



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS ÀGRARIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ANA KAROLINE FLORINDO RIBEIRO

**ISOLAMENTO PARCIAL E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DA ESPONJA MARINHA *Geodia* sp.**

FORTALEZA

2022

ANA KAROLINE FLORINDO RIBEIRO

ISOLAMENTO PARCIAL E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DA ESPONJA MARINHA *Geodia* sp.

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

FORTALEZA
2022

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

R367i Ribeiro, Ana Karoline Florindo.
Isolamento parcial e identificação de peptídeos de uma lectina extraída da esponja marinha *Geodia* sp. /
Ana Karoline Florindo Ribeiro. – 2022.
30 f. : il. color.

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

1. Esponja. 2. Lectina. 3. Peptídeos. 4. Estrutura primária. I. Título.

CDD 639.2

ANA KAROLINE FLORINDO RIBEIRO

ISOLAMENTO PARCIAL E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DE UMA ESPONJA MARINHA *Geodia sp*

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia marinha.

Aprovada em: 06/12/2022

BANCA EXAMINADORA

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

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

MSc. Andressa Rocha de Oliveira Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e a minha família, por estarem comigo durante todos os momentos dessa caminhada. Especialmente aos meus pais, Cláudio e Ivonete, e minha irmã Sofia, que são um grande suporte e pilar de apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pela oportunidade de entrar no laboratório de biotecnologia marinha, e assim aumentar meu aprendizado nessa área, além das orientações, ensinamentos e experiências compartilhadas que se tornaram fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Rômulo Farias pelo ensino, oportunidade de repassar seu conhecimento e orientação para os alunos. À Dra. Renata Pinheiro por sua vivência, ensinamentos, e auxílio quando necessário.

Ao Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio e a MSc. Andressa Sousa por cederem tempo e disposição para fazerem parte da minha banca avaliadora.

Ao Renato, por toda sua paciência em me ensinar e me avaliar durante esse ciclo, sempre corrigindo nossos pontos fracos e destacando nossos pontos fortes com clareza, estando disponível e acessível com muita atenção e dedicação. Muito obrigada.

À minha tia Kelly Ribeiro que tinha o sonho de me vê graduada, e que estaria muito feliz com o fim desse ciclo e o começo de um novo.

Um agradecimento especial aos amigos que fiz durante a graduação. Sued Ramos, Hortência Soares, Pedro Arthur, Gabriel Cândido, em meio a brigas, risos, preocupações, ou horas de estudos, vocês acreditaram em mim e estiveram ao meu lado durante essa caminhada, tornando tudo um pouco mais leve. Levarei nossos momentos eternamente.

Agradeço aos meus companheiros de bancada Israel Ferreira, Elany Rodrigues, Aline Costa, Philippe, Jessica Duarte, Vinicius, Pedro Abilio, Levi Oton entre outros, pelos momentos de descontração e auxílio que proporcionaram dentro e fora do laboratório.

Aos demais amigos que fiz durante os anos de curso, Carla Bruna, Lídia Correia, Thifany Saldanha, Marcus Vinicius, Camyla Costa, Mayara Sá, Gabriel Lourenço que tornaram essa jornada um pouco menos difícil e bem mais feliz.

“A persistência é o menor caminho para o êxito” – Charles Chaplin.

RESUMO

Os organismos do filo Porífera abrangem mais de 9400 espécies de animais. São conhecidos por serem filtradores e sésseis, e se encontram, em sua maior parte, em habitat marinho. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de maneira específica e reversível. Nas esponjas marinhas, as lectinas podem desempenhar diversas funções como: interação celular, espiculogênese e defesa. Além disso, podem apresentar um grande potencial biotecnológico devido a sua capacidade de reconhecer carboidratos específicos localizados na membrana celular e apresentarem diversas bioatividades, tais como: atividades antibacteriana, antitumoral e anti-inflamatória. A estrutura primária das lectinas pode fornecer informações importantes como a sua função fisiológica em um organismo, além de poder classificá-la quanto à sua família estrutural. O objetivo desse trabalho foi isolar e sequenciar os peptídeos de uma lectina presente na esponja *Geodia* sp. A lectina foi parcialmente isolada a partir da combinação de precipitação com sulfato de amônio a 70% e cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B. A lectina exibiu atividade hemaglutinante contra eritrócitos nativos e tripsinizados de coelho. Em SDS-PAGE, apresentou uma banda de aproximadamente 30 kDa em condições não-redutoras. A lectina extraída da *Geodia* sp. foi submetida à digestão proteica, e os peptídeos gerados foram analisados através da espectrometria de massas sequencial, obtendo um total de 5 peptídeos relevantes. As sequências obtidas não apresentaram similaridade quando comparado aos dos bancos de dados.

Palavras-chave: esponja; lectina, peptídeos, estrutura primária.

ABSTRACT

The organisms of the phylum Porifera comprise more than 9400 species of animals. They are known to be filter feeders and sessile animals, and they are mostly found in marine habitats. Lectins are proteins that bind to carbohydrates in a specific and reversible manner. In marine sponges, lectins can perform several functions such as: cell interaction, spiculogenesis and defense. In addition, they may have great biotechnological potential due to their ability to recognize specific carbohydrates located on the cell membrane and to present several bioactivities, such as: antibacterial, antitumor and anti-inflammatory activities. The primary structure of lectins can provide important information such as their physiological function in an organism, in addition to being able to classify them according to their structural family. The objective of this work was to isolate and sequence the peptides of a lectin present in the sponge *Geodia* sp. The lectin was partially isolated from the combination of 70% ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography on a Sepharose-4B column. The lectin exhibited hemagglutinating activity against native and trypsinized rabbit erythrocytes. On SDS-PAGE, it showed a band of approximately 30 kDa under non-reducing conditions. The lectin extracted from *Geodia* sp was submitted to protein digestion, and the generated peptides were analyzed through sequential mass spectrometry, obtaining a total of 5 relevant peptides. The sequences obtained did not show similarity when compared to those from the databases.

