



## Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil

R.R. Dresch<sup>1</sup>, A.S. Haeser<sup>1</sup>, C. Lerner<sup>2</sup>, B. Mothes<sup>2</sup>, M.M. Vozári-Hampe<sup>3\*</sup>, A.T. Henriques<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>2</sup>Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Museu de Ciências Naturais, Rua Dr. Salvador França 1427, Jardim Botânico, 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>3</sup>Laboratório de Lectinas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>4</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

**RESUMO:** Extratos aquosos de vinte espécies de esponjas da costa Atlântica brasileira foram testados para verificação da presença de atividade lectínica e atividade hemolítica. Hemaglutinação para eritrócitos humanos e de distintos animais foi evidenciada em 12 dos 20 extratos testados. Os extratos das espécies *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* e *Guitarra* sp1. foram os que apresentaram maior atividade hemaglutinante. Dos doze extratos com atividade hemaglutinante dez tiveram a atividade inibida por um ou mais açúcares e/ou glicoproteínas. A lectina do extrato de *Chondrilla nucula* foi resistente à desnaturação térmica quando aquecida a 100 °C por 60 minutos. Atividade hemolítica foi encontrada apenas nos extratos de *Petromica citrina* e *Acervochalina* sp. As espécies que apresentaram maior potencial para futuros estudos de suas lectinas foram *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix*, em vista da maior atividade hemaglutinante apresentada por seus extratos, aliada à maior atividade específica.

**Unitermos:** Esponjas, lectinas, atividade hemaglutinante, atividade hemolítica.

**ABSTRACT:** "Detection of lectinic activity and hemolytic activity in extracts of native sponges (Porifera) of atlantic coast of Brazil". Aqueous extracts of twenty species of sea sponges of the Brazilian Atlantic coast were tested with the aim of searching the presence of lectinic and hemolytic activity. Hemagglutinating activity for human erythrocytes and for distinct animals were found in 12 of the 20 tested extracts. The extracts of *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* and *Guitarra* sp1. were the ones that presented highest hemagglutinating activity. Ten of the 12 hemagglutinating extracts had the activity inhibited by one or more sugars or glycoproteins. The lectin from *Chondrilla nucula* was resistant to thermal denaturation when heated up to 100 °C for 60 minutes. Hemolytic activity was only found in the extracts from *Petromica citrina* and *Acervochalina* sp. The species of sea sponges that showed major potential for futures studies of their lectins were *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* and *Chondrosia collectrix*, due to the highest hemagglutinating activity presented by their extracts, allied to the highest specific activity.

**Keywords:** Sponges, lectins, hemagglutinating activity, hemolytic activity.

### INTRODUÇÃO

A costa brasileira com 8000 Km apresenta uma importante fauna marinha praticamente inexplorada (Berlinck et al., 2004). Dentre os organismos presentes destacam-se as esponjas, um dos animais multicelulares mais simples. Devido à sua prevalência, distribuição e habilidade de sintetizar uma gama de compostos de diferentes classes estruturais, as esponjas tornaram-se uma das fontes mais promissoras de isolamento de novos

metabólitos primários e secundários, dos quais vários com importantes atividades biológicas e fontes potenciais de fármacos para tratamento de diversas doenças humanas (Berlinck et al., 2004; Carté, 1996).

Foi o isolamento do C-nucleosídeo da esponja *Cryptotheca crypta* há quatro décadas que forneceu a base para a síntese de citarabina, o primeiro agente anticâncer derivado de fonte marinha a ser desenvolvido para uso clínico em casos de linfoma e leucemia (Cragg; Newman, 1999). O'Keefe et al. (1997) isolaram uma nova proteína

**Tabela 1.** Avaliação da atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponjas para eritrócitos de diferentes espécies animais

