquecida a 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C, pelo período de 1 hora, seguido pela determinação da atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

2.6.3 Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante

Para avaliar o efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante, a solução da lectina na concentração 1 mg.mL⁻¹ foi serialmente diluída no tampão tris 50 mM, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M e EDTA 100 mM (TBS/EDTA). Após 1 h de incubação, a atividade hemaglutinante foi determinada (CARNEIRO, 2013). Em seguida, foram adicionados íons divalentes para tentar recuperar a atividade hemaglutinante da proteína.

2.6.4 Teor de carboidratos

O teor de carboidratos presente na lectina foi determinado através do método do fenol ácido sulfúrico, como descrito em 1956 por Dubois e colaboradores (DUBOIS *et al.*, 1956), lactose foi usada como padrão.

2.7 Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas

A massa molecular média de cada lectina foi determinada através de espectrometria de massas utilizando fonte de ionização MALDI. As amostras foram solubilizadas em solução de 30% de acetonitrila (ACN) contendo 0,3% de ácido trifluoroacético (TFA).

Na ionização por MALDI as matrizes utilizadas foram o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico, 10 mg/mL em 30% ACN, 0,1% TFA) e α -4-ciano-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 50% ACN; 0,3% TFA). Para obtenção dos dados o instrumento (Autoflex MALDI-TOF, Bruker-Daltonics) operou com voltagem de 20 kV com

analisador em modo linear e na faixa de relação massa/carga (m/z) de 20.000 a 80.000. Os espectros adquiridos foram processados com software FlexAnalysis

2.8 Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

Inicialmente, foi realizado um SDS-PAGE (12%) conforme descrito no item 2.5, as bandas correspondentes à lectina foram excisadas com o auxílio de uma ponteira e transferidas para tubos eppendorfs. As bandas proteicas foram descoradas com 25 mM de bicarbonato de amônio/ACN (1:1 vol/vol), mantidas sob agitação por 30 minutos sendo então centrifugadas e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido até que o gel perdesse a coloração completamente.

Após a remoção total do corante, as bandas foram desidratadas com ACN 100%, a temperatura ambiente, sob agitação e secas em um concentrador a vácuo (LABCONCO). Em seguida as bandas foram reduzidas e alquiladas conforme descrito por Shevchenko *et al.*, (2007). A redução foi realizada através da adição de 100 μ L de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo Ditiotreitól (DDT) 10 mM, por 1 hora a 56 °C. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A alquilação foi realizada através da adição de 100 μ L de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo iodoacetoamida (IAA) 55 mM, por 45 minutos, abrigado da luz, em temperatura ambiente. Depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado (gel reduzido e alquilado) lavado algumas vezes com bicarbonato de amônio 25 mM, contendo ACN 50%. O tempo de incubação para cada lavagem foi de 10 minutos sob agitação constante. Após o descarte do último sobrenadante os pedaços de gel foram desidratados com 100 μ L de ACN 100% e secos em concentrador a vácuo.

Em seguida, as bandas foram reidratadas com solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo tripsina na proporção de 1:50 m/m (enzima:substrato). A digestão foi mantida por 16 horas a 37 °C e parada pela adição de 2 μ L de ácido fórmico 2% (AF). Para a extração dos peptídeos da digestão enzimática utilizou-se uma solução contendo AF 5% com ACN 50%. A mistura foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugada e o sobrenadante coletado. Esse procedimento foi repetido quatro vezes e os sobrenadantes coletados foram secos em um concentrador a vácuo. Após secagem, os peptídeos foram solubilizados em 20 μ L de AF 0,1% e centrifugados a 5000 xg por 2 minutos.

Dois microlitros da solução de peptídeos foram aplicados em uma nano coluna de C-18 (0,075 x 100 mm) acoplada a um sistema de nanoACQUITY (Waters Corp). A coluna foi

equilibrada com 0,1% de AF e eluída com um gradiente de ACN 10% a 85% em 0,1% de AF. Os eluatos da cromatografia foram infundidos em uma fonte “nano eletrospray” de um espectrômetro de massas híbrido (Synapt HDMS system-Waters Corp). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 373 K, sob voltagem capilar de 3,0 kV e calibrado com o padrão de fragmentação do [Glu1]-fibrinopeptídeo B. A coleta de dados foi realizada de acordo com o método de aquisição dependente de dados (*Data dependent analysis* - DDA). A referência utilizada durante a coleta de dados foi o íon de m/z 785,84 de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. Os íons selecionados foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*), utilizando argônio como gás de fragmentação. Todos os espectros CID foram interpretados manualmente e pesquisas para similaridade foram realizadas *on-line* utilizando BLAST no site do NCBI.

2.9 Dicroísmo Circular

A espectroscopia por Dicroísmo Circular (DC) foi realizada em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão), ligado a um regulador de temperatura. A lectina (0,2 mg solubilizada em 1 mL de TBS/CaCl₂, pH 7,6) foi colocada em uma cubeta retangular de quartzo com 0,5 mm comprimento. Foi preparada também, uma amostra da lectina com EDTA 250 mM para averiguar sua interferência na estrutura secundária da proteína. Os espectros foram adquiridos a uma velocidade de varredura de 50 nm/min com uma largura de banda de 1 nm. As aquisições foram realizadas de 200-250 nm (longe-UV). As análises de dados estruturais foram realizadas pelo servidor web DICHROWEB (WHITMORE; WALLACE, 2008).

2.10 Ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

O ensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia* sp. foi realizado conforme descrito por Carneiro *et al.* (2012). Os cistos foram incubados com água do mar artificial (1g de cistos/L de água do mar) sob iluminação e aeração constante a 28°C. Após 48 horas a aeração foi suspensa e os náuplios foram coletados para os ensaios. A lectina em diferentes concentrações (12,5; 25; 50; 100 µg.mL⁻¹) foi incubada com os náuplios em placas de limbro, os ensaios foram realizados em triplicata e em cada poço foi adicionado 10 náuplios com o volume final ajustado para 2 mL. Após 24 horas o número de náuplios mortos em cada poço foi contado.

2. 11 Inibição da formação de biofilmes bacterianos

2.11.1 Micro-organismos utilizados

Para este ensaio foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12225, e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11303, todas da American Type Culture Collection (ATCC).

2.11.2 Condições de cultivo

As bactérias foram cultivadas em meio Agar Triptona de Soja (TSA) sendo incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida foi verificado o crescimento de pelo menos 5 colônias isoladas, estas colônias foram removidas e inoculadas em 5 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB) por 18 h a 37 °C sob agitação constante. Após o crescimento, a suspensão de bactérias foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria (620 nm) com curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

2.11.3 Atividade da lectina sobre o crescimento planctônico

O efeito da lectina sobre o crescimento planctônico foi realizado segundo o método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços. A lectina foi diluída em NaCl 0,15 M em concentrações variando de 250 a 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, cada poço da microplaca foi preenchido com 100 μL das diferentes concentrações da lectina. Por último foi adicionado 100 μL de células (previamente ajustadas a 2×10^6 células/mL) para se obter um volume final de 200 μL em cada poço. Como controle foi utilizado apenas NaCl 0, 15 M sem a presença da lectina. As placas foram então incubadas a 37°C, durante 24 horas, em seguida a densidade óptica de cada poço foi registrada a 620 nm utilizando um leitor de microplacas automático (SpectraMax® I3) para avaliar o crescimento bacteriano.

2.11.4 Ação da lectina sobre a formação dos biofilmes

A metodologia que foi empregada neste ensaio está de acordo com Stepanovic e colaboradores (2000), mas com algumas modificações. As placas de polipropileno de 96 poços estéreis foram preparadas utilizando um procedimento semelhante ao utilizado no ensaio de

crescimento planctônico (concentração inicial de células e de lectina). Todas as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para o desenvolvimento dos biofilmes. Após o crescimento dos biofilmes (na presença e ausência da lectina), o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes submetidos a duas lavagens com 200 µL/poço de água estéril afim de remover as células fracamente aderidas. Todo o procedimento foi realizado em duas placas de microtitulação distintas, uma para a avaliação da biomassa total, e a outra para a análise do número de células viáveis presentes nos biofilmes.

2.11.5 Quantificação da biomassa

Para quantificar a biomassa total de biofilme formada foi utilizado um método colorímetro através do cristal violeta (CV). Para a fixação do biofilme, 200 µL de metanol 99% foram adicionados a cada poço por 5 minutos, após este tempo o metanol foi removido e as placas secaram naturalmente a temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de cristal violeta a 1% foi adicionado aos poços e após 5 minutos o excesso do corante foi removido e as placas lavadas com água estéril. Por último, 200 µL de solução de ácido acético (33%; v/v) foram adicionados aos poços para dissolver o cristal violeta e em seguida a densidade óptica foi medida a 590 nm.

2.11.6 Enumeração das células viáveis

Após a lavagem foi adicionado aos biofilmes bacterianos 200 µL de água estéril (em cada poço) e as placas foram colocadas em banho ultrassônico operando a 50 kHz, por 8 minutos. As suspensões obtidas foram distribuídas em tubos e diluições seriadas de forma decimal foram realizadas. As diluições da suspensão bacteriana foram então inoculadas em TSA. As placas contendo TSA foram incubadas durante 24 h a 37 °C, e o número total de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado.