Keywords: sponge; lectin, peptides, primary structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B da fração 0-70	20
Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) da lectina de <i>Geodia</i> sp na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	22
Figura 3 – Espectro de fragmentação do peptídeo T4 da lectina de <i>Geodia</i> sp	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante do extrato bruto da esponja marinha <i>Geodia sp.</i> contra eritrócitos humanos e de coelhos (U.H./mL)	21
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante do P2 extraído da esponja marinha <i>Geodia sp.</i> contra eritrócitos humanos e de coelhos (U.H/mL)	22
Tabela 3 – Sequência dos peptídeos trípticos da lectina de <i>Geodia sp.</i>	23

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	Esponjas	11
1.2	Lectinas	13
1.2.1	<i>Definição</i>	13
1.2.2	<i>Lectina animais</i>	13
1.2.3	<i>Lectinas de esponjas</i>	14
1.3	Caracterização estrutural de lectinas	15
2.	METODOLOGIA	17
2.1	Coleta dos organismos	17
2.2	Preparo do extrato	17
2.3	Isolamento parcial da lectina	17
2.4	Caracterização bioquímica	18
2.4.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	18
2.4.2	<i>Avaliação da pureza da proteína e a estimativa da massa molecular</i>	18
2.5	Sequenciamento de peptídeos	18
2.5.1	<i>Obtenção da sequência de aminoácidos e busca por similaridade</i>	18
3	RESULTADOS	20
3.1	Purificação da lectina	20
3.2	Caracterização bioquímica	21
3.2.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	21
3.2.2	<i>Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE</i>	22
3.2.3	<i>Sequência de aminoácidos dos peptídeos trípticos da lectina de Geodia sp.....</i>	23
4	DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

As esponjas, pertencentes ao filo Porifera, são os animais multicelulares mais antigos, além de serem filtradores sésseis e bentônicos (YANG *et al.*, 2017). Em sua forma mais simples, uma esponja é uma bolsa perfurada, suficientemente rígida, cuja superfície interna é revestida com células flageladas. Devido à ausência de músculos, nervos e corpos deformáveis, as esponjas são completamente dependentes do fluxo da água para a alimentação, trocas gasosas e remoção de resíduos, bem como disseminação e coleta de espermatozoides. Devido a atividade dos coanócitos e a arquitetura da esponja, a água flui para o espongiocelo através de aberturas estreitas (ostíolos) e sai dele através de aberturas mais largas (ósculos) (PECHENIK, 2016).

Com base nos estudos filogenéticos moleculares, o filo Porifera é dividido em quatro classes: Hexactinellida, Demospongiae, Homoscleromorpha e Calcarea (AGUILAR-CAMACHO; DOONAN; MCCORMAK, 2019). A classe Demospongiae contém aproximadamente 80% de todas as espécies de esponjas, são de construção leuconoide, suas espículas e fibras de sustentação podem ser compostas por espongina e/ou sílica, além disso, quase todas as esponjas de água doce pertencem a essa classe (PECHENIK, 2016).

A maioria das mais de 9.400 espécies de esponjas que foram descobertas é marinha, e abundante em todos os mares e em todas as profundidades. Em habitats marinhos, elas são altamente diversas e desempenham papéis importantes na bioquímica marinha, na estruturação do fundo do mar e no acoplamento bêntico-pelágico da transferência de nutrientes dentro dos ecossistemas oceânicos, pois participam de interações bióticas complexas com diversos táxons microbióticos e comunidades microbiológicas (YANG *et al.*, 2017; VAN SOEST *et al.*, 2022). Com o passar dos anos, houve um aumento na atenção dos químicos de produtos naturais para as esponjas, como fontes de novos compostos químicos produzidos por determinadas espécies (PECHENIK, 2016, CARNEIRO *et al.*, 2017).

Produtos variados de esponjas, especificamente, já obtiveram vários resultados positivos quanto a esse tema, e têm propriedades farmacológicas comprovadas, como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antimalárica, antitumoral, imunossupressora e cardiovascular (UL HASSAN; SHAIKH, 2017).

Algumas espécies do gênero *Geodia* vêm apresentando dados importantes de atividades biotecnológicas ao longo dos anos. Extratos orgânicos de *Geodia cydonium* foi capaz de bloquear a proliferação das linhagens celulares de câncer de mama e induzir apoptose celular, além de obter uma leve atividade antiinflamatória (CONSTATINI *et al.*, 2017). Em *G. barretti* alguns compostos isolados exibiram potencial antiflamatório (DI *et al.*, 2018).

Portanto, a importância das esponjas para fins biotecnológicos é notória, contudo, o número de espécies estudadas ainda é bastante incipiente se comparado ao número de espécies existentes.

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição

A introdução do termo lectina, do latim “*legere*” que significa captar ou escolher, teve como objetivo descrever uma classe de proteínas de origem vegetal que aglutinam células, e/ou precipitam polissacarídeos e glicoconjugados, onde exibem especificidade de ligação a açúcar (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

No início, foram denominadas de fitohemaglutininas ou fitoaglutininas já que inicialmente, a capacidade de aglutinar eritrócitos era proveniente do extrato das plantas, porém essas mesmas proteínas foram sendo descobertas em outros organismos (SHARON; LIS, 2004).

A definição de lectina continuou a evoluir, atualmente, pode ser definida como: lectina é uma proteína ou glicoproteína, de origem não imune, com pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidrato. A ligação da proteína aos carboidratos, no entanto, não envolve modificação enzimática (KILPATRICK, 2000; LUDWIG *et al.*, 2019).

Na década de 1960, houveram duas grandes descobertas. Primeiramente foi revelado que a lectina PHA (*Phaseolus vulgaris agglutinin*) oriunda do feijão vermelho demonstrou atividade mitogênica sobre os linfócitos estimulando a mitose, onde até então se acreditava que as células não poderiam ser induzidas a se dividir ou se diferenciar (NOWELL, 1960). A segunda e não menos importante descoberta foi a lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*) encontrada no gérmen de trigo, que tinha capacidade de aglutinar células malignas, o que impulsionou aos estudos de lectinas contra o câncer (AUB; SANFORD; COTE, 1965).

