



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

**MAURILIO FEIJO DE SOUSA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO COMPARATIVO DAS LECTINAS DE**  
**ALGAS MARINHAS VERMELHAS *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion***  
***triquetrum* (BTL)**

**FORTALEZA**

**2022**

MAURILIO FEIJO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO COMPARATIVO DAS LECTINAS DE  
ALGAS MARINHAS VERMELHAS *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion triquetrum*  
(BTL)

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.  
Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

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)

---

S697c Sousa, Maurilio Feijo de.  
Caracterização estrutural e estudo comparativo das lectinas de algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion triquetrum* (BTL) / Maurilio Feijo de Sousa. – 2022.  
58 f. : il. color.

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

1. Lectinas. 2. Algas. 3. *Bryothamnion*. 4. Estrutura. 5. Aglutinação. I. Título.

CDD 639.2

---

MAURILIO FEIJO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO COMPARATIVO DAS LECTINAS DE  
ALGAS MARINHAS VERMELHAS *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion triquetrum*  
(BTL)

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

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Dra. Renata Pinheiro Chaves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele na minha vida nada seria possível. Só Ele sabe o quanto sonhei chegar até aqui, mesmo com todos os problemas enfrentados.

À minha mãe, Mazé Feijo, que sempre esteve ao meu lado, me apoiou em todas as minhas escolhas e nunca deixou de acreditar em mim.

Ao meu pai Mauricio e meu irmão Bruno, que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim e me dando todo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, primeiramente pela oportunidade que me deu de ser seu orientando, por todo ensinamento repassado, pelo apoio e atenção para comigo e pela disponibilidade de me ajudar em todos os momentos, em especial nas coletas.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, que me acompanhou desde o momento que entrei no laboratório, se mostrando solícito em todos os momentos e estando sempre presente e disposto a ajudar no que precisava.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, por aceitar fazer parte da minha banca, pelos ensinamentos, oportunidades, e em especial, por ter me emprestado um pouco da lectina da BSL para minha pesquisa, atitude essa que nunca esquecerei.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves, técnica do laboratório, a qual sou muito grato por toda a ajuda que me deste desde o início, pela contribuição neste trabalho e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

À Andressa Rocha, pela sua orientação, ajuda, paciência e repasse de seus conhecimentos, sendo a responsável por praticamente tudo que aprendi durante todos esses anos no laboratório. Ela que sempre me orientou, ajudou em todos os processos deste trabalho, explicando tudo da forma mais clara possível para que eu pudesse entender e sempre solícita quando precisava. Sorte a minha de tê-la como “mãe de laboratório”. Muito obrigado por tudo.

Aos meus ‘irmãos’ e companheiros de bancada, Manoel Ferreira e Elany Rodrigues, por toda a ajuda, troca de conhecimentos e pela amizade durante todo esse período.

Aos amigos de laboratório Levi, Philippe, Eduardo, Jéssica, Israel, Aline, Renato, Pedro Arthur, Juliana, Vinícius, Pedro Abílio e Regi, por me ajudarem em vários processos deste trabalho, desde a retirada de epífitas das algas à maceração.

Aos meus amigos e “sobreviventes” da turma, Lethicia, Ana Clayne, Rafael, Ariele, Samile, Emilly e Fabíola, responsáveis por tornarem os dias na universidade mais prazerosos, me ajudando nas disciplinas quando precisava e nas trocas de conversas pela cantina ou pelo

departamento. Além daqueles que não continuaram no curso mas que tiveram uma grande parcela de ajuda na minha formação acadêmica, Aldair, Lícia, Gabriela e Alan.

A todos os professores do qual fui aluno, minha eterna gratidão por todo o conhecimento repassado durante esses longos cinco anos. Levarei comigo recordações de todas as disciplinas, algumas boas outras nem tanto, responsáveis pelo meu crescimento e formação profissional.