2.11.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste *Bonferroni* post-hoc. Será considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

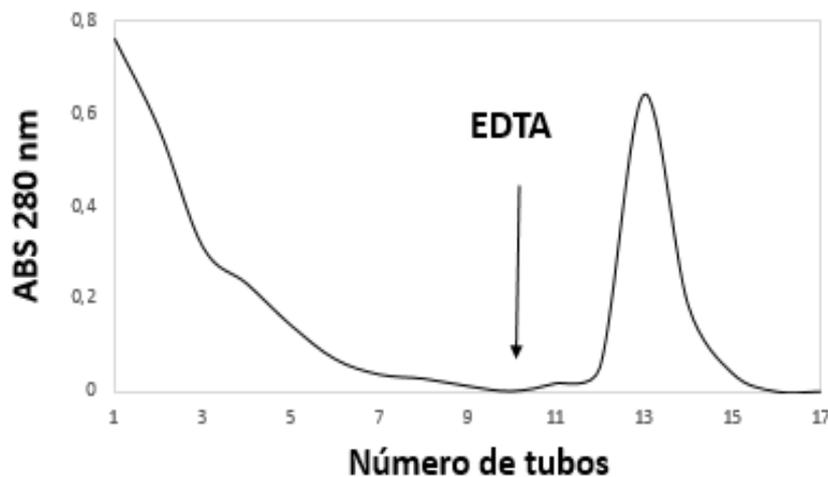
3.1 Purificação da lectina

Uma lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp., denominada de AL (*Aaptos Lectin*), foi purificada a partir da combinação de cromatografia de afinidade em goma de Guar, seguida por cromatografia de exclusão molecular em coluna Biosuite™ 250 HR SEC acoplada a um sistema Acquity UPLC™ (Waters Corp.).

O extrato total aplicado na coluna de afinidade em goma de Guar e toda a atividade hemaglutinante ficou retida na coluna sendo recuperada pela adição do tampão TBS/EDTA 20 mM (Figura 4).

A cromatografia de afinidade em goma de Guar separa proteínas pela sua afinidade a resíduos de galactose presentes na sua estrutura. O material retido na goma de Guar correspondente a lectina foi eluído com EDTA que é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, como o cálcio.

Figura 4 – Cromatografia de afinidade em goma de Guar.



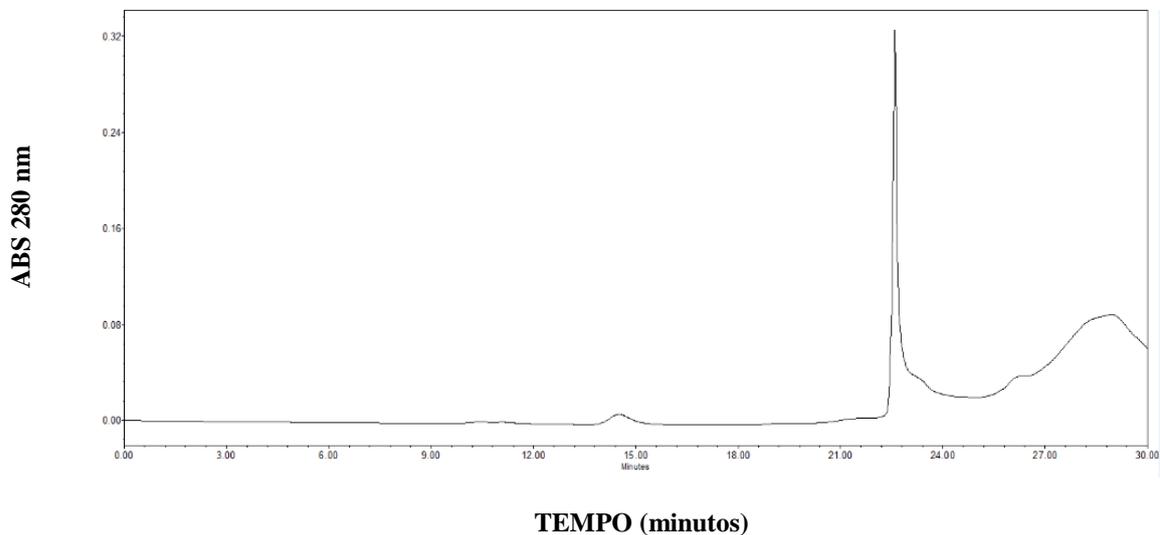
Fonte: Autor. Cromatografia de afinidade em goma de Guar. O extrato bruto (30 mL) foi aplicado na coluna de goma de Guar. A coluna (4,5 x 2,5 cm) foi previamente equilibrada com TBS/CaCl₂ a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e com monitoração a 280 nm. O material não retido na coluna foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio até os efluentes apresentarem absorbância menor que 0,02. Já o material retido na coluna foi eluído com adição do tampão TBS/EDTA 20 mM.

Depois de eluídos da goma de Guar, as frações correspondentes a proteína foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas, solubilizadas em TBS/CaCl₂ e em seguida foi

realizada a cromatografia de exclusão molecular para finalizar o processo de purificação da lectina.

Na cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração há a separação dos componentes da amostra de acordo com o tamanho, as moléculas maiores não penetram no gel saindo primeiro e as moléculas menores penetram no gel saindo depois, ou seja, quanto menor a molécula maior será o tempo de eluição. Dessa forma, as moléculas são identificadas de acordo com seu tempo de eluição. No estudo em questão a cromatografia de exclusão molecular (Figura 5), foi necessária para separar a proteína (AL) do EDTA e de outras impurezas.

Figura 5 – Cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Autor. Cromatografia de exclusão molecular. As frações da goma de Guar correspondentes a lectina foram dialisados, liofilizados em seguida foram solubilizados em TBS/CaCl₂ e aplicados na coluna Biosuite™ 250 HR SEC (0,78 x 30cm, tamanho de partícula 5 µm) acoplada a um sistema Acquity UPLC™ (Waters Corp.), a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão TBS/ CaCl₂.

Outras lectinas de esponjas foram isoladas através da combinação de cromatografia de afinidade seguida por cromatografia de exclusão molecular, é o caso da CaL a lectina da esponja marinha *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2010), da ACL-I a lectina da esponja marinha *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008), da HOL-1 uma das lectinas da esponja marinha *Halichondria okadai* (KAWAGISHI *et al.*, 1993), e da lectina da esponja marinha *Pellina semitubulosa* (ENGEL *et al.*, 1992).

3.2 Sumário de purificação

A Tabela 2 apresenta o resultado das etapas utilizadas para a purificação da lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp. (AL). O material oriundo da cromatografia de exclusão molecular apresentou uma purificação de 117,3 vezes, com incremento na atividade específica de 10.667. A CMA, definida como a concentração mínima de proteína capaz de causar aglutinação dos eritrócitos, decresceu de 283,4 do extrato bruto para 0,09 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O rendimento da lectina purificada foi de 0,5% em relação a concentração de proteína no extrato total.

Tabela 2 – Tabela de purificação da lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp.

Frações	[] de Proteína (mg/mL)	Vol. (mL)	U.H/mL	Proteína total (mg)	U.H total	Atividade específica (U.H/mg)	Rendimento Prot. (%)	Purificação (x)	Rendimento Ativ. (%)	CMA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Extrato	1,1336	100	4	113,36	400	3,52	100	1	100	283,4
Pico Goma de Guar	0,352	50	32	17,6	1.600	90,9	15	25,8	400	11
Pico Gel Filtração	0,024	24	256	0,576	6.144	10.667	0,5	117,3	1.536	0,09

Fonte:Autor.

Vários trabalhos na literatura evidenciam também o baixo rendimento das lectinas isoladas de esponjas marinhas, como é o caso da HCL lectina da esponja marinha *Haliclona cratera* que representa 0,04% das proteínas totais solúveis (PAJIC *et al.*, 2002), e da H-1 uma das lectinas isoladas da esponja marinha *H. caerulea* que representa 0,1% das proteínas totais solúveis (CARNEIRO *et al.*, 2012), embora algumas lectinas isoladas tenham apresentado rendimentos satisfatórios, como foi observado para as lectinas de *H. manglaris* (HMA) que apresentou 1,8% das proteínas totais solúveis (CARNEIRO *et al.*, 2015), e da H-3 uma das lectinas isoladas esponja marinha *H. caerulea* que apresentou 2% das proteínas totais solúveis (CARNEIRO *et al.*, 2013).

3.3 Atividade hemaglutinante

A lectina foi capaz de aglutinar apenas eritrócitos de coelho tanto na forma nativa como tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina), não aglutinando eritrócitos

humanos do grupo ABO, não tratados ou tratados com enzimas proteolíticas (Tabela 3). Porém, a atividade hemaglutinante foi mais eficiente frente a eritrócitos de coelho que foram tratados com papaína e tripsina. Em geral, a atividade hemaglutinante é potencializada quando as hemácias são tratadas com enzimas proteolíticas, devido à combinação da remoção de sialoglicoproteínas e suas cargas negativas presentes na parede celular dos eritrócitos; diminuição do impedimento estérico pela remoção dos polipeptídios e exposição de carboidratos e glicoconjugados não expostos na superfície dos eritrócitos (SAMPAIO, 1997).