Outra relevante descoberta foi realizada em 1989, onde as lectinas ligantes de manana (MBL's) exibiram atividade de opsonina plasmática para a levedura de panificação e assim várias lectinas foram caracterizadas bioquimicamente se tornando uma das mais estudadas da época (KILPATRICK, 2002).

As aglutinações específicas para cada tipo sanguíneo também foi uma descoberta crucial para as primeiras investigações sobre a especificidade da lectina associadas com o sistema de grupos sanguíneos ABO (SHARON; LIS, 2004).

1.2.2 Lectinas animais

No artigo escrito por Mitchell e Reichert em 1886 sobre o veneno de cascavel, havia uma descrição sobre aglutinação. Este, provavelmente, foi o primeiro relato a descrever a atividade de uma lectina de origem animal. Diversos estudos sobre o veneno de cobra foram investigados nos anos seguintes, porém, apenas em 1980, a espécie de cobra *Bothrops atrox*, teve sua lectina extraída e purificada, denominada de trombolectina (GARTNET; STOCKER; WILLIAMS, 1980).

A primeira lectina de origem animal específica ao grupo sanguíneo A foi encontrada em um molusco em 1960, e logo após foi seguido de novos relatos de lectinas anti-A no caracol *Helix pomatia* e em espécies relacionadas. Essas lectinas provenientes do caracol estão entre os reagentes anti-A mais específicos disponíveis, e vêm sendo amplamente utilizada para grupos sanguíneos e outras aplicações (KILLPATRICK, 2000). Algumas lectinas foram encontradas em moluscos como ABO não específicas, em ovos de anfíbios como anti-A e, posteriormente, em caranguejos-ferradura. Além disso, foi encontrada uma lectina anti-I das gônadas de *Aplysia depilans* (KILLPATRICK, 2002). Lectinas anti-B altamente específicas foram isoladas dos caranguejos *Scylla serrata* e *Charybdis japonica*, enquanto uma lectina do tunicado *Didemnum candidum* é específica para células do grupo B tratadas com pronase (KILLPATRICK, 2000).

Com o passar dos anos, diversas lectinas de animais foram sendo isoladas e se tornaram alvo de análises e estudos. Uma lectina isolada do camarão *Metapenaeus monóceros*, MmLec, exibiu aglutinação de eritrócitos humanos e mostrou potencial anticancerígeno (PREETHAM *et al.*, 2019). A Es-lec, lectina isolada do peixe *Etroplus suratensis* aglutinou eritrócitos humanos, exibindo atividade antibacteriana contra as bactérias Gram negativas *Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas hydrophila*, potencial antibiofilme contra bactérias

Gram negativas e também apresentou atividade antiviral e anticancerígena (RUBEENA *et al.*, 2019). Outro exemplo é a lectina isolada do caranguejo de água doce *Lamella lamellifrons* que apresentou alta aglutinação para eritrócitos de coelho (BAI; ROSE, 2020).

1.2.3 Lectinas de esponjas

A primeira descrição de lectina de esponja marinha foi realizada por DODD *et al.* (1968) através das espécies *Cliona celata* e *Axinella sp.* Mais tarde, Mebs e colaboradores avaliaram a capacidade de hemaglutinação de diversas esponjas coletadas no Mar Vermelho, na Barreira de Corais da Austrália e Florida Keys. Os resultados mostraram que 42% das espécies estudadas possuíam lectinas capazes de aglutinar eritrócitos humanos (MEBS; WEILER; HEINKE; 1985). Mais de uma década depois, 22 espécies de 12 famílias de esponjas tropicais foram analisadas, e foi encontrada atividade aglutinante em 10 das espécies testadas (MIARONS; FRESNO; 2000).

As lectinas de esponjas marinhas podem estar envolvidas na autodefesa do organismo, uma vez que diversas dessas proteínas são capazes de reconhecer, aglutinar e inibir o crescimento de células bacterianas e biofilmes (GARDERES *et al.*, 2015). Assim como outras moléculas derivadas de organismos marinhos, as lectinas de esponjas marinhas também foram estudadas por sua toxicidade contra alguns tipos de células de importância biomédica (PAJIC *et al.*, 2002). Uma das respostas celulares mais marcantes induzidas por lectinas é a capacidade de estimular a mitose. As lectinas das esponjas marinhas *Axinella corrugata* (ACL-1), *Craniella australiensis* (CAL), *Cinachyrella alloclada* (CAIL) e uma lectina extraída da *Pellina semitubulosa* foram capazes de estimular a mitose em células mononucleares humanas, esplenócitos e linfócitos de camundongos e humanos, respectivamente (XIONG *et al.*, 2006; ENGEL *et al.*, 1992; DRESCH *et al.*, 2012).

Recentemente, as lectinas de esponjas têm sido objeto de estudos de atividade antimicrobiana. A CCL, lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, exibiu atividade aglutinante contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, além disso apresentou capacidade de redução de biomassa do biofilme bacteriano (MARQUES *et al.*, 2018). A AFL (*Aplysina fulva lectin*) mostrou também uma significativa diminuição de biomassa do biofilme das bactérias, *S. aureus*, *S. epidermidis*, e *E. coli* (CARNEIRO *et al.*, 2019). A ALL (*Aplysina lactuca lectin*) demonstrou atividade aglutinante com células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, e foi capaz de reduzir

significativamente a biomassa do biofilme bacteriano testado com efeito de dose-dependente (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Outra atividade das lectinas em destaque é seu potencial anticancerígeno. Algumas lectinas podem interferir potencialmente nas propriedades metastáticas das células tumorais, fato que tem sido atribuído à sua capacidade de se ligar a carboidratos associados ao tumor (SANCHEZ-RUDERISCH *et al.*, 2011). A halilectina-3 (H3) é uma lectina de ligação à mucina isolada da esponja marinha *Haliclona caerulea*. H3 mostrou induzir apoptose e autofagia na linhagem de células de câncer de mama humano MCF7 (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018). A lectina (CVL) purificada da esponja marinha *Cliona varians*, possui efeito antileucêmico (QUEIROZ *et al.*, 2009). Além disso, um outro estudo realizado com uma lectina tipo C de *Aphrocallistes vastus* (AVL), onde o gene que codifica AVL foi inserido em um vetor de vírus vaccinia oncolítico (oncoVV) para formar um vírus recombinante oncoVV-AVL, mostrou significativa atividade antiproliferativa *in vitro* em uma variedade de linhagens de células cancerígenas (WU *et al.*, 2019).