Espécies testadas	Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína)								
	*Coelho	*Hum A	*Hum AB	*Hum O	*Hum B	*Cão	*Ovelha	*Cavalo	*Boi
<i>Acervochalina</i> sp. (PB) MCN 4266	103,22	103,22	51,61	25,81	25,81	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Agelas</i> sp. (PB) MCN 4269	1,34x10 <sup>3</sup>	2,69x10 <sup>3</sup>	83,96	21,00	10,49	335,87	0,00	335,87	0,00
<i>Axinella corrugata</i> (SC) MCN 3772	1,74x10 <sup>5</sup>	681,66	1,09x10 <sup>3</sup>	5,45x10 <sup>3</sup>	5,45x10 <sup>3</sup>	2,18x10 <sup>4</sup>	340,81	0,00	170,40
<i>Chondrosia collectrix</i> (PE) MCN 4656	0,00	615,38	307,69	2,46x10 <sup>3</sup>	307,69	0,00	0,00	7,88x10 <sup>4</sup>	0,00
<i>Chondrilla nucula</i> (PB) MCN 5139	5,42x10 <sup>4</sup>	3,39x10 <sup>3</sup>	3,39x10 <sup>3</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	5,42x10 <sup>4</sup>	137,93	8,83x10 <sup>3</sup>	275,86
<i>Cinachyrella alloclada</i> (PE) MCN 4659	1,01x10 <sup>4</sup>	316,04	79,01	632,10	5,06x10 <sup>3</sup>	632,10	39,51	1,27x10 <sup>3</sup>	79,01
<i>Guitarra</i> sp1. (SC)	9,62x10 <sup>3</sup>	9,62x10 <sup>3</sup>	600,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Guitarra</i> sp2. (SC)	0,00	0,00	29,21	58,63	58,63	229,14	0,00	469,03	0,00
<i>Guitarra sepia</i> (SC) MCN 3413	2,42x10 <sup>3</sup>	75,47	0,00	0,00	75,47	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Haliclona tubifera</i> (SC) MCN 3771	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NT	NT	NT	NT
<i>Monanchora arbuscula</i> (PB) MCN 4268	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Mycale arcuicris</i> (SC) MCN 3984	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Niphates</i> sp. (PB) MCN 4263	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Petromica citrina</i> (SC) MCN 3395	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Placospongia carinata</i> (PE) MCN 4658	1,58x10 <sup>3</sup>	98,76	197,53	395,06	395,06	790,12	0,00	3,16x10 <sup>3</sup>	0,00
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC) MCN 3569	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC) MCN 3425	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	8,81x10 <sup>3</sup>	NT	NT	NT
<i>Raspailia</i> sp. (SC) MCN 4004	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	735,97	1,47x10 <sup>3</sup>	0,00
<i>Suberitidae</i> (PB) MCN 4262	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Tedania ignis</i> (SC) MCN 3397	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

\*Suspensão de eritrócitos a 2% em PBS SC= Santa Catarina PB= Paraíba PE=Pernambuco NT= não testado  
MCN= número de depósito junto ao Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do RS

a partir de extratos aquosos da esponja marinha *Niphates erecta*, com atividade contra o vírus da Imunodeficiência Humana e que denominaram nifatevirina. Uma proteína com atividade hemolítica, ATPásica e neurotóxica, denominada de suberitina, foi isolada de outra espécie, a *Suberites domuncula* (Cariello; Zanetti, 1979). Monks et al. (2002), trabalhando com extratos orgânicos e aquosos de 10 espécies de esponjas marinhas coletadas na costa do Estado de Santa Catarina, constataram atividade citotóxica em 4 extratos orgânicos, atividade antimicrobiana em 2 extratos aquosos e um orgânico e atividade antiquimiotóxica em 6 extratos aquosos.