Carneiro *et al.* (2015) evidenciaram que a lectina purificada da esponja *Haliclona manglaris* também aglutinou apenas eritrócitos de coelho com preferência por eritrócitos tratados enzimaticamente com papaína e tripsina mas com preferência por eritrócitos de coelho tratados com tripsina. A HGA-2 uma das lectinas isolada do pepino-do-mar *Holothuria grisea* também aglutinou apenas eritrócitos de coelho com preferência por eritrócitos tratados com tripsina (MELO *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Atividade hemaglutinante da lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp.

Eritrócitos de coelho	AL (U.H/mL)
Nativo	64
Tripsina	256
Papaína	256

Fonte: Autor. Atividade hemaglutinante frente a diferentes eritrócitos (contra eritrócitos de coelho) nativos e tratados com enzimas proteolíticas.

3.4 Inibição da atividade hemaglutinante

No estudo da inibição da atividade hemaglutinante AL foi inibida pelos açúcares: α -metil-D-galactopiranosídeo, β -metil-D-galactopiranosídeo, 4-nitro-fenil- α -D-galactosídeo, *O*-nitro-fenil- β -D-galactosídeo, α -lactose (Gal β 1 \rightarrow 4 α -Glu), melibiose (Gal α 1 \rightarrow 6Glu), fucose, fenil- β -D-thiogalactopiranosídeo, L-ramnose, GalNAc, ribose e pelas glicoproteínas mucina de estômago suíno tipo II e tipo III (Tabela 4). Este resultado nos sugere que AL é específica a galactosídeos, por isso foi possível utilizar a cromatografia de afinidade em goma de Guar como passo de purificação da proteína. A maioria das lectinas de esponjas são específicas a galactose

e galactosídeos (GARDÉRES *et al.*, 2015; HANISCH *et al.*, 1996; SCHRÖDER *et al.*, 2003; KAWSAR *et al.*, 2008; UEDA *et al.*, 2013).

AL também foi inibida pela glicoproteína mucina de estômago suíno, na literatura outras duas lectinas de esponja também foram inibidas por mucina de estômago suíno, H-2 (CARNEIRO *et al.*, 2012) e H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013), ambas lectinas de esponja marinha *Haliclona caerulea*.

Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante da AL por açúcares e glicoproteínas.

Açúcar	CIM* (mM)
α -metil-D-galactopiranosídeo	5
β -metil-D-galactopiranosídeo	5
<i>P</i> -nitro-fenil- α -D-galactosídeo	5
<i>O</i> -nitro-fenil- β -D-galactosídeo	5
α -lactose (Gal β 1 \rightarrow 4 α -Glu)	25
Melibiose (Gal α 1 \rightarrow 6Glu)	25
Fucose	25
Fenil- β -D-thiogalactopiranosídeo	50
L-ramnose	50
GalNAc	50
Ribose	50
Glicoproteínas	mg/mL
PSM tipo III	0,015
PSM tipo II	0,031

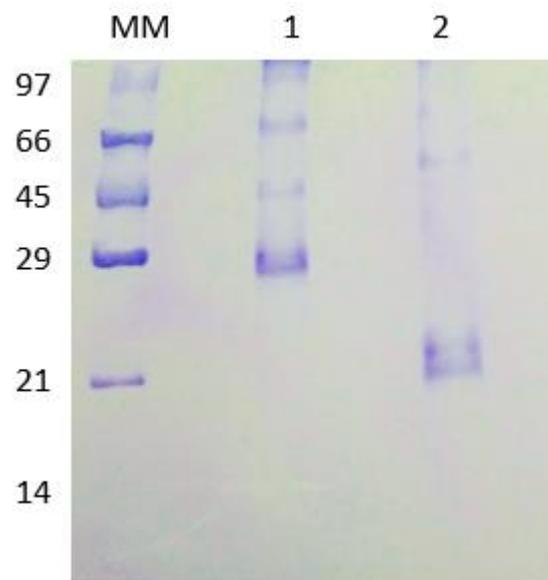
Fonte: Autor. *Concentração mínima inibitória

3.5 Eletroforese e estimativa da massa molecular

Através de SDS-PAGE, a massa molecular aparente da AL foi estimada em 21 kDa sob condições redutoras e em 29 kDa sob condições não redutoras (Figura 6), sugerindo que a proteína trata-se de um dímero.

De modo geral as lectinas de esponjas possuem como característica baixo peso molecular (GOMES FILHO *et al.*, 2015). Dessa forma, podemos citar alguns exemplos de lectinas de esponja marinha que apresentam baixo peso molecular em gel de eletroforese sob condições redutoras assim como a AL: as lectinas da *Aaptos papillata* que apresentaram 12, 21 e 16 kDa (BRETTEING *et al.*, 1976), as lectinas da *Axinella polypoides* que exibiram 21 e 15 kDa (BRETTEING; KABAT, 1976), as lectinas da *Aplysina archeri* e *Aplysina lawnosa* que exibiram ambas 16 kDa (MIARONS; FRESNO, 2000), a lectina da *Craniella australienses* que exibiu 18 kDa (XIONG *et al.*, 2006), a lectina da *Aplysina lactuca* que exibiu 19 kDa (CARNEIRO *et al.*, 2017b).

Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS (SDS-PAGE).



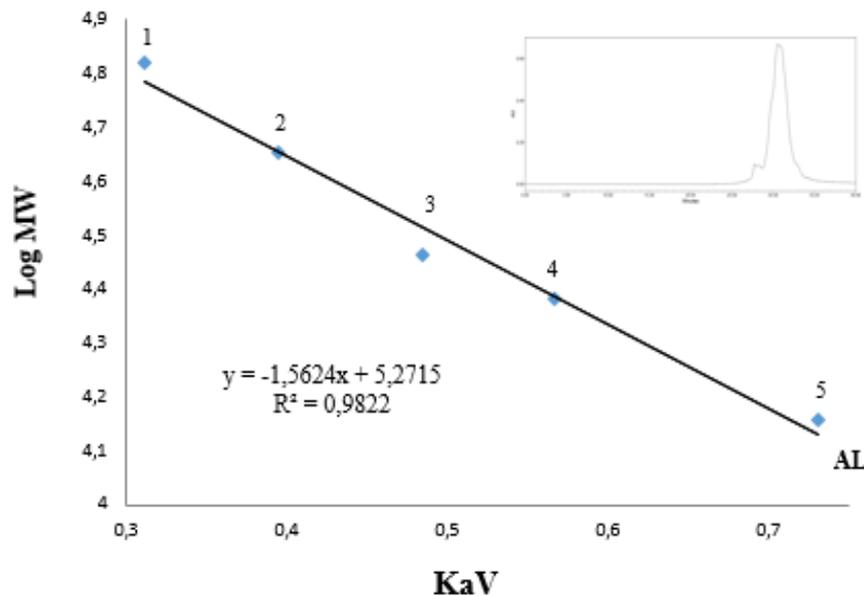
Fonte: Autor. SDS-PAGE 12%. Foram aplicados 20 μ g de proteína em cada poço. Marcador molecular (MM) (fosforilase B 97.000 Da, BSA 66.000 Da, ovalbumina 45.000 Da, anidrase carbônica 29.000 Da, ovomucóide 21.000 Da, ribonuclease 13.700 Da e aprotinina 6.500 Da), AL não reduzida (1), AL reduzida (2).

A massa molecular estimada através da cromatografia de exclusão molecular em coluna Biosuite™ 250 HR SEC, acoplada a um sistema Acquity UPLC™ (Waters Corp.) foi de 12 kDa (Figura 7). Como podemos observar, a massa estimada por cromatografia de exclusão molecular diferiu da massa por SDS-PAGE, que foi de 21 kDa.

Outra lectina de esponja também exibiu valor de massa molecular em SDS-PAGE maior do que o obtido por cromatografia de exclusão molecular, é o caso da H-1 que apresentou massa de 15 kDa estimada por gel filtração e massa de 40 kDa estimada por SDS-PAGE (CARNEIRO *et al.*, 2012). O autor de tal estudo sugeriu que o valor mais elevado de massa

molecular observado em SDS-PAGE pode ser devido a natureza ácida ou glicoproteíca das lectinas. Durante SDS-PAGE, proteínas ácidas ou glicoproteínas tendem a migrar mais lentamente resultando em uma massa molecular aparente maior (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Figura 7 – Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Autor. Cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSuite 250 5 µm HR SEC (0,78 x 30 cm, fluxo:0,4 mL/min), equilibrada com tampão TBS/CaCl₂ pH 7,6, volume aplicado de *Aptos*: 500 µL. Curva de calibração: (1) BSA, 66 kDa; (2) ovalbumina, 45 kDa; (3) anidrase carbônica, 29 kDa; (4) tripsinogênio, 24 kDa e (5) lisozima, 14 kDa.