1.3 Caracterização estrutural de lectinas

A importância da caracterização estrutural das lectinas se dá, porque resolver a estrutura primária leva a uma compreensão dos papéis fisiológicos dentro de um organismo e seu potencial biotecnológico (SOUSA *et al.*, 2021).

As lectinas de esponja foram classificadas nas famílias de: galectinas, tipo-C e tachylectinas. Porém várias lectinas ainda não possuem classificação, visto que muitas ainda precisam de mais estudos para inclui-las em novas ou já existentes famílias (GARDÉRES *et al.*, 2015).

Essas proteínas são classificadas por suas propriedades físico-químicas e estruturais, principalmente levando em consideração sua estrutura primária. As galectinas ou lectinas tipo S são exclusivas ao reino animal e apresentam preferência para resíduos de galactosídeo. Elas podem criar grandes moléculas na presença de Ca^{2+} não envolvido na ligação de carboidratos e mostram uma extrema afinidade por sacarídeos contendo *N*-acetil-galactosamina (WANG *et al.*, 2020). Foi comprovado que as galectinas podem possuir diferentes funções, dependendo de sua estrutura e localização, podendo exibir uma combinação de atividades intracelulares e extracelulares como: diferenciação celular, organização tecidual e resposta imune (SOUSA *et al.*, 2021). Essas proteínas têm sido intensamente estudadas e

acredita-se que elas desempenham um papel importante na adesão celular, regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência (GARDÈRES *et al.*, 2015).

As do tipo-C contêm um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos que compartilham uma série de elementos estruturais comuns altamente conservados entre as espécies. O mais importante é a presença de um íon cálcio no sítio de ligação que é obrigatório para a interação do açúcar. Porém, a família do tipo C, atualmente inclui outros membros com a capacidade de se ligar a carboidratos sem a ajuda de íons de cálcio, e até lectinas cujos substratos são proteínas ou lipídios (VALVERDE *et al.*, 2020). As lectinas tipo C não reconhecem apenas porções de patógenos para a defesa do hospedeiro, mas também autoantígenos modificados, como padrões moleculares associados a danos liderados por células mortas (DROUIN; SAENZ; CHIFFOLEAU, 2020).

As tachylectinas são proteínas que possuem moléculas de reconhecimento padrão que geralmente exibem atividade antimicrobiana contra procariotos, se ligando aos seus carboidratos de membrana. As tachylectinas são caracterizadas por seis repetições internas que formam domínios β -propulsores (GARDÈRES *et al.*, 2015; MALI *et al.*, 2006).

Apesar do notório potencial biotecnológico já demonstrado anteriormente, há poucos estudos estruturais sobre essas proteínas e apenas algumas lectinas de esponjas tiveram sua estrutura primária determinada. Após o estudo estrutural mais recente de Sousa e colaboradores (2021), contabiliza-se 9 esponjas com lectinas isoladas que obtiveram as suas estruturas primárias determinadas: *Cinachyrella* sp., *Geodia cydonium*, *Aphrocallistes vastus*, *Axinella polypoides*, *Lubomirskia baicalensis*, *Ephydatia fluviatilis*, *Suberites domuncula*, *Chondrilla caribensis* e *Haliclona caerulea* (SOUSA *et al.*, 2021). Portanto, ainda há muito a ser explorado em relação ao estudo estrutural de lectinas de esponjas, o que pode fornecer informações para um melhor entendimento de suas atividades biológicas (SOUSA *et al.*, 2021; CARNEIRO, 2013).

Fica evidente que o número de lectinas isoladas e caracterizadas em comparação ao número de espécies é relativamente baixo. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi a purificação e a caracterização estrutural de uma nova lectina proveniente da esponja marinha *Geodia* sp.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta dos organismos

Os espécimes da esponja marinha *Geodia* sp. foram coletados em um ponto de mergulho do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (03°35'19" S e 038°24'32" W), localizado no município de Fortaleza, litoral do Ceará. Os organismos foram armazenados em sacos plásticos, dentro de uma caixa térmica, transportados até o laboratório e, posteriormente, armazenados a -20°C para uso posterior. A coleta dos organismos foi previamente autorizada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-8).

2.2 Preparo do Extrato

As esponjas foram cortadas em pedaços pequenos e maceradas em tampão Tris-HCl 20mM, de pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20mM (TBS/Ca²⁺), na proporção 1:2 (p/v). Posteriormente, a mistura foi filtrada em tecido de nylon, para que as partículas maiores pudessem ficar retidas, e centrifugada à 9.000 x g, por 20 minutos, à 4°C. Em seguida, o precipitado foi descartado, e o sobrenadante armazenado para uso futuro foi denominado de extrato bruto. O acesso ao patrimônio genético do material biológico possui autorização e cadastro prévio através do SISGEN ID: A1792FE.

2.3 Isolamento parcial da lectina

Para a purificação, o extrato bruto foi submetido a uma precipitação com sulfato de amônio ((NH₄SO₄) a uma saturação de 70%, durante 4 horas, a uma temperatura de 4°C. Logo após esse processo, o material foi centrifugado a 9000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi suspenso em tampão TBS/Ca²⁺, pH 7,6, sendo denominado de fração 0-70. As amostras foram submetidas em cromatografia de afinidade, em coluna de Sepharose 4B (3,5 cm x 2,2 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl, pH 7,6 contendo NaCl 150mM e CaCl₂ 20mM. As frações adsorvidas foram eluídas com tampão glicina 50mM, pH 2,6 contendo 150mM de NaCl, e denominadas de P2, e foram monitoradas a uma absorvância de 280 nm.