“A caneta é capaz de transformar e mudar o destino  
de um povo”

Bráulio Bessa

## RESUMO

As algas marinhas são as principais responsáveis pelo fornecimento de oxigênio do planeta por serem fotossintetizadoras, sendo consideradas o pulmão mundial. Além de usadas como indicadores naturais da poluição ambiental, elas são potentes na área biotecnológica devido a alguns de seus componentes isolados, como as lectinas, que apresentam um grande potencial em atividades biológicas. Essa atividade ocorre através das interações da proteína com os carboidratos, que são observadas por meio de estudos estruturais. Deste modo, o presente trabalho objetivou realizar uma caracterização estrutural de duas lectinas oriundas das algas marinhas vermelhas, *Bryothamnion triquetrum* (BTL) e *Bryothamnion seaforthii* (BSL), e observar o efeito aglutinante contra cepas bacterianas, além de comparar os resultados obtidos. Assim, BTL e BSL foram purificadas conforme protocolo já estabelecido, a partir de uma combinação de precipitação salina e de cromatografia de troca iônica, apresentando em SDS-PAGE massa molecular semelhante ao já encontrado em estudos anteriores, de 9 kDa. A atividade hemaglutinante das lectinas foi inibida por mucina submaxilar bovina e tireoglobulina. Através do dicroísmo circular, observou-se a estrutura secundária das lectinas, que para BTL mostrou 10% de  $\alpha$ -hélice, 56% de folhas- $\beta$  e 34% de estruturas randômicas, com uma alta estabilidade térmica e temperatura de *melting* de 74,4 °C. E para BSL 5% de  $\alpha$ -hélice, 51% de folhas- $\beta$  e 44% de estruturas randômicas, com uma estabilidade térmica um pouco menor e temperatura de *melting* de 66 °C. As suas estruturas tridimensionais apresentaram conformações semelhantes, com uma predominância de folhas- $\beta$ , além de mostrarem o CBD\_II como o principal domínio de reconhecimento a carboidratos. Tanto BSL quanto BTL apresentaram aglutinação contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, nas concentrações de 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Com esse estudo, pode-se concluir que BTL e BSL compartilham de muitas características semelhantes relacionadas as suas estruturas e especificidade, provavelmente devido ao fato de serem lectinas isoladas de duas algas marinhas do mesmo gênero e oriundas do mesmo local.

**Palavras-chave:** Lectinas; Algas; *Bryothamnion*; Estrutura; Aglutinação.



## ABSTRACT

Seaweeds are the main responsible for supplying the planet's oxygen because they are photosynthesizers, being considered the world's lung. In addition to being used as natural indicators of environmental pollution, they are potent in the biotechnology area due to some of their isolated components, such as lectins, which have great potential in biological activities. This activity occurs through the interactions of protein with carbohydrates, which are observed through structural studies. Thus, the present work aimed to carry out a structural characterization of two lectins from red marine algae, *Bryothamnion triquetrum* (BTL) and *Bryothamnion seaforthii* (BSL), and to observe the binding effect against bacterial strains, in addition to comparing the results obtained. BTL and BSL were purified according to an established protocol, using a combination of saline precipitation and ion-exchange chromatography, presenting a molecular mass similar to that found in previous studies, of 9 kDa on SDS-PAGE. The hemagglutinating activity of lectins was inhibited by bovine submaxillary mucin and thyroglobulin. Through circular dichroism, the secondary structure of lectins was observed, which for BTL showed 10%  $\alpha$ -helix, 56%  $\beta$ -sheets and 34% random structures, with a high thermal stability and *melting* temperature of 74, 4 °C. And for BSL 5%  $\alpha$ -helix, 51%  $\beta$ -sheets and 44% random structures, with a slightly lower thermal stability and *melting* temperature of 66 °C. Their three-dimensional structures showed similar conformations, with a predominance of  $\beta$ -sheets, in addition to showing CBD\_II as the main carbohydrate recognition domain. Both BSL and BTL showed agglutination against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, at concentrations of 1 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.1 mg.mL<sup>-1</sup>. With this study, it can be concluded that BTL and BSL share many similar characteristics related to their structures and specificity, probably due to the fact that they are lectins isolated from two seaweeds of the same genus and from the same location.