Lectinas, um tipo especial de proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e ligar reversivelmente e com certa especificidade carboidratos livres ou complexados (Peumans, 2002), foram descritas em esponjas marinhas, pela primeira vez, por Doods, Maclennan e Hawkin (1968) *apud* Kilpatrick (2000) em extratos de *Cliona celata* e em espécies do gênero *Axinella*. Nestes organismos, as lectinas teriam o papel de transportadoras de glicídios, de substâncias importantes para o crescimento e nutrição do animal, de receptores para agregação celular, de substâncias de defesa contra bactérias e parasitas, dentre outros (Buck et al., 1992; Kilpatrick, 2000; Micucci; Camps, 1987). O interesse pelas lectinas é devido às várias atividades biológicas que as mesmas apresentam, como hemaglutinante (Sepcic et al., 1997), mitogênica (Engel et al., 1992), citotóxica

(Pajic et al., 2002), hemolítica (Hatakeyama; Nagatomo; Yamasaki, 1995), antibacteriana (Tunkijjanukij; Olafsen, 1998), dentre outras, as quais podem ensejar uma gama de aplicações biológicas, tecnológicas e inclusive terapêuticas.

No presente trabalho foram avaliadas a atividade lectínica e a hemolítica de extratos aquosos de 20 espécies de esponjas marinhas coletadas ao longo do litoral Atlântico brasileiro, o efeito da temperatura sobre ambas as atividades e determinados os inibidores da atividade hemaglutinante.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material animal e reagentes químicos

As esponjas foram coletadas no litoral do Estado de Santa Catarina (*Axinella corrugata*, *Guitarra* sp1., *Guitarra* sp2., *Guitarra sepia*, *Haliclona tubifera*, *Mycale arcuicris*, *Petromica citrina*, *Polymastia janeirensis*, *Pseudaxinella reticulata*, *Raspailia* sp., *Tedania ignis*) e no litoral dos Estados de Pernambuco (*Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada*, *Placospongia carinata*) e Paraíba (*Acervochalina* sp., *Agelas* sp., *Chondrilla nucula*, *Monanchora arbuscula*, *Niphates* sp., *Suberitidae*). Amostra de cada espécie está depositada no Museu de Ciências Naturais (MCN) da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Sangue humano foi

obtido junto ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de coelho junto ao Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o dos demais animais na Faculdade de Veterinária da UFRGS. Açúcares e glicoproteínas usadas foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos os reagentes foram de grau analítico e as soluções preparadas em água purificada em sistema Milli-Q.

### Preparação dos extratos brutos

Imediatamente após a coleta, as esponjas foram lavadas exaustivamente com água corrente e armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a extração das proteínas, as esponjas congeladas foram trituradas e maceradas em gral com água destilada e deionizada e deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A solução obtida foi filtrada através de papel de filtro e estocada a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sedimento foi reextraído, nas mesmas condições experimentais, tantas vezes quantas necessárias, até o sobrenadante não apresentar mais atividade hemaglutinante. Os filtrados aquosos resultantes foram reunidos, liofilizados e armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### Preparação dos extratos aquosos para os ensaios

O material liofilizado foi pesado e solubilizado em tampão fosfato salino (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM e  $\text{NaCl}$  136 mM, contendo  $\text{NaN}_3$  20 mg/L - pH 7,2), obtendo-se uma solução a 10% (m/v). Em seguida, a solução foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  em microcentrífuga Eppendorf. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (extrato aquoso) foi coletado e usado para os ensaios.

### Avaliação das atividades hemaglutinante, hemolítica e determinação dos inibidores da hemaglutinação

A atividade hemaglutinante foi testada com suspensão, em PBS, de eritrócitos nativos a 2%, previamente lavados, pertencentes aos grupos sanguíneos A, B, O e AB humanos e de distintas espécies animais (coelho, cão, ovelha, cavalo e boi). Os ensaios foram realizados em triplicata pelo método da dupla diluição serial em placas de microtitulação com fundo em U, usando-se  $25\mu\text{L}$  do extrato aquoso e  $25\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos. A observação da hemaglutinação foi feita a olho nu, após incubação das placas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas.