2.4 Caracterização bioquímica

2.4.1 Atividade hemaglutinante

Os testes de hemaglutinação foram realizados com a utilização de eritrócitos humanos do sistema ABO e de coelho, nativos e tratados com enzimas proteolíticas. Os eritrócitos humanos foram obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), e os de coelho a partir de animais mantidos no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A utilização de animais foi previamente autorizada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Produção (CEUAP), sob o código 2211202101. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação, com fundo em formato “V”, a partir do método de diluições seriadas em duplicadas seguindo a metodologia padrão (SAMPAIO, *et al.*, 2002).

2.4.2 Avaliação da pureza da proteína e a estimativa da massa molecular

O grau de pureza da proteína alvo foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os géis foram sujeitos a uma tensão constante de 150V com duração de uma hora.

A massa molecular aparente da proteína alvo foi estimada, a partir do comparativo entre a migração da proteína contida no gel com a migração dos marcadores de massa molecular conhecida, constados no kit SigmaMarker™ low range (Sigma Aldrich, MO).

2.5 Sequenciamento de peptídeos

2.5.1 Obtenção das sequências de aminoácidos e busca por similaridade

Para a obtenção da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS), a fração retida da cromatografia foi digerida com a enzima proteolítica tripsina (1:50 E:S). As digestões foram realizadas a partir de bandas obtidas por SDS-PAGE conforme protocolo de Shevchenko *et al.* (2007) e em solução em bicarbonato de amônio 25mM na presença do surfactante Rapigest^(R) (0,1%) de acordo com o protocolo do fabricante (WATERS

CORPORATION, 2015). As reações foram mantidas a 37 ° C por 18 horas e após esse período foram interrompida com a adição de 5 µL de ácido trifluoroacético a 5%.

As digestões foram injetadas em uma coluna de fase reversa C18 (100 µm x 100 mm) em um sistema nanoAcquity (Waters Corporation, MA, EUA) e eluída com gradiente linear de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico. Os eluatos foram infundidos diretamente em uma fonte de nanoeletrospray no espectrômetro de massas (nESI-LC/MS).

O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de 50 a 3000 m/z , sob voltagem do capilar de 3,5 kV e temperatura da fonte de 363 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (Data Dependent Analysis – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga (z) entre 2+ e 4+, onde foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação.

Para a análise de dados os espectros coletados foram processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corporation). Os espectros de fragmentação interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters). Para as análises dos peptídeos sequenciados, a similaridade de sequência com proteínas conhecidas foi avaliada online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) usando o BLASTp com o banco de dados disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (MADDEN, 2003).

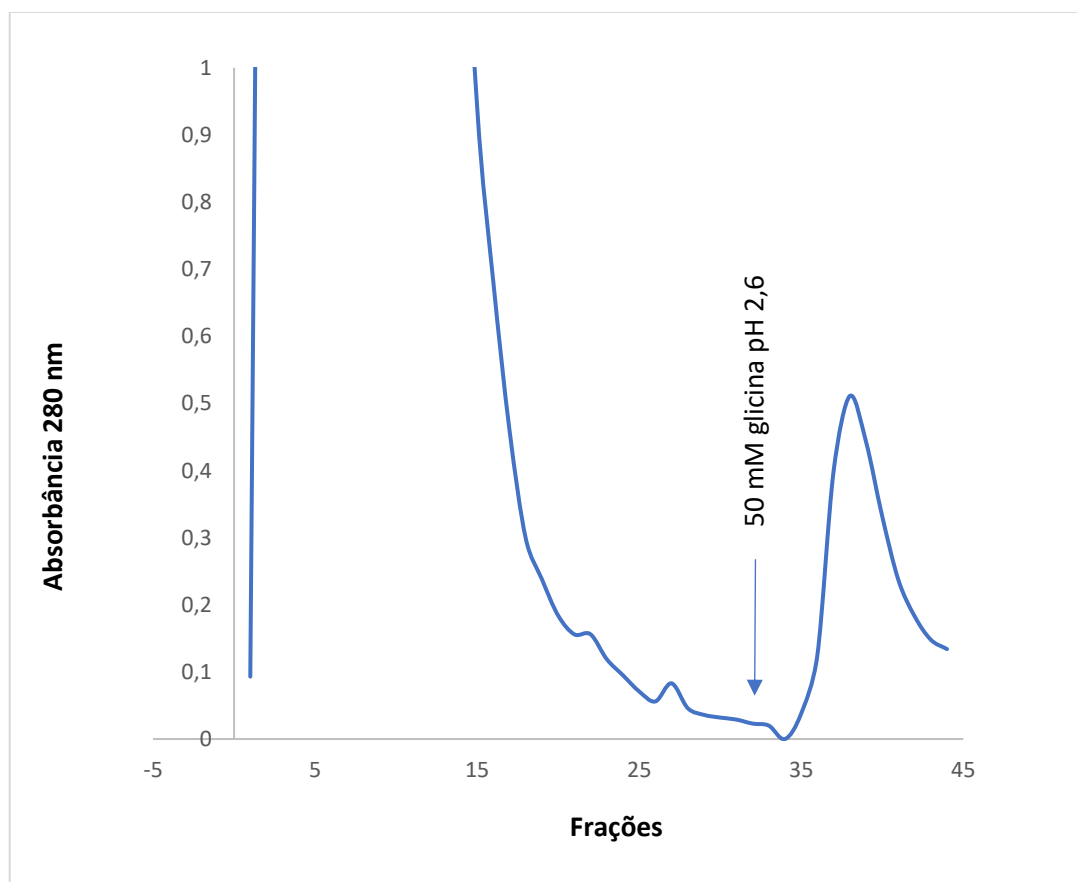
3. RESULTADOS

3.1 Purificação da lectina

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Geodia* sp., foi parcialmente isolada por uma combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade.

As frações denominadas P2 que foram eluídas com tampão glicina 50 mM, pH 2,6; contendo 150mM de NaCl apresentaram atividade hemolítica.

Figura 1 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B da fração 0-70.