**Keywords:** Lectins; Algae; *Bryothamnion*; Structure; Agglutination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Algas marinhas <i>Bryothamnion triquetrum</i> e <i>Bryothamnion seaforthii</i> .....	21
Figura 2 – SDS-PAGE da purificação da BTL e BSL.....	30
Figura 3 – Espectros de dicroísmo circular da BTL e BSL.....	32
Figura 4 – Avaliação do efeito de temperatura sobre as estruturas secundárias da BTL e BSL.....	33
Figura 5 – Avaliação da Temperatura de <i>Melting</i> de BTL e BSL.....	34
Figura 6 – Estrutura tridimensional predita da BTL e BSL.....	38
Figura 7 – Localização da BTL no compartimento celular.....	40
Figura 8 – Localização da BSL no compartimento celular.....	40
Figura 9– Teste de aglutinação da BTL contra as cepas bacterianas.....	42
Figura 10– Teste de aglutinação da BSL contra as cepas bacterianas.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados oriundos do Dicroísmo Circular (DC).....	34
Tabela 2 – Inibição da atividade hemaglutinante.....	35
Tabela 3 – Resultados obtidos pelo programa C-I-TASSER.....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Algas Marinhas</b> .....	14
<i>1.1.1</i>	<i>Compostos isolados de algas marinhas</i> .....	15
<b>1.2</b>	<b>Lectinas</b> .....	16
<i>1.2.1</i>	<i>Lectinas de algas marinhas</i> .....	17
<i>1.2.2</i>	<i>Aplicações biotecnológicas de lectinas de algas marinhas</i> .....	19
<b>1.3</b>	<b>Gênero <i>Bryothamnion</i></b> .....	21
<i>1.3.1</i>	<i>Lectinas do gênero <i>Bryothamnion</i></i> .....	21
<i>1.3.1.1</i>	<i><i>Bryothamnion triquetrum</i></i> .....	22
<i>1.3.1.2</i>	<i><i>Bryothamnion seaforthii</i></i> .....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	24
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	25
<b>3.1</b>	<b>Coleta de algas e purificação das lectinas BTL e BSL</b> .....	25
<b>3.2</b>	<b>Avaliação da pureza das lectinas</b> .....	25
<b>3.3</b>	<b>Dicroísmo circular da BTL e BSL</b> .....	26
<b>3.4</b>	<b>Teste de inibição da atividade hemaglutinante com as duas lectinas</b> .....	26
<b>3.5</b>	<b>Modelagem da estrutura tridimensional das proteínas</b> .....	27
<i>3.5.1</i>	<i>Análise do domínio de reconhecimento a carboidratos</i> .....	27
<i>3.5.2</i>	<i>Predição estrutural</i> .....	27
<b>3.6</b>	<b>Aglutinação de bactérias</b> .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>4.1</b>	<b>Purificação das lectinas BTL e BSL</b> .....	29
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da pureza das lectinas</b> .....	30
<b>4.3</b>	<b>Dicroísmo circular da BTL e BSL</b> .....	31
<b>4.4</b>	<b>Teste de inibição da atividade hemaglutinante com as duas lectinas</b> .....	35
<b>4.5</b>	<b>Modelagem da estrutura tridimensional das proteínas</b> .....	37
<i>4.5.1</i>	<i>Análise do domínio de reconhecimento a carboidratos</i> .....	37
<i>4.5.2</i>	<i>Predição estrutural</i> .....	38
<b>4.6</b>	<b>Aglutinação de bactérias</b> .....	41
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas Marinhas

As algas marinhas possuem uma grande diversidade morfológica no que se refere ao seu tamanho e forma, além de uma organização celular muito variada. São amplamente diversificadas, podendo ser encontradas em inúmeros ambientes como na coluna d'água, por debaixo do gelo em zonas polares ou fixadas em substrato (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). Além disso, por meio de sua morfologia e tamanho, as algas podem ser classificadas como microalgas (organismos microscópicos fotossintéticos, sendo muitos deles unicelulares) e macroalgas (compostos por múltiplas células e bem estruturados que assemelham-se a plantas terrestres) (JOHN *et al.*, 2011).