3.6 Caracterização físico química

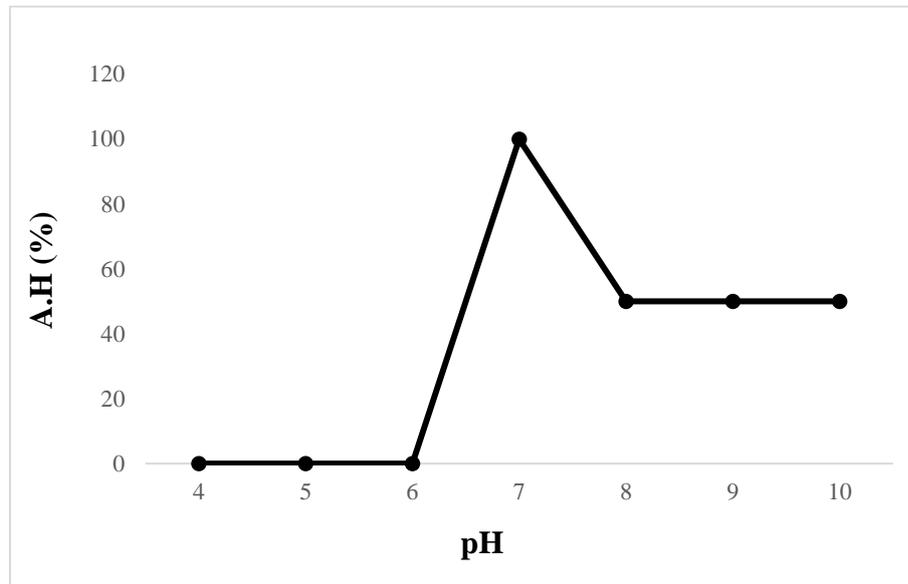
3.6.1 Efeito do pH na atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante exibiu seu máximo quando o pH de reação foi 7,0 (Figura 8). Valores da atividade hemaglutinante em pH entre 4-6 levaram a observação da hemólise dos eritrócitos, enquanto que nos pHs 8, 9 e 10 a atividade hemaglutinante foi reduzida em 50% em relação ao pH 7. Os resultados mostraram que a lectina possui um ótimo de atividade hemaglutinante em pH na faixa neutra mas que ainda permanece ativa na faixa alcalina.

É comum encontrarmos na literatura lectinas isoladas de organismos marinhos que apresentem um ótimo de pH na faixa neutra-alcalina (PAJIC *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2005; XIONG *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2014; FUJII *et al.*, 2017). Tal fato ocorre por que o ambiente

marinho possui um poderoso sistema tamponante baseado no equilíbrio entre o gás carbônico dissolvido e o íon bicarbonato.

Figura 8 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante da AL.



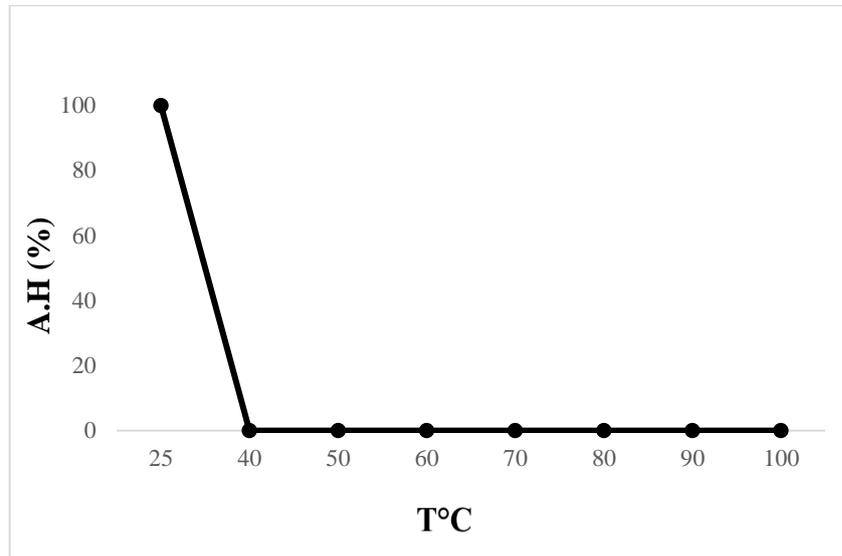
Fonte: Autor. Porcentagem de hemaglutinação em diferentes pH (4 ao 10).

3.6.2 Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante

A proteína quando incubada em diferentes temperaturas apresentou comportamento termolábil, perdendo totalmente sua atividade hemaglutinante a 40°C por uma hora (Figura 9). AL mantém 100% da sua atividade hemaglutinante exclusivamente a 25°C.

Em geral, as lectinas isoladas de esponjas são termorresistentes (PAJIC *et al.*, 2002; DRESCH *et al.*, 2008; UEDA *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2015;), mas há exceções assim como a AL, é o caso da HOL-II (KAWAGISHI *et al.*, 1994) que perde sua atividade hemaglutinante a 50°C.

Figura 9 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da AL.



Fonte: Autor. Porcentagem de hemaglutinação em diferentes temperaturas (25°C a 100 °C).

3.6.3 Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante

AL mostrou ser uma lectina dependente de cálcio, pois o cálcio foi o único íon divalente capaz de recuperar a atividade hemaglutinante da proteína em meio contendo EDTA 100 mM. O EDTA é um composto orgânico que age como um quelante de íons metálicos, e no estudo em questão ele sequestra o cálcio da lectina (AL) e a atividade hemaglutinante é perdida.

Lectinas dependentes de íons divalentes, especialmente o Ca^{2+} , é um fato comum em invertebrados marinhos (MELO *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2007). Assim, várias lectinas de esponjas demonstraram dependência por cálcio, como a lectina isolada de *Geodia cydonium* (HANISCH *et al.*, 1996), a Sd galectin 2 lectina da *Suberites domuncula* (SCHRÖDER *et al.*, 2003), a AaL lectina da *Aplysina archeri* (MIARONS; FRESNO, 2000), a AIL lectina da *Aplysina lacunosa* (MIARONS; FRESNO, 2000), a AvL lectina da *Aphrocallistes vastus* (GUNDACKER *et al.*, 2001), a CvL lectina da *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), a PsL lectina da *Pellina semitubulosa* (ENGEL *et al.*, 1992), e a lectina da *Clathrina clathrus* (GÁRDERES *et al.*, 2016).

Antigamente, a dependência por cálcio era um fator que determinava a classificação da lectina em tipo-C, mas após vários estudos estruturais ficou evidente que as proteínas tipo C possuem um domínio de reconhecimento a carboidrato característico, formado por *loop* duplo estabilizado por duas pontes de sulfeto altamente conservadas localizadas na base do segundo

loop (ZELENSKY; GREADY, 2005). Assim, as proteínas contendo um domínio lectínico do tipo C (CTLD - *C-type lectin like*) se encaixam na família tipo C. Dessa forma para classificar qualquer lectina como tipo C inclusive a AL, são necessários vários estudos estruturais, visto que a dependência por cálcio pode ser apenas um indício.

3.6.4 Teor de carboidratos

Através da metodologia para determinação de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) foi observado que a lectina purificada de *Aaptos* sp. (AL) não se caracteriza como uma glicoproteína. Assim, como outras lectinas de esponjas (PAJIC *et al.*, 2002; KAWSAR *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2017b).

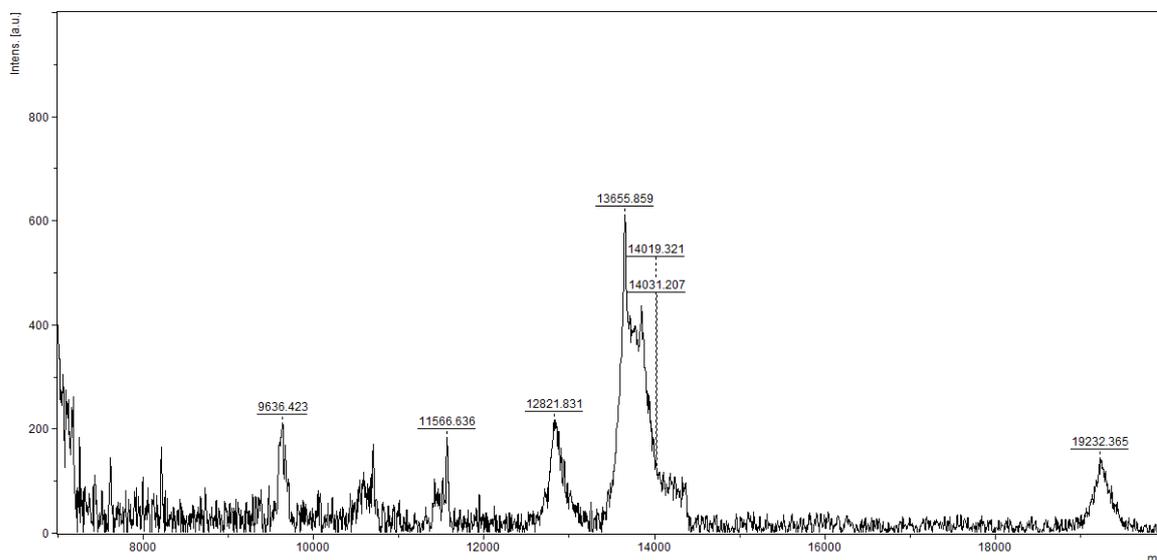
3.7 Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas

A massa molecular de AL, determinada por espectrometria de massas, foi de 13.655 \pm 2 Da. Este resultado está bastante próximo do valor da massa da lectina estimado por cromatografia de exclusão molecular (12.000 Da), mas diverge da massa molecular da lectina, quanto estimada por SDS-PAGE, que foi de 21.000 Da.