Fonte: Autora. Foram aplicados 30 mL de F0-70 em coluna de Sepharose 4B (1,0cm x 3,0 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20mM, de pH 7,6; NaCl 150 mM e CaCl₂ 20mM (TBS/Ca²⁺). Os eluatos que apresentaram atividade hemaglutinante foram eluídos com tampão glicina 50 mM, pH 2,6; contendo 150mM de NaCl. O fluxo foi mantido constante e foram coletadas frações de 3 mL.

3.2 Caracterização bioquímica

3.2.1 Atividade hemaglutinante

O extrato bruto foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho nativos quanto tripsinizados. A atividade hemaglutinante foi incrementada quando os eritrócitos foram tratados com tripsina (Tabela 1). O P2 eluído da coluna de Sepharose 4B apresentou atividade hemolítica quando testado para eritrócitos de coelhos, tanto nativos como tratados com tripsina (Tabela 2), não sendo possível determinar o título da atividade hemaglutinante.

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante do extrato bruto da esponja marinha *Geodia* sp. contra eritrócitos humanos e de coelhos (U.H./mL)

Tipo de eritrócito	Nativo	Tratamento Enzimático
		Tripsina
Humano A	N.H	N.D
Humano B	N.H	N.D
Humano O	N.H	N.D
Coelho	8	16

Fonte: elaborado pela autora.

N.H - Não apresentou aglutinação; N.D - A atividade hemaglutinante não foi determinada.

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante do P2 extraído da esponja marinha *Geodia* sp. contra eritrócitos humanos e de coelhos (U.H/mL).

Tipo de eritrócito	Nativo	Tratamento Enzimático
		Tripsina
Humano A	N.H	N.D
Humano B	N.H	N.D
Humano O	N.H	N.D
Coelho	Hem	Hem

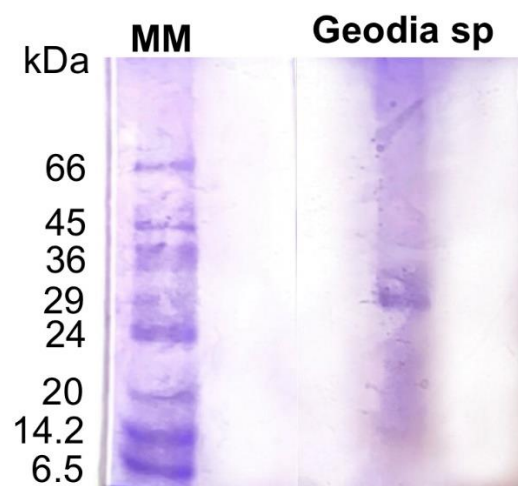
Fonte: elaborado pela autora.

N.H – Não apresentou aglutinação; N.D – A atividade hemaglutinante não foi determinada; Hem – apresentou atividade hemolítica.

3.2.2 Estimativa da massa molecular: eletroforese em SDS-PAGE

Em SDS-PAGE, o P2 eluido da cromatografia da *Geodia* sp apresentou uma banda com massa de aproximadamente 30 kDa, sob condições não redutoras (Figura 2).

Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do P2 oriundo da *Geodia* sp na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).



Fonte: Autora. (MM) Marcador molecular 66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa 14.2 kDa 6.5 kDa. Lectina parcialmente isolada de *Geodia* sp na ausência de β -mercaptanol – 30 kDa.

3.2.3 Sequência de aminoácidos dos peptídeos trípticos da lectina de *Geodia* sp

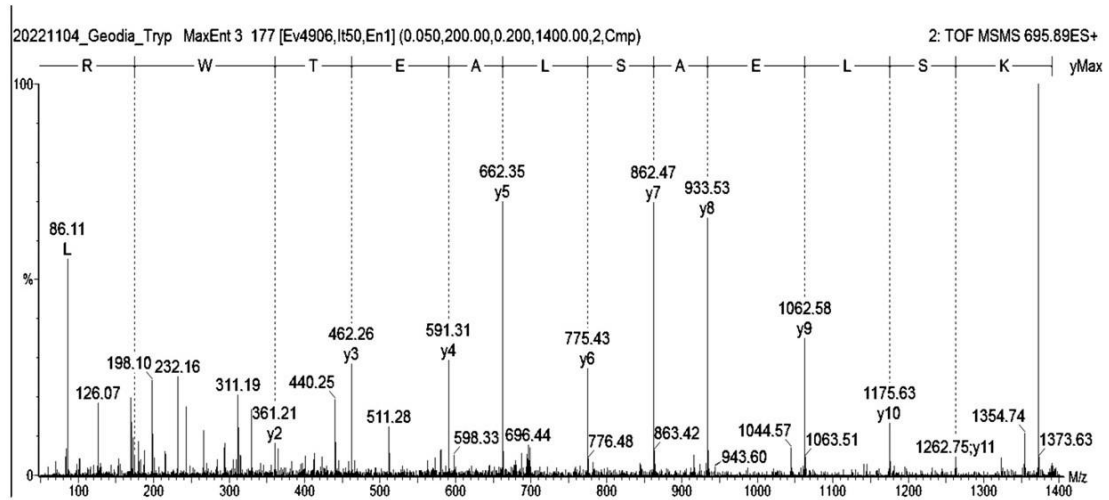
As análises dos peptídeos gerados pela digestão em gel não produziram resultados satisfatórios. Por outro lado, o resultado das análises por espectrometria de massa sequencial da digestão tríptica em solução do P2 da cromatografia de afinidade está listado na Tabela 3. Um espectro de fragmentação de um peptídeo está ilustrado na Figura 03.

Tabela 3- Sequência dos peptídeos trípticos da lectina de *Geodia* sp.

Peptídeo	(m/z)	Sequência de aminoácidos	Massa		Δ (Da)
			Observada	Calculada	
T1	517.29	TLLEWESR	1032.5643	1032.5240	0.04
T2	473.78	SWLLEGNK	945.5444	945.4919	0.05
T3	583.33	LENELKYTR	1164.6444	1164.6139	0.03
T4	695.90	KSLEASLAETWR	1389.7844	1389.7252	0.06
T5	336.72	SLHGMMK	671.4244	671.3425	0.08

Fonte: Autora. (m/z) : massa carga; Δ : massa calculada – massa observada; T: tripsina.