A atividade hemolítica para eritrócitos nativos a 2% em PBS, previamente lavados, pertencentes a distintas espécies animais, foi testada em placa de dupla diluição serial com  $25\mu\text{L}$  de extrato aquoso de esponjas adicionados a  $25\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos. Paralelamente, um controle negativo constituído de suspensão de eritrócitos em PBS e um positivo de eritrócitos a 1% em água purificada foram submetidos às mesmas condições experimentais. A hemólise foi observada a olho nu após incubação das placas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas e confirmada por análise em microscopia óptica (Mebs; Veiler; Heinke, 1985 modificado).

A atividade hemaglutinante e hemolítica foram expressas em unidades hemaglutinantes e unidades hemolíticas por mg de proteína (UH/mg e UHI/mg - atividade específica), respectivamente, considerando-se unidades hemaglutinantes e/ou hemolíticas o inverso da maior diluição de  $25\mu\text{L}$  de extrato capaz de produzir o efeito, extrapolado para 1mL, de acordo com Kilpatrick e Yeomann (1978). A atividade hemolítica específica do extrato aquoso de cada espécie de esponja foi considerada como 100%.

**Tabela 2.** Efeito de açúcares e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponjas

Espécies testadas	*Inibidores
<i>Acervochalina</i> sp.	Não inibido
<i>Agellas</i> sp.	L-fucose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina
<i>Axinella corrugata</i>	N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose
<i>Chondrosia collectrix</i>	fetuína
<i>Chondrilla nucula</i>	fetuína
<i>Cinachyrella alloclada</i>	$\beta$ -lactose
<i>Guitarra</i> sp1.	D-glicose, L-ramnose, D-lixose, L-sorbose
<i>Guitarra</i> sp2.	Não inibido
<i>Guitarra sepia</i>	D-galactose, D-xilose, L-arabinose, $\beta$ -lactose, rafinose, $\alpha$ (D)-melibiose, asialofetuína
<i>Placospongia carinata</i>	D-galactose, fetuína, asialofetuína, $\beta$ -lactose
<i>Pseudaxinella reticulata</i>	ácido D-glicurônico, D-xilose, L-fucose, L-sorbose
<i>Raspailia</i> sp.	L-sorbose, ácido D-glicurônico

\*Concentração final: açúcares 0,2 M e glicoproteínas 0,5%

Inibição da hemaglutinação foi realizada incubando-se previamente o extrato aquoso durante 20 minutos a 20 °C ( $\pm 2$  °C) com o açúcar na concentração final de 0,2M ou com a glicoproteína a 0,5%. Imediatamente após, foi adicionada a suspensão de eritrócitos nativos a 2% da espécie animal que havia apresentado maior suscetibilidade à hemaglutinação. A leitura da atividade hemaglutinante foi realizada após incubação durante 120 minutos da mistura à temperatura de 20 °C ( $\pm 2$  °C). Foram utilizados os seguintes açúcares e glicoproteínas para os testes: D-manose, D-glicose, D-galactose, L-fucose, L-ramnose, ácido D-glicurônico, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina, L-sorbose, D-lixose, D-xilose, L(+)-arabinose,  $\beta$ -lactose, sacarose, rafinose,  $\alpha$ (D)-melibiose, quitobiose, quitotriose, quitotetraose, fetuína e asialofetuína.

### Determinação de proteínas

O conteúdo de proteína dos extratos aquosos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina, fração V (Sigma) como padrão.

### Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante e hemolítica

Amostras dos extratos aquosos que apresentaram atividade hemaglutinante ou hemolítica foram submetidas, em tubos de Eppendorf, a aquecimento em banho de água, por 10 e/ou por 30 ou por 60 minutos, a temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C, respectivamente. Imediatamente após, os tubos foram resfriados em banho de gelo. Quando necessário, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente, com fins de eliminar eventuais precipitados de proteínas formados durante o aquecimento. A atividade hemaglutinante ou a hemolítica foi analisada pelo método da dupla diluição serial em placa de microtitulação, usando-se a suspensão de eritrócitos a 2% da espécie animal mais sensível ao efeito hemaglutinante ou hemolítico da amostra analisada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos aquosos de 12 das 20 espécies de esponjas estudadas apresentaram atividade hemaglutinante para os eritrócitos testados, mas apenas 11 aglutinaram eritrócitos humanos, segundo se pode verificar na tabela 1. Os extratos aquosos de *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* e *Guitarra* sp1. foram os que apresentaram maior atividade lectínica específica. O extrato de *Chondrilla nucula* aglutinou todos os eritrócitos testados, mas apresentou maior atividade hemaglutinante para eritrócitos de cão e coelho. De modo semelhante, o extrato de *Cinachyrella alloclada* aglutinou todos os eritrócitos testados, com maior atividade específica para

eritrócitos humanos do grupo B, de coelho e de cavalo. Contudo, o extrato aquoso de *Axinella corrugata*, com maior atividade lectínica para eritrócitos de coelho, não aglutinou eritrócitos de cavalo. Não foi detectada atividade lectínica em extratos de *Haliclona tubifera*, *Monanchora arbustula*, *Mycale arcuris*, *Niphates* sp., *Polymastia janeirensis*, *Suberitidae*, *Petromica citrina* e *Tedania ignis* para os eritrócitos testados. Nenhum dos extratos hemaglutinantes mostrou especificidade absoluta para eritrócitos de um dos grupos sanguíneos humanos ou das diferentes espécies animais, o que faz com que estas aglutininas não possam ser utilizadas na tipificação de grupos sanguíneos humanos.

Em estudo de ocorrência de lectinas em esponjas, realizado por Bretting et al. (1981), os extratos brutos de *Cacospongia scalaris* apresentaram maior seletividade para eritrócitos humanos pertencentes ao grupo sanguíneo O. Os mesmos autores verificaram que os das espécies *Dysidea fragilis*, *Reniera fulva*, *Acenthella acuta* e de *Chondrosia reniformis* não mostraram atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos, sendo que os das três primeiras espécies citadas aglutinaram apenas eritrócitos de coelho.

A lectina de *Haliclona cratera* aglutinou eritrócitos de humanos pertencentes aos grupos sanguíneos A, B, O e AB e de ovelhas nativos ou tratados por enzimas (papaína, tripsina e neuraminidase), com intensidade similar (Pajic et al., 2002). Extratos aquosos de *Callispongia fallax* mostraram atividade hemaglutinante somente após tratamento dos eritrócitos de coelho e de hamster com tripsina e com pronase, respectivamente. Além disso, a atividade hemaglutinante do extrato da esponja *Aplysina cauliformis* aumentou significativamente após tratamento dos eritrócitos de coelho e de hamster com enzimas proteolíticas (Miarons; Fresno, 2000). No presente trabalho não foi realizado tratamento dos eritrócitos usados com enzimas proteolíticas. O fato de não ter sido encontrada atividade lectínica em alguns dos extratos analisados no presente trabalho, não descarta a possibilidade da presença das mesmas nestas espécies, em vista da limitação dos tipos de eritrócitos utilizados e/ou por não terem sido usados eritrócitos tratados com enzimas.

A tabela 2 apresenta os resultados da inibição da atividade hemaglutinante dos extratos aquosos por açúcares e/ou por glicoproteínas. Como pode ser verificado, a aglutinabilidade dos extratos de *Cinachyrella alloclada*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix* foi inibida por um único açúcar ou por uma glicoproteína apenas. A inibição total da lectina dos extratos de *Cinachyrella alloclada* apenas por  $\beta$ -lactose confirmou os resultados descritos por Atta et al. (1989). Não foi possível obter inibição da atividade hemaglutinante dos extratos de *Guitarra* sp2. e de *Acervochalina* sp. com as glicoproteínas ou açúcares testados, sendo que os mesmos não são eritrócito específicos. Atta et al. (1992) analisando a lectina isolada de *Anthosigmella varians*