Podemos encontrar outras lectinas de organismos marinhos que também mostraram diferenças entre a massa molecular determinada por MS e a massa estimada por eletroforese, como foi observado com a lectina isolada da esponja marinha *H. caerulea* (H-3) (CARNEIRO *et al.*, 2013), e as lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas *Hypnea cervicornis* (HCA) e *Hypnea musciformis* (HML) (NAGANO *et al.*, 2005).

As divergências entre a massa molecular determinada por MS e a massa molecular estimada por eletroforese, podem ser resultado das características intrínsecas da proteína, como pontes de sulfeto intracadeia, glicosilação ou fosforilação. Assim, estas características podem modificar a migração de uma proteína no gel de eletroforese. (CARNEIRO, 2013).

Figura 10 – Determinação da massa molecular da AL por MS.



Fonte: Autor. Determinação da massa molecular de AL por MALDI. Espectro deconvolvido de AL. A lectina (10 pmol/ μ L) dissolvida em 50% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico foi infundida em um espectrômetro de massas híbrido Synapt HDMS a um fluxo de 1 μ L.min⁻¹.

3.8 Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

Os peptídeos obtidos da digestão da AL por tripsina foram submetidos ao sequenciamento de aminoácidos, resultando em seqüências que não apresentaram semelhança com proteínas conhecidas (Tabela 5), através de busca *on-line* utilizando BLAST no site do NCBI. A inexistência de similaridade com outras lectinas impediu a classificação da AL em família de lectinas já existentes, levando a possibilidade de que a lectina isolada de *Aaptos* sp. possa vir a fazer parte de uma nova família de lectinas.

Tabela 5 - Peptídeos sequenciados da AL.

Peptídeos	m/z	Seqüência	MM observada	MM calculada	Δ (Da)
T1	702.3490	SLLVLQQNWFR	1402.6824	1402.7721	0.09
T2	792.0416	LTDKWYSLVPSLGHDTLSWR	2373.1013	2373.2117	0.11
T3	766.7069	ALPPDGTVALVLFQHDITYQGR	2297.0972	2297.1804	0.08
T3'	785.7440	ALPPDGTVALVLFQGHDTYQGR	2354.2085	2354.2019	-0.01
T4	723.8245	AVFFEHTYYNR	1445.6334	1445.6727	0.04
T4'	480.8802	AVFYEHNQYNR	1439.6171	1439.6582	0.04

Fonte: Autor. Seqüência dos peptídeos obtidos da digestão com tripsina da lectina da esponja marinha *Aaptos* sp.

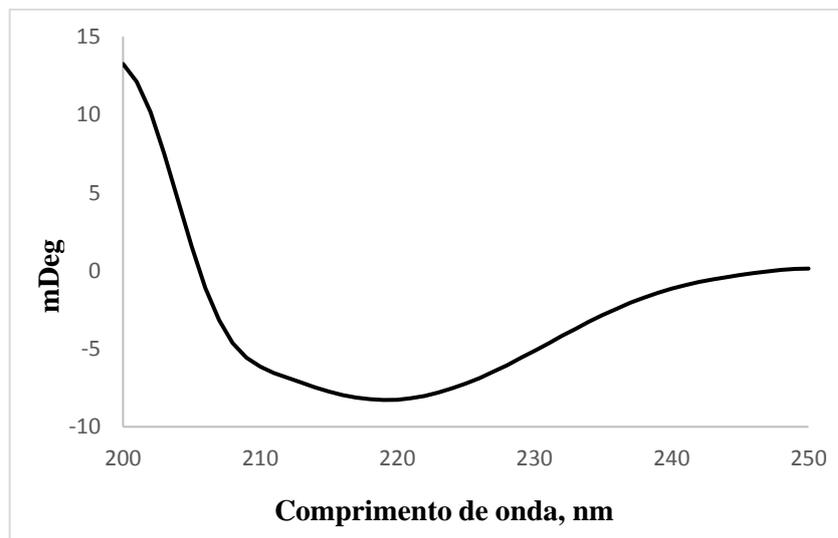
3.9 Dicroísmo circular

O espectro de Dicroísmo Circular (DC) de AL nativa em UV-distante apresentou absorção mínima a 200 nm e absorção máxima a 250 nm (Figura 11). O efeito do EDTA na estabilidade da molécula avaliado pela técnica DC, mostrou que ele não foi capaz de alterar a estrutura secundária da proteína, mesma a lectina tendo apresentado dependência por Ca^{2+} (Figura 12).

O Dicroísmo Circular (DC) é uma técnica espectroscópica extensivamente usada para estudar conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições, como por exemplo, temperatura, força iônica, pH, presença de solutos e/ou pequenas moléculas (MURAKAMI; RULLER, 2016).

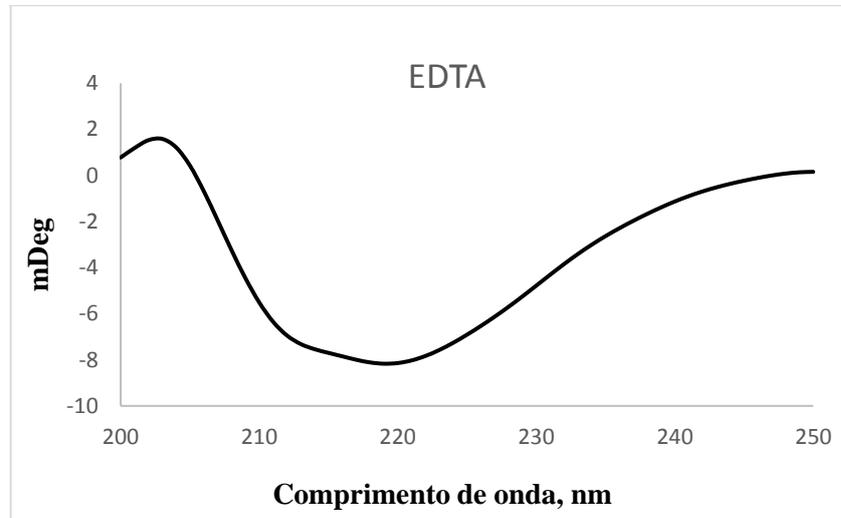
A estrutura secundária teórica da lectina AL é constituída de 28% de α -hélice, 26% de folha- β , e de 46% de região randômica, de acordo com o método de previsão CONTIN (VAN STOKKUM *et al.*, 1990), disponível online como parte do servidor DICROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>), evidenciando que não há uma diferença significativa entre as conformações α -hélice e folha- β .

Figura 11 – Dicroísmo circular da AL.



Fonte: Autor. Espectro DC da AL, UV-distante 200-250 nm. A concentração da proteína foi de 5 μg em TBS/ CaCl_2 pH 7,6.

Figura 12 – Dicroísmo circular da AL.



Fonte: Autor. Espectro DC da AL, UV-distante 200-250 nm. A concentração da proteína foi de 5 µg em TBS/EDTA pH 7,6.

A técnica de DC não pode fornecer detalhes estruturais como outras de alta resolução, como é o caso de cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), mas pode fornecer uma boa estimativa da fração de resíduos na estrutura que estão envolvidos em α -hélice, folha- β e/ou formação desordenada. Muitos métodos (CONTIN-CD, SELCON, DICHROWEB, DICROPROT, K2D2) têm sido desenvolvidos para prever estrutura secundária de proteínas através do espectro de DC. Esses métodos estabelecem metodologias de estatística que usam combinações do espectro de DC da proteína alvo com proteínas que possuem estrutura terciária conhecida (MURAKAMI; RULLER, 2016).

3.10 Ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp

AL não mostrou efeito tóxico contra náuplios de *Artemia* sp através da observação de que todos os náuplios permaneceram vivos após inoculação com a lectina em várias concentrações.

Assim como a lectina AL, a lectina HMA isolada da esponja marinha *H. manglaris* não apresentou letalidade contra náuplios de *Artemia* na fase instar II (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O ensaio de letalidade em artêmia é útil como um teste preliminar da toxicidade potencial de moléculas biologicamente ativas (MELO, 2013).