Figura 3 – Espectro de fragmentação do peptídeo T4 da lectina de *Geodia* sp



Fonte: Autora. Fragmentação do íon precursor de $[M+2H]^{2+}$ 695,89 m/z . A sequência de aminoácidos foi deduzida a partir da série de íons y_2 a y_{12} .

4. DISCUSSÃO

Uma nova lectina da esponja marinha *Geodia* sp, foi parcialmente purificada, a partir da combinação da precipitação de sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em Sepharose 4B. A matrix de Sepharose é composta de agarose que consiste em resíduos alternadamente repetidos de galactose e anidro-galactose. Com a propriedade de ligação das lectinas ao açúcar, as proteínas podem ser isoladas por cromatografia de afinidade (ARAKI; ARAI, 1967; TORRES ROMERO *et al.*, 2017).

A cromatografia de afinidade, para as lectinas, facilitou as pesquisas intensivas e extensivas dessas substâncias em nível molecular (SHARON; LIS, 2004). Essa cromatografia é uma técnica usada para separar compostos que têm a capacidade de se ligar não covalentemente e reversivelmente a moléculas específicas conhecidas como ligantes, em uma matriz sólida (TORRES ROMERO *et al.*, 2017). Assim, uma proteína com afinidade a um grupo químico específico é adsorvida às esferas na coluna e sua migração é retardada. A separação da proteína de interesse é realizada em quatro passos principais: equilíbrio da coluna, injeção da amostra, lavagem da coluna para eluição das proteínas fracamente adsorvidas e, finalmente, a eluição das proteínas adsorvidas (DE ARAÚJO *et al.*, 2014).

A cromatografia de afinidade é considerada um método eficiente e rápido na purificação de moléculas, pois se baseia na especificidade biológica do analito, tal como a afinidade de uma enzima a um substrato. No entanto, exatamente por essa especificidade, etapas que antecedam o seu uso no isolamento de proteínas devem ser consideradas. Dentre elas, a precipitação por sal é uma técnica que se utiliza da diferença de solubilidade das proteínas, a qual, geralmente, é diminuída à medida que a concentração salina aumenta, um efeito denominado de *salting out*. Portanto, vários métodos de separação utilizam a cromatografia de afinidade combinada com a precipitação de sulfato de amônio (DE ARAÚJO *et al.*, 2014). Diversas lectinas foram parcialmente purificadas através de cromatografia de afinidade, como AFL de *Aplysina fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019), a FCL de *Fasciospongia carvenosa* (SADANANDAN; RAUF, 2021), a ACL-I e ACL-II da *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2012), e a CLL isolada da *Chondrilla caribensis* (MARQUES *et al.*, 2018).

A lectina parcialmente extraída da *Geodia* sp exibiu atividade hemolítica apenas para eritrócitos de coelho. Porém a atividade do extrato mostrou aglutinação para esses mesmos eritrócitos, o que demonstra uma especificidade na interação entre as moléculas presentes no extrato com os carboidratos presentes nos eritrócitos de coelho. Essa interação possivelmente

ocorre porque os tipos sanguíneos de coelho contêm antígenos com carboidratos e glicanos diferentes dos que estão presentes no sangue humano (RAVINDRANATH *et al.*, 1985; MIZGINA *et al.*, 2021). Algumas lectinas têm seu título de hemaglutinação aumentado quando tratado com enzimas proteolíticas. Esse tratamento objetiva dar uma maior exposição dos carboidratos presente nas membranas mediante a clivagem das proteínas facilitando o reconhecimento da lectina ao carboidrato presente na célula (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998). Um ótimo exemplo é a lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis* que demonstrou preferência por eritrócitos de coelho e exibiu maior capacidade de aglutinação com eritrócitos tratados com tripsina (MARQUES *et al.*, 2018).

Em SDS-PAGE, a lectina apresentou apenas uma banda principal de aproximadamente 30 kDa, sob condições não redutoras. As lectinas AFL (CARNEIRO *et al.*, 2019) e a HiL de *Haliclona implexiformis* (ANDRADE, 2022) apresentaram migração eletroforética semelhante em condições não redutoras.

Algumas lectinas de animais possuem baixa expressão e/ou rendimento, portanto uma caracterização bioquímica completa requer uma grande quantidade de matéria prima, o que pode tornar o processo de purificação inviável (LAM; NG, 2011). No processo de purificação da lectina foi observado um baixo rendimento da proteína além da não detecção da atividade hemaglutinante, não sendo possível a realização dos estudos de inibição da lectina e/ou a elaboração da tabela de purificação.

A partir das frações obtidas em cromatografia e de bandas eletroforéticas, os estudos foram concentrados na caracterização estrutural através do uso da espectrometria de massa, que é uma técnica analítica de alta sensibilidade e precisão amplamente utilizada na identificação e análise estrutural de proteínas na era pós-genômica (GLISH; VACHET, 2003).

As sequências dos peptídeos trípticos da lectina parcialmente purificada de *Geodia* sp quando comparados com os bancos de dados não apresentaram similaridade significativa com outras lectinas animais ou com outras proteínas depositadas nos bancos de dados. A análise dos peptídeos digeridos com outras enzimas (p.ex. quimiotripsina) podem fornecer mais sequências de aminoácidos que permitam a sobreposição de peptídeos. Por outra parte, os dados obtidos também poderão ser utilizados para o desenho de oligonucleotídeos objetivando a clonagem mediante técnicas de amplificação de cDNA para determinação da estrutura primária da lectina.