**Tabela 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponja

Espécies testadas	*Temperatura de inibição total
<i>Acervochalina</i> sp.	não inibida
<i>Agellas</i> sp.	80 °C
<i>Axinella corrugata</i>	90 °C
<i>Chondrosia collectrix</i>	80 °C
<i>Chondrilla nucula</i>	não inibida
<i>Cinachyrella alloclada</i>	100 °C
<i>Guitarra</i> sp1.	80 °C
<i>Guitarra</i> sp2.	80 °C
<i>Guitarra sepia</i>	70 °C
<i>Placospongia carinata</i>	80 °C
<i>Pseudaxinella reticulata</i>	80 °C
<i>Raspailia</i> sp.	100 °C

\*Tempo de aquecimento :10 min

não determinaram o inibidor da mesma com os açúcares testados. Supõe-se que, nestes casos, o açúcar inibidor tenha uma estrutura complexa, a exemplo do inibidor da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA).

Por outro lado, um considerável número de lectinas de esponjas marinhas são inibidas por D-galactose e N-acetil-D-galactosamina (Bretting et al., 1981; Schröder et al., 1990). Os resultados descritos na tabela 2 mostram que apenas extratos aquosos de *Axinella corrugata* foram inibidos por D-galactose e N-acetil-D-galactosamina, além de N-acetil-D-glicosamina. Kawagishi et al. (1994) constataram que a lectina HOL-I de *Halichondria okadai* foi inibida por oses contendo grupamento N-acetil, como N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina. Este comportamento é indicio de que a HOL-I reconhece e liga especificamente grupamentos N-acetil de açúcares. O fato da atividade hemaglutinante dos extratos pertencentes a distintas espécies de esponjas ter sido inibida por mais de um tipo de açúcar, pode indicar a presença de mais de uma lectina no extrato ou de isoformas ou de isolectinas, além da possibilidade de uma mesma lectina ser específica para porções similares da estrutura dos diferentes açúcares ou glicoproteínas.

Os extratos de esponjas pertencentes ao gênero *Guitarra* sp. apresentaram atividade hemaglutinante

para diferentes tipos de eritrócitos e distintos inibidores, fornecendo indícios de tratar-se de duas espécies diferentes. Estes resultados poderiam ser aplicados na identificação e caracterização taxonômica destas esponjas.

A tabela 3 exhibe o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante dos extratos aquosos. *Raspailia* sp. e *Cinachyrella alloclada* perderam a atividade hemaglutinante após aquecimento a 100 °C, durante 10 min. A lectina de *Acervochalina* sp. não perdeu a atividade por efeito de aquecimento a 100 °C por 30 min, e a atividade lectínica de *Chondrilla nucula* foi resistente ao aquecimento a 100 °C por 60 min. Este comportamento é bastante raro, porém presente em lectinas de baixo peso molecular, como a da alga marinha *Bryothamnion triquetrum* que apresentou, segundo Calvete et al. (2000), resistência à desnaturação térmica e cuja atividade hemaglutinante foi inibida somente por açúcares ou glicoproteínas complexas. Pajic et al. (2002) constataram que a atividade hemaglutinante da lectina de *Haliclona cratera* diminuiu após 15 min de aquecimento a 95 °C e desapareceu completamente após 60 min.

Os testes de hemólise, realizados com os distintos eritrócitos nativos e lavados, mostraram que dentre os vinte extratos analisados, somente dois, os de *Petromica citrina* e *Acervochalina* sp., possuíam atividade hemolítica (tabela 4). O extrato de *Acervochalina* sp. apresentou

**Tabela 4.** Avaliação da atividade hemolítica dos extratos aquosos de esponjas para eritrócitos de diferentes espécies de animais e efeito da temperatura sobre a atividade

Espécie	Atividade hemolítica específica (UHI/mg proteína)				Efeito da Temperatura 100 °C /10 min
	*Cavalo	*Boi	*Cão	*Ovelha	*Ovelha
<i>Acervochalina</i> sp.	1,65x10 <sup>3</sup>	206,45	825,81	1,65x10 <sup>3</sup>	825,81
<i>Petromica citrina</i>	731,34	731,34	2,93x10 <sup>3</sup>	2,93x10 <sup>3</sup>	1,17x10 <sup>4</sup>