3.11 Inibição da formação de biofilmes bacterianos

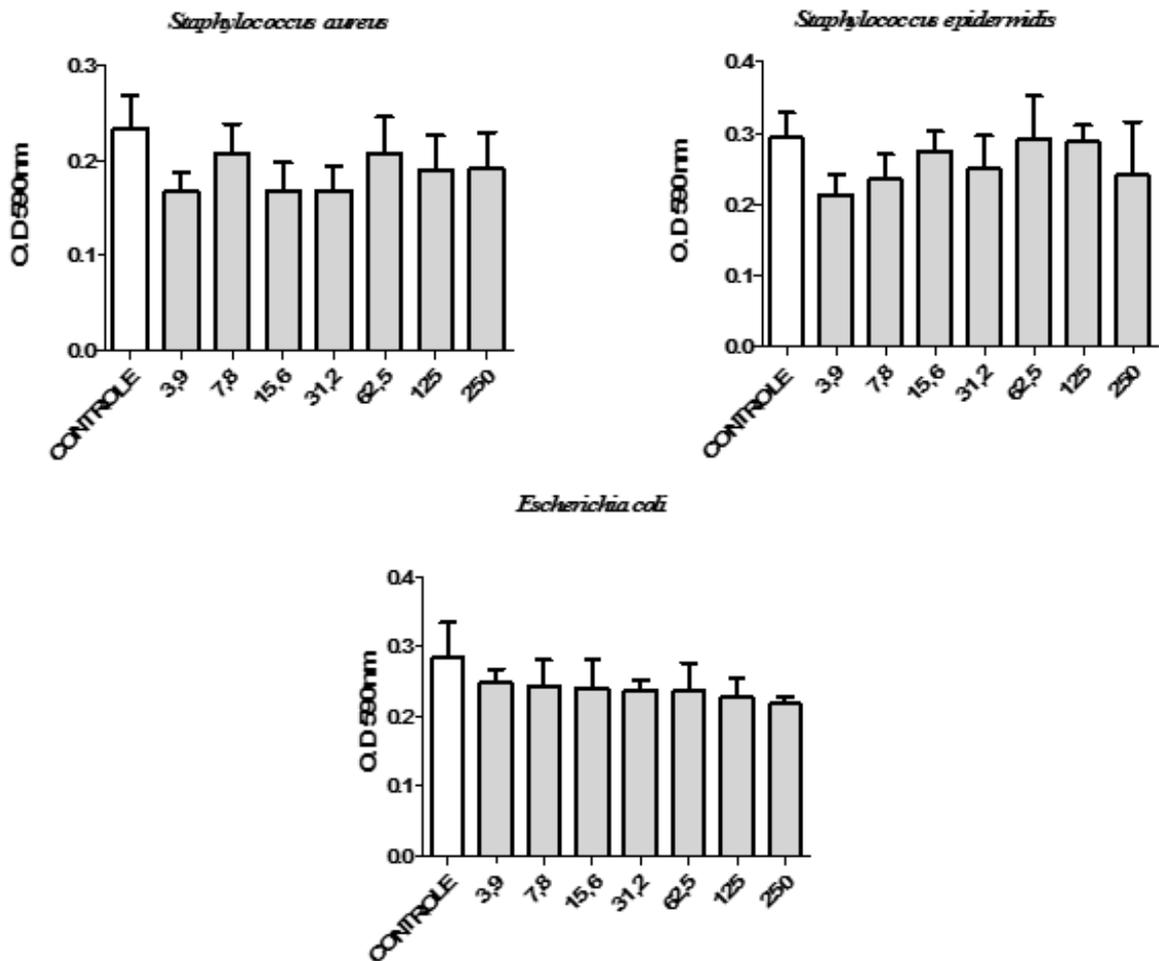
A capacidade de lectinas isoladas de organismos marinhos de inibir a formação do biofilme bacteriano vêm sendo relatada em vários trabalhos, como foi observado para as lectinas das algas marinhas *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Hypnea musciformis* (HML) que inibiram a formação do biofilme da bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* onde a BSL foi capaz de reduzir o biofilme em todas as concentrações e a HML reduziu apenas nas maiores concentrações, em relação a bactérias Gram negativas BSL e HML reduziram em diferentes potenciais o crescimento de biofilme da bactéria *Klebsiella oxytoca* (VASCONCELOS *et al.*, 2014), já a lectina presente nos ovos da *Aplysia dactylomela* (ADEL) inibiu a formação do biofilme apenas da bactéria *Staphylococcus aureus* (CARNEIRO *et al.*, 2017a) e a lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL) inibiu a formação tanto do biofilme da bactéria *Staphylococcus aureus* como da *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017b).

Entretanto, no presente trabalho de pesquisa foi evidenciado que AL não foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e nem da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Figura 13) e AL também não interferiu no crescimento planctônico das bactérias testadas.

Os mecanismos pelos quais as lectinas exercem a sua atividade não estão bem descritos, mas acredita-se que a sua atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorre através de interações entre a lectina com componentes da parede celular bacteriana, incluindo ácidos teicoico e teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (PAIVA *et al.*, 2010). Essa interação só é possível devido a habilidade das lectinas em reconhecer e interagir com carboidratos específicos.

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas, estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies que estão associadas a uma matriz extracelular composta por vários tipos de biopolímeros derivados do metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2011). Os biofilmes formam estruturas complexas e estudos mostram que eles são mais resistentes a antibióticos do que os micro-organismos na forma planctônica, assim os tratamentos terapêuticos contra biofilme são mais difíceis e limitado (VASCONCELOS, 2013). Por isso, é tão importante encontrar novos compostos, como por exemplo, as lectinas, que possam atuar como inibidores e também destruir a formação do biofilme bacteriano.

Figura 13 – Formação do biofilme bacteriano na presença de AL em diferentes concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Fonte: Autor. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

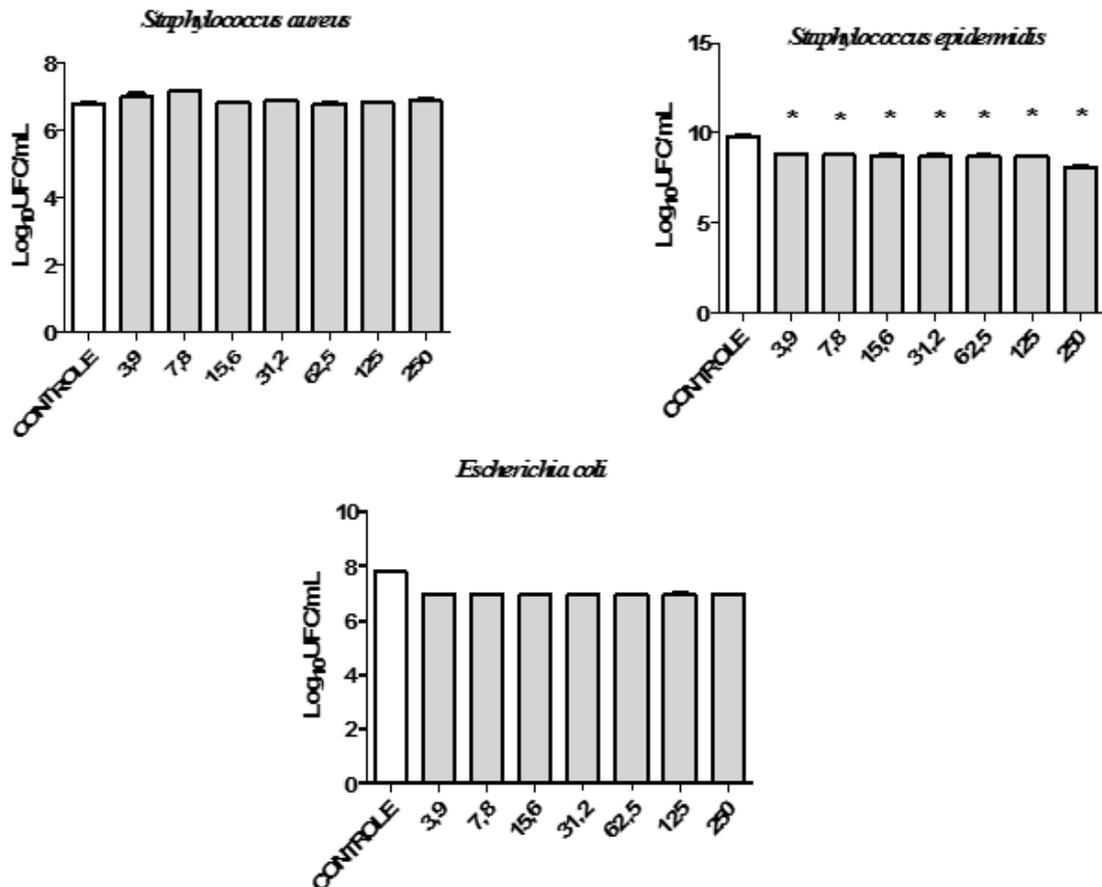
Após incubação dos micro-organismos com a lectina por 24 horas, o número de células foi avaliado e expresso o número total de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (Figura 14). Podemos observar que houve uma redução no número de células viáveis em todas as concentrações da lectina apenas na bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*.

Mesmo a lectina AL não reduzindo a biomassa do biofilme bacteriano, ela foi capaz de reduzir o número de células viáveis da bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

As lectinas BSL e HML também foram capazes de reduzir moderadamente o número de células viáveis, mas da bactéria *Staphylococcus aureus* (VASCONCELOS *et al.*, 2014), a lectina ADEL também reduziu o número de células viáveis da bactéria *Staphylococcus aureus* principalmente nas concentrações mais elevadas (CARNEIRO *et al.*, 2017a). Já a lectina

ALL foi capaz de reduzir o número de células viáveis tanto da *Staphylococcus aureus* como da *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017b).

Figura 14 – Efeito da lectina em diferentes concentrações no número de células viáveis expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹).



Fonte: Autor. * p <0,05 comparado com o controle.

Como dito anteriormente, as lectinas são moléculas importantes dessa forma é necessário mais investigações das suas funções fisiológicas, e do seu potencial como moléculas/ferramentas para novas aplicações biotecnológicas e médicas. E a descoberta de novas lectinas de esponjas é fundamental para que os estudos se intensifiquem e que mais funções fisiológicas e biológicas sejam descobertas.