5. CONCLUSÃO

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Geodia* sp. foi parcialmente purificada através da combinação de precipitação proteica com sulfato de amônio somado a uma cromatografia de afinidade. O extrato bruto oriundo da *Geodia* sp. possui especificidade por eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Em SDS-PAGE apresentou uma única banda de aproximadamente 30 kDa sob condições não redutoras. A partir da espectrometria de massas foi possível obter algumas informações parciais de sua estrutura primária, determinada em 5 peptídeos tripticos sequenciados por (MS/MS). Portanto, novos estudos são necessários para a obtenção de uma determinação de estrutura primária para a lectina oriunda da *Geodia* sp.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-CAMACHO, J. M.; DOONAN, L.; MCCORMACK, G. P. Evolution of the main skeleton-forming genes in sponges (phylum Porifera) with special focus on the marine Haplosclerida (class Demospongiae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 131, p. 245-253, 2019.
- ANDRADE, F. R. N. **Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis***. 2022. 76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- ARAKI, C.; ARAI, K. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXIV. Isolation of a new disaccharide as a reversion product from acidic hydrolysate. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 40, n. 6, p. 1452-1456, 1967.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 54, n. 2, p. 396-399, 1965.
- BAI, S. M. M.; ROSE, M. B. Purification and characterization of hemolymph lectin of freshwater crab, *Lamella lamellifrons* (Alcock, 1909). **Ann Trop Med Public Health**, v. 23, n. 7, p. 1174-1187, 2020.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419-419, 1954.
- CARNEIRO, R. F. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (soestella) caerulea***. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 662, p. 169-176, 2019.
- COSTANTINI, S. *et al.* Evaluating the effects of an organic extract from the mediterranean sponge *Geodia cydonium* on human breast cancer cell lines. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2112, 2017.

- DE ARAÚJO, J. M. *et al.* Determinação da atividade antitriptica em proteínas de produtos do amendoim isoladas por cromatografia de afinidade. **Química Nova**, v. 37, p. 1618-1623, 2014.
- DI, X. *et al.* 6-Bromoindole derivatives from the Icelandic marine sponge *Geodia barretti*: Isolation and anti-inflammatory activity. **Marine drugs**, v. 16, n. 11, p. 437, 2018.
- DO NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* Halilectin-3, a lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*, induces apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF7 cells through caspase-9 pathway and LC3-II protein expression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 18, n. 4, p. 521-528, 2018.
- DODD, R. Y.; MACLENNAN, A. P.; HAWKINS, D. C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, v. 15, n. 5, p. 386-391, 1968.
- DRESCH, R. R. *et al.* Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 4, p. 365-370, 2012.
- DROUIN, M; SAENZ, J; CHIFFOLEAU, E. C-type lectin-like receptors: head or tail in cell death immunity. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 251, 2020.
- ENGEL, M. *et al.* A novel galactose-and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, n. 6, p. 527-537, 1992.
- GARDÈRES, J. *et al.* Porifera lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.
- GARTNER, T. K; STOCKER, K; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox venom*. **FEBS letters**, v. 117, n. 1-2, p. 13-16, 1980.
- GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature reviews drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.
- KILLPATRICK, D. C. **Handbook of animal lectins**. John Wiley, 2000.
- KILLPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.
- LUDWIG, A.K. *et al.* Lectinology 4.0: altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 5, p. 935-940, 2019.
- MADDEN, T. The BLAST sequence analysis tool. **The NCBI handbook**, 2003.

- MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301, 2018.
- MALI, B. *et al.* Structural but not functional conservation of an immune molecule: a tachylectin-like gene in Hydractinia. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 3, p. 275-281, 2006.
- MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H. F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 955-962, 1985.
- MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from Tropical Sponges: Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.
- MIZGINA, T. O. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Lectin from the Clam *Glycymeris yessoensis* and Its Functional Characterization under Microbial Stimulation and Environmental Stress. **Marine Drugs**, v. 19, n. 9, p. 474, 2021.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.
- PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 2, p. 213-221, 2002.
- PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados 7ed.** McGraw Hill Brasil, 2016.
- PREETHAM, E. *et al.* Anti-biofilm properties and immunological response of an immune molecule lectin isolated from shrimp *Metapenaeus monoceros*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 896-906, 2019.
- QUEIROZ, A. FS. *et al.* Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1023-1033, 2009.
- RAVINDRANATH, M. H. *et al.* Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 15, p. 8850-8856, 1985.
- RUBEENA, A. S. *et al.* Antimicrobial and biochemical characterization of a C-type lectin isolated from pearl spot (*Etroplus suratensis*). **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 202-211, 2019.
- SADANANDAN, R.; RAUF, A. A. Antifungal and insecticidal activity of a lectin isolated from marine sponge *Fasciospongia carvernsa*. **Journal of Advances in Biological Science**, v. 8, n. 1, 2021.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

- SAMPAIO, A. H. *et al.* New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal of applied phycology**, v. 14, n. 6, p. 489-495, 2002.
- SANCHEZ-RUDERISCH, H. *et al.* Galectin-1 sensitizes carcinoma cells to anoikis via the fibronectin receptor $\alpha 5\beta 1$ -integrin. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 5, p. 806-816, 2011.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIŠ, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SOUSA, A. R. *et al.* Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.
- TORRES ROMERO, J. C. *et al.* Isolamento de lectinas por cromatografia de afinidade. **RIAA**, v. 8, n. 1, p. 63-69, 2017.
- UL HASSAN, S. S.; SHAIKH, A. L. Marine actinobacteria as a drug treasure house. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 46-57, 2017.
- VALVERDE, P. *et al.* Molecular recognition in C-type lectins: the cases of DC-SIGN, Langerin, MGL, and L-sectin. **ChemBioChem**, v. 21, n. 21, p. 2999-3025, 2020.
- VAN SOEST, R.W.M. *et al.* **Banco de Dados Mundial Porifera**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.
- WANG, W.H. *et al.* The role of galectins in virus infection-A systemic literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 6, p. 925-935, 2020.
- WATERS CORPORATION. **RapiGest SF Surfactant, care and use manual**. US n. 8,580,533 e n.: 7,229,539. Milford, 2015
- WU, T. *et al.* Oncolytic vaccinia virus expressing *Aphrocallistes vastus* lectin as a cancer therapeutic agent. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, p. 363, 2019.
- XIONG, C. *et al.* A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 9-16, 2006.
- YANG, Q. *et al.* Development of a multilocus-based approach for sponge (phylum Porifera) identification: refinement and limitations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.