\* Suspensão de eritrócitos a 2% em PBS

tanto atividade hemolítica quanto hemaglutinante. O mesmo tipo de comportamento foi relatado por Mebs, Weiler e Heinke (1985) para frações de extratos aquosos de esponjas marinhas eluídas de coluna de Sephadex G-75, indicando, neste caso, componentes com peso molecular elevado como sendo os responsáveis por ambas as atividades.

Os extratos de *Acervochalina* sp. apresentaram redução de 50% de sua atividade hemolítica após aquecimento a 100 °C, durante 10 min, o que poderia levar a supor que, ao menos parte dessa atividade, deve-se à ação de compostos suscetíveis à elevação de temperatura. De um modo geral, proteínas são compostos que perdem sua atividade biológica, por desnaturação, quando submetidas ao efeito de elevação de temperatura, geralmente acima de 50 °C. Contudo, não foi verificado se o responsável pelo efeito hemolítico dos extratos analisados teria natureza protéica e se o mesmo seria a proteína hemaglutinante. Por outro lado, o extrato de *Petromica citrina* apresentou aumento de atividade hemolítica após ter sido submetido ao aquecimento em banho de água a 100 °C por 10 min, o que poderia ser indicativo de que um fator lábil à temperatura poderia estar associado ao fator hemolítico diminuindo a sua ação a baixas temperaturas. Não foram encontrados na literatura estudos relacionando efeito da temperatura e atividade hemolítica em extratos de esponjas marinhas.

Segundo Miarons e Fresno (2000), extratos de espécies do gênero *Agelas* e *Ircinia* mostraram atividade hemolítica para eritrócitos de diferentes espécies animais. O extrato da esponja *Iothrocota birotulata* exibiu atividade hemolítica para praticamente todos os eritrócitos testados, enquanto que o de *Callispongia fallax* exibiu apenas para eritrócitos de coelho nativos, mas não para os tratados com tripsina. Também não foi encontrado na literatura referência de atividade hemolítica devido a lectinas em extratos de esponjas marinhas. No entanto, além da proteína tóxica suberitina, foram descritos como responsáveis pela atividade hemolítica em extratos de esponjas polímeros de alquilpiridinas e outros compostos não identificados (Berlinck et al., 1996; Bourget et al., 1988; Cariello; Zanetti, 1979; Mangel et al., 1992; Sepcic et al., 1997).

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, as espécies de esponjas marinhas que apresentaram maior potencial para futuros estudos de purificação, caracterização e determinação das propriedades biológicas de lectinas para fins de aplicação foram *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix*, em vista da maior atividade hemaglutinante apresentada por seus extratos, aliada à maior atividade específica.