4. CONCLUSÃO

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Aaptos* sp. foi purificada através da combinação das cromatografias de afinidade em goma de Guar e exclusão molecular. AL foi caracterizada bioquimicamente e comporta-se como uma proteína dependente de cálcio que aglutina eritrócitos de coelho nativo e tratado com enzimas, é inibida por galactosídeos, estável em pH neutro-alcálico e termolábil. Sua massa molecular determinada por MS foi de 13.655 ± 2 Da, não apresentando similaridade de sequência com qualquer outra proteína conhecida. A lectina é constituída de 28% de α -hélice, 26% de folha- β , e de 46% de região randômica. AL não apresentou toxicidade contra náuplios de artemia e nem inibição da formação do biofilme, mas foi capaz de reduzir o número de células viáveis da bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

Outros estudos podem ser realizados no sentido de se descobrir mais sobre a estrutura primária e terciária da proteína AL.

REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KOVACS, A.T.; KUIPERS, O.P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Netherlands , v. 22, p.172-179, april.2011.
- ALMEIDA, AS. **Purificação e caracterização de uma lectina ligada a um cromóforo da esponja marinha *Haliclona manglaris* ALCOLADO, 1984.** 2014. 51 p. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- 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 Science**, USA, v. 54, p. 396-399, 1965.
- BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, USA, v. 85, p. 160-169, 2006.
- BARONDES, S.H.. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, United Kingdom, v.13, n. 12, p. 480-482, 1988.
- BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.; GITT, M.A.; LEFFLER, H. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal Biological Chemistry**, USA, v.269, n.33, p.20807-20810, 1994.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **Journal of the American Chemical Society**, USA, v. 72, p. 2809–2810, 1950.
- BICKERSTAFF, M.C.M.; BOTTO, M.; HUTCHINSON, W.L.; HERBERT, J.; TENNET, G.A.; BYBEE, A.; MITCHELL, D.A.; COOK, H.T.; BUTLER, P.J.G.; WALPORT, M.J.; PEPYS, M.B. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. **Nature Medicine**, United Kingdom, v. 5, p. 694-697, 1999.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, USA, v. 119, p. 419, 1954.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, USA, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRETTING, H.; KABAT, E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, United Kingdom, v.15, p.3228-3236, 1976.

BRETTING, H.; KABAT, E.A.; LIAO, J.; PEREIRA, M.E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Aaptos papillata* and study of their combining sites. **Biochemistry**, United Kingdom, v.15, p. 5029-5038, 1976.

BRETTING, H.; PHILLIPS, S.G.; KLUMPART, H.J.; KABAT, E.A. A mitogenic lactose-binding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. **J. Immunol.**, USA, v.127, p.1652–1658, 1981.

CARNEIRO, R.F.; DE MELO, A.A.; NASCIMENTO, F.E.; SIMPLICIO, C.A.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R.M.; MOTA, S.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. 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, 2012.

CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; MOURA, R.M.; CHAVES, R.P.; SOUSA, B.L.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; LIMA, J.P.M.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, United Kingdom, v. 45, p. 2864– 2873, 2013.

CARNEIRO, R.F.; ALMEIDA, A.S.; MELO, A.A.; ALENCAR, D.B.; SOUSA, O.V.; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International Journal Biological Macromolecules**, Netherlands , v.72, p.1368-1375, 2015.

CARNEIRO, R.F.; TORRES, R.C.F.; CHAVES, R.P.; VASCONCELOS, M.A.; SOUSA, B.L.; GOUVEIA, A.C.R.; ARRUDA, F.V.; MATOS, M.N.C.; MATTHEWS-CASCON, H.; FREIRE, V.N.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; HOLANDA, A.S. Purification, Biochemical Characterization, and Amino Acid Sequence of a Novel Type of Lectin from *Aplysia dactylomela* Eggs with Antibacterial/Antibiofilm Potential. **Marine Biotechnol**, Germany, v. 19, p.49-64, 2017a.

CARNEIRO, R.F.; LIMA-JUNIOR, P.H.P.; CHAVES, R.P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A.L.; VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands , 2017b.

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

CHERNIKOV, O.V.; MOLCHANOVA, V.I.; CHIKALOVETS, I.V.; KONDRASHINA, A.S.; LI, W.; LUKYANOW, P.A. Lectins of Marine Hydrobionts. **Biochemistry**, Moscow, v.78, p.760-770, 2013.

COBO, L.B . Revisión taxonómica de la familia Suberitidae (Demospongiae: Suberitida) del Pacífico mexicano: marcadores morfológicos y moleculares. CONGRESO LATINO AMERICANO DE CIENCIAS DEL MAR – COLACMAR, 16., 2015, Santa Marta.

DRESCH, R.R.; ZANETI, G.D.; LERNER, C.B.; MOTHE, B.; TRINDADE, V.M.T.; HENRIQUES, A.T.; HAMPE, M.M.V. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Comp. Biochem. Phys.**, Netherlands, v.148, p.23-30, 2008.

DRESCH, R.R.; LERNER, C.B.; MOTHE, B.; TRINDADE, V.M.T.; HENRIQUES, A.T.; VOZARI-HAMPE, M.M.; Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comp. Biochem. Phys.**, Netherlands, v. 161, p. 365-370, 2012.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v.263, n. 21, p. 9557-9560, 1988.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺ dependent animal lectins. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 45, p. 207-232, 1993.

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

ENGEL, M.; BACHMANN, M.; SCHRODER, H.C.; RINKEVICH, B.; KLJAJIC, Z.; UHLENBRUCK, G.; MULLER, W.E.G. A novel galactose and arabinose specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, Netherlands, v.74, p.527-537, 1992.

FUJII, Y.; FUJIWARA, T.; KOIDE, Y.; HASAN, I.; SUGAWARA, S.; RAJIA, S.; KAWSAR, S.M.A.; YAMAMOTO, D.; ARAKI, D.; KANALY, R.A.; OGAWA, Y.; FUJITA, H.; OZEKI, Y. Internalization of a novel, huge lectin from *Ibacus novemdentatus* (slipper lobster) induces apoptosis of mammalian cancer cells. **Glycoconj J**, Netherlands, v.34, p.85-94, 2017.

GARDÉRES, J.; KONDRACKI, M.L.B.; HAMER, B.; BATEL, R.; SCHRÖDER, H.C.; MULLER, W.E.G. Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. **Marine Drugs**, Switzerland, v.13, p. 5059-5101, 2015.

GARDÉRES, J.; DOMART-COULON, I.; MARIE, A.; HAMER, B.; BATEL, R.; MULLER, W.E.G.; BOURGUET-KONDRACKI, M.L. Purification and partial characterization of a lectin protein complex, the clathrilectin, from the calcareous sponge *Clathrina clathrus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B, Netherlands, v.200, p.17-27, 2016.

GOMES FILHO, S.M.; CARDOSO, J.D.; ANAYA, K.; NASCIMENTO, E.S.; LACERDA, J.T.J.G.; MIOSO, R.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.A. Marine Sponge Lectins: Actual Status on Properties and Biological Activities. **Molecules**, Switzerland, v. 20, 348-357, 2015.

GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.G.S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A.B.; FERREIRA, A.G.; SANCTIS, B.; FREITAS, J.C.; HAJDU, E.; MIGOTTO, A.E. Produtos naturais das esponjas marinhas *Aaptos* sp., *Hymeniacion* aff. *Heliophila*, e do nudibrânquio *Doris* aff. *verrucosa*. **Química Nova**, Brasil, v.23(5), p.594-599, 2000.

GUNDAKER, D.; LEYS, S. P.; SCHRODER, H. C.; MULLER, I. M.; MULLER, W. E. G.; Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus* a putative aggregation factor. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 11, p. 21-29, 2001.

HAMMARSTROM, S.; KABAT, E.A. Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. **Biochemistry**, United Kingdom, v. 8, p. 2696–2705, 1969.

HANISCH, F.G.; BALDUS, S.E.; KÜMMEL, T.A. Forssman disaccharide is the specific ligand of a galectin from the sponge *Geodia cydonium* but does not mediate its binding to nuclear protein np56. **Glycobiology**, United Kingdom, v.6, p.321–336, 1996.

HENTSCHEL, U.; USHER, K. M., TAYLOR, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. **Microbiology Ecology**, Germany, v.55, p.167-177, 2006.

HICKMAN, Cleveland P; ROBERTS, Larry S; LARSON, Allan. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846 p.

HOFRICHTER, R.; SIDRI, M. (2001) ‘‘Ein Mittel für jeden Zweck: der Badeschwamm’’. In: Das Mittelmeer Flora, Fauna, Ökologie, ed. SpektrumVerlag, 2001. p. 608–809.

ISHITSUKA, R.; KOJIMA, K.; UTSUMI, H.; OGAWA, H.; MATSUMOTO, I. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V e VI. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 273, n. 16, p. 9935-9941, 1998.

ITIN, C.; ROCHE, A.C.; MONSIGNY, M.; HAURI, H.P. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. **Mol Biol Cell**, USA, v. 7, p .483–493, 1996.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R. Purification and characterization of a lectin from marine sponge *Halicondria panicea*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Japan, v. 56, n. 7, p. 1159, 1990.

KAWAGISHI, N.G.; YAMAWAKI, M.; ISOBE, S.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S.; Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*; an N-acetyl-sugar specific lectin (HOL-I) and N-acetyllactosamine specific lectin (HOL-II). **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 269, n. 2, p. 1375-1379, 1994.

KAWSAR, S.M.A.; FUJII, Y.; MATSUMOTO, R.; ICHIKAWA, T.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTAK.; HAMAKO, J.; MATSUI, T. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a d-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. **Comp. Bio. And Phys.**, Netherlands, v.150, p.349-357, 2008.

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

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

KIM, G.H.; KLOCHKOVA, T.A.; YOON, K.S.; SONG, Y.S.; LEE, K.P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumose* (chlorophyta). **J. Phycol**, USA, v.42, p.86-95, 2005.

LAEMMLI, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, United Kingdom, v.227, p.680–683, 1970.

LEE, J.K.; BAUM, L.G.; MOREMEN, K.; PIERCE, M. The X-lectins: A new family with homology to the *Xenopus laevis* oocyte lectin XL-35. **Glycoconjugate Journal**, Netherlands, v. 21, p. 443–450, 2004.

MA, T.H.T.; TIU, S.H.K.; HE, J.G.; CHAN, S.M.; Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. **Fish and Shellfish Immunology**, USA, v.23, p. 430-437, 2007.

MARCHALONIS, J.J.; EDELMAN, G.M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. **J. Mol. Biol.**, USA, v. 32, p. 453–465, 1968.

MEDEIROS, D.S.; MEDEIROS, T.L.; RIBEIRO, J.K.C.; MONTEIRO N.K.V.; MIGLIOLO, L.; UCHOA, A.F.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, A.S.; SALES, M.P.; SANTOS, E.A. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. **Comp. Biochem. Phys.**, Netherlands, v. 155, p. 211-217, 2010.

MELO, A.A. **Purificação, caracterização e ensaios biológicos de uma nova lectina do pepino-do-mar *Holothuria grisea* e de uma GFP-like do zoantídeo *Protopalathoa variabilis***. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MELO, A. A.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, W.M.; MOURA, R.M.; SILVA, G.C.; SOUSA, O.V.; SABOYA, J.P.S.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands, v. 64, p. 435-442, 2014.

MIARONS, P.B.; FRESNO, M.; Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v.275, n.38, p.29283-29289, 2000.

MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Netherlands, v. 56, p. 491-509, 2004.

MORI, T.; O'KEEFE.; SOWDER, R.C.; BRIGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; TURPING, J.A.; BUCKHEIT JR, R.W.; McMAHON, J.B.; BOYD, M.R. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia sp.* **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 280, n. 10, p. 9345-9353, 2005.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M. S. L. L.; DIAS, A. S. F.; MONTEIRO, N. K. V.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and effects on pathogenic bacteria and

Leshimanis promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A., Netherlands, v. 145, p. 517-523, 2006.

MULLER, W.E.G.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; LUCU, C.; MULLER, I.; UHLENBRUCH, G. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponge. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 45, n. 1, p. 548-558, 1981.

MURAKAMI, L.M.Z.; RULLER, R. Uso da técnica de Dicroísmo Circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. CNPEM, Memorando Técnico, 2016.

MURICY, G; HAJDU, E; OLIVEIRA, M.V; HEIM, A.S; COSTA, R.N; LOPES, D.A; MELÃO, M; RODRIGUEZ, P.R.D; SILVANO, R.G; MONTEIRO, L.C; SANTOS, C.P. **Filo Porifera**. In Atlas de invertebrados marinhos da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira - Parte 1 (H.P. Lavrado & M.S. Viana, org.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2007. 25-57 p.

NAGANO, C.S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K.S.; PINTO, V.P.; CAVADA, B.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.; SAMPAIO, A.H.; CALVETE, J.J.. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, USA, v. 14, n. 8, p. 2167-2176, ago. 2005.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, USA, v. 20, 462–466, 1960.

ODOM, E. W. **F-Type Lectins: Biochemical, Genetic and Structural Characterization of a Novel Lectin Family in Lower Vertebrates**. 2004. PhD thesis. University of Maryland College Park, MD, 2004.

OLAFSEN, J.A. Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. **Adv. Comp. Environ. Physiol.**, United Kingdom, v. 24, p. 49–76, 1996.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Spain, vol. 1, p. 396–406, 2010.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the marine sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Netherlands, v. 132, p. 213-221, 2002.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, USA, v.109, n. 2, p. 347-352, out. 1995.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas—current status and microbiological implications. **Appl Microbiol Biotechnol**, Germany, v.59, 125–134, 2002.

QUEIROZ, F.S.A.; MOURA, R.M.; RIBEIRO, J. K. C.; LYRA, I. L.; CUNHA, D.C.S.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Netherlands, v. 147, p. 216-221, 2008.

RABELO, L.; MONTEIRO, N.; SERQUIZ, R.; SANTOS, P.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, A.; ROCHA, H.; MORAIS, A. H.; UCHOA, A.; SANTOS, E. A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**, Switzerland, v. 10, p. 727-743, 2012.

RAYNAL, P; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v. 1197 (1), p. 63-93, 1994.

RENWRANTZ, L. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. **Symp. Zool. Soc. London**, London, v.56, p.81-93, 1986.

SAMPAIO, A.H. Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species.1997.191p. **Ph.D. Thesis**. University of Portsmouth, Inglaterra, 1997.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 48, 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 plumose*. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, . v. 14, p.489-495, 2002.

SANG VO, T.; HUNG NGO, D.; VAN TA, Q.; KWON KIM, S. Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlands, v.44, p. 11-20, 2011.

SCHRODER, K. Die Verwendung der Susswasserschwamme in der Ukraine. **Die Umschau Wissenschaft Technik**, v.46, p. 507-509, 1942.

SCHRÖDER, H.C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N.L.; DIEHL-SEIFERT, 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*. **J. Biol. Chem.**, USA, v.278, p. 32810-32817, 2003.

SCHWARTSMANN, G. Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. **Ann Oncol**, United Kingdom, v. 11, 235-243, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, USA, v. 177, p. 949-959, 1972

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

- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, United Kingdom, v. 1(6), p. 2856-2861, 2007.
- SIPKEMA, D.; FRANSSSEN, M.C.R.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Marine sponges as pharmacy. **Marine Biotechnology**, Germany, v. 7, p. 142-162, 2005.
- SUGAHARA, T.; OHAMA, Y.; FUKUDA, A.; HAYASHI, M.; KAWAKUBO, A.; KATO, K. The cytotoxic effect of Eucheuma serra agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, Netherlands, v. 36, p. 93-99, 2001.
- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.**, USA, v.32, p.227-237, 1936.
- SPRINGER, G.F.; DESAI, P.R. Monosaccharides as specific precipitinogens of eel anti-human blood group H (O) antibody. **Biochemistry**, United Kingdom, v.10, p.3749-3760, 1971.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, Netherlands, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.
- SWAIRJO, M.A.; SEATON, B.A. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v. 23, p. 193-213, 1994.
- TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H.; SANEYOSHI, M. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Japan, v. 66, p. 604-612, 2002.
- TEICHBERG, V.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; RESHEFF, G. A b-D galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, USA, v. 72, p. 1383-1387, 1975.
- TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; OLIVEIRA, T.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SOUZA, J.B.; HAVT, A.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; FARIAS, W.R.L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001-1006, 2007.
- TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; ONO, M.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; NAKAMURA, O.; SUZUKI, Y.; WATANABE, T. A new type of lectin discovered in a fish, flathead (*Platycephalus indicus*), suggests an alternative functional role for mammalian plasma kallikrein. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 21 (12), p. 1580-1587, 2011.
- UEDA, T.; NAKAMURA, Y.; SMITH, C.M.; COPITS, B.A.; INOUE, A.; OJIMA, T.; MATSUNAGA, S.; SAKAI, R.; SWANSON, G.T. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, United Kingdom v.23, p.412-425, 2013.

- VASCONCELOS, M.A. **Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 2013. 267p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; SILVA, H.C.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.; TEIXEIRA, E.H.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M.O. Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **BioMed Research International**, p.9, 2014.
- VASTA, G.R.; AHMED, H.; FINK, N.E.; ELOLA, M.T.; MARSH, A.G.; SNOWDEN, A.; ODOM, E.W. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** New York, v. 712, p.55–73, 1994.
- VASTA, Gerardo R; AHMED, Hafiz,. **Animal lectins: A functional View**. New York: CRC Press, 2008. 596 p.
- WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, United Kingdom, v.169, p.825–826, 1952.
- WEIS, W.I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W.A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, USA, v. 254, p. 1608–1615, 1991.
- WHITMORE, L.; WALLACE B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, USA, v.89, p.392–400, 2008.
- WIENS, M.; BELIKOV, S.I.; KALUZHNYAYA, O.V.; KRASKO, A.; SCHRODER, H.C.; OTTSATADT, S.P.; MULLER, W.E.G. Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins mannose-binding lectin and mago nasshi. **Dev. Genes Evol**, Germany, v. 216, p. 229-242, 2006.
- WILLIAMS, D.B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmatic reticulum. **Journal of Cell Science**, United Kingdom, v.119, p.615-623, 2006.
- WILKINSON, C. R. 1987. Interocean differences in size and nutricion of coral reef sponge populations. **Science**, USA, v. 236, p.1654-1657.
- XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Netherlands, v. 143, p. 9–16, 2006.
- ZELENSKY, A.N.; GREASY, J.E. The C-type lectin-like superfamily. **FEBS Journal**, USA, v.272, p.6179-61217, 2005.