## AGRADECIMENTOS

À farmacêutica Fabiane Moreira Farias, do Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ceder as esponjas utilizadas neste trabalho. Às estagiárias Michele P. Beier e Josiane W. Bortolloto por auxílio técnico na execução dos trabalhos. Este trabalho foi financiado pela CAPES/PPI e CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Atta AM, Barral-Netto M, Peixinho S, Sousa-Atta MLB 1989. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. *Braz J Med Biol Res* 22: 379-385.
- Atta AM, Cunha AP, Peixinho S. 1992. Partial characterization of the hemagglutinin activity of the marine sponge *Anthosigmella varians*. *Braz J Med Biol Res* 25: 53-55.
- Berlinck RGS, Ogawa CA, Almeida AMP, Sanchez MAA, Malpezzi ELA, Costa LV, Hajdu E, Freitas JC 1996. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. *Comp Biochem Phys C* 115: 155-163.
- Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernandez ILC, Selegim MHR, Granato AC, Almeida EVR, Nunez CV, Muricy G, Peixinho S, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Thiemann O, Silva M, Souza AO, Silva CL, Minarini PRR 2004. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *J Nat Prod* 67: 510-522.
- Bourget G, More MT, More P, Guimbretiere L, Leboterff J, Verbist JF 1988. Cytotoxicity and hemolysis by an extract of the sponge *Pachymatisma johnstonii*. *Toxicon* 26: 324-327.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bretting H, Donadey C, Vacelet J, Jacobs G 1981. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comp Biochem Phys B* 70: 69-76.
- Buck F, Luth C, Strupat K, Bretting H 1992. Comparative investigations on the amino-acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). *Biochem Biophys Acta* 1159: 1-8.
- Calvete JJ, Costa FHF, Saker-Sampaio S, Murciano MPM, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch C, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH 2000. The amino acid sequence of agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol Life Sci* 57: 343-350.
- Cariello L, Zanetti L 1979. Suberitine, the toxic protein from the marine sponge, *Suberites domuncula*. *Comp Biochem Phys C* 64: 15-19.
- Carté BK 1996. Biomedical potential of marine natural products.

- BioScience* 46: 271-286
- Cragg GM, Newman DJ 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest* 17: 153-163.
- Doods RY, Maclennan AP, Hawkin DC 1968. Haemagglutination from marine sponges. *Vox Sanguinis*, 15: 386-391, *apud* Kilpatrick DC 2000. *Handbook of animal lectins - Properties and biomedical applications*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Engel M, Bachmann M, Schroder HC, Rinkevich B, Kljajic Z, Uhlenbruck G, Muller WEG 1992. A novel galactose and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: Isolation, characterization and immunobiological properties. *Biochimie* 74: 527-537.
- Hatakeyama T, Nagatomo H, Yamasaki N 1995. Interaction of the hemolytic lectin cel-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 270: 3560-3564.
- Kawagishi H, Yamawaki M, Isobe S, Usui T, Kimura A, Chiba S 1994. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*. *J Biol Chem* 269: 1375-1379.
- Kilpatrick DC 2000. *Handbook of animal lectins - Properties and biomedical applications*. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. England.
- Kilpatrick DC, Yeoman MM 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem J* 175: 1151-1153.
- Mangel A, Leitão JM, Batel R, Zimmermann H, Müller WEG, Schröder HC 1992. Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. *Eur J Biochem* 210: 499-507.
- Mebs D, Weiler I, Heinke HF 1985. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. *Toxicon* 23: 955-962.
- Miarons PB, Fresno M 2000. Lectins from tropical sponges: purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *J Biol Chem* 275: 29283-29289.
- Micucci HA, Camps E 1987. Lectinas: Obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. *Acta Farm Bonaerense* 6: 35-54.
- Monks NR, Lerner C, Henriques AT, Farias FM, Schapoval EES, Suyenaga ES, da Rocha AB, Schwartzmann G, Mothes B 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected of the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol* 281: 1-12.
- O'Keefe BR, Beutler JA, Cardellina JA, Gulakowski RJ, Krepps BL, McMahren JB, Sowder RC, Henderson LE, Pannell LK, Pomponi SA, Boyd MR 1997. Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. *Eur J Biochem* 245: 47-53.
- Pajic I, Kljajic Z, Dogovic N, Sladic D, Juranic Z, Gasic MJ 2002. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp Biochem Phys C* 132: 213-221.
- Peumans WJ 2002. Oral communication. Interlec 20, Helsinki, Dinamarca.
- Schröder HC, Kljajic Z, Wegner R, Reuter P, Gasic M, Uhlenbruck G, Kurelac B, Müller WEG 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity "in vitro" via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. *Antivir Chem Chemother* 1: 99-105.
- Sepecic K, Batista U, Vacelet J, Macek P, Turk T 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp Biochem Phys C* 117: 47-53.
- Tunkijjanukij S, Olafsen JA 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. *Dev Comp Immunol* 22: 39-150.