Elas apresentam uma grande importância ecológica e ocupam o lugar de produtores primários, formando a base da cadeia alimentar de lagos e oceanos. Grande parte delas são fotossintetizadoras, assim, para seu crescimento e produção de alimento é necessário a presença de luz, água e dióxido de carbono, e geralmente não necessitam de compostos orgânicos do ambiente. Da fotossíntese, elas geram oxigênio e carboidratos essenciais para outros organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Essa característica torna as algas marinhas as principais responsáveis pela produção de oxigênio do planeta, com uma eficiência maior que as das plantas terrestres, já que podem impactar na capacidade de tamponamento do carbono inorgânico dissolvido da água do mar, resultando no aumento do pH e queda na pressão parcial de CO<sub>2</sub> na água, promovendo uma grande importância no equilíbrio da natureza (BHOLA *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2017).

No ambiente marinho, as algas apresentam um elevado número de espécies com uma ampla diversidade e servem como fonte de nutrientes para uma grande variedade de organismos aquáticos. Elas também servem de abrigo, de berçário e de refúgio para muitas espécies de invertebrados e pequenos vertebrados (BASÍLIO, 2020).

Existe um extenso grupo de macroalgas, e estas podem ser classificadas de acordo com os pigmentos que possuem, sendo divididas em: algas verdes (Chlorophyta), marrons ou pardas (Phaeophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta) (BUGS *et al.*, 2018). As algas verdes estão presentes em praticamente todos os *habitats* do planeta. Sua parede celular é bastante diversificada estruturalmente, constituída principalmente por glicoproteínas, polissacarídeos sulfatados e polímeros fibrilares, variando muito de espécie para espécie. Algumas delas ainda, possuem como principal componente fibrilar a celulose (DOMOZYCH *et al.*, 2012). A

divisão Phaeophyta representa as algas pardas macroscópicas, onde mais de 1.500 espécies já foram identificadas. Sua cor amarronzada se dá devido as grandes quantidades do carotenóide fucoxantina, que mascara outros pigmentos (ALI *et al.*, 2017). Já as algas vermelhas são abundantes principalmente em águas tropicais, podendo ocorrer também em regiões mais frias. Como características, elas possuem a presença dos polissacarídeos ágar ou carragenana na composição da parede celular, presença de ficoeritrina como pigmento acessório e amido das florídeas como produto de reserva (AMORIM *et al.*, 2016).

### ***1.1.1 Compostos isolados de algas marinhas***

As algas apresentam diversos compostos que, quando isolados, demonstram um enorme potencial biotecnológico. Observa-se que alguns desses componentes são biologicamente ativos, como exemplo as ficobilinas, ácidos graxos, polissacarídeos, proteínas, vitaminas, entre outros. Alguns desses compostos possuem atividades biológicas favoráveis ao ser humano, apresentando controle de tumores, trombose e obesidade (CABRAL *et al.*, 2011). Além do mais, elas demonstram ser bastante promissoras na área sustentável, sendo utilizadas como fonte de alimento e nutracêuticos, na produção de bioplásticos e biopolímeros, em tratamento de efluentes e na criação de matérias-primas e produtos de alto valor, que já eram produzidos por plantas terrestres. (FABRIS *et al.*, 2020).

Em algas marinhas vermelhas, pode-se observar a extração de ácidos graxos, terpenos, pigmentos, compostos fenólicos, vitaminas e proteínas (COTAS *et al.*, 2020). Esses compostos isolados já provaram possuir várias propriedades importantes para utilização na indústria, gerando produtos nas vertentes farmacêuticas, biomédica e de cosmética. As capacidades antioxidante, anticoagulante, anticancerígena, antiviral/anti-HIV e anti-inflamatório são apenas alguns das aplicações que demonstram o quão promissor são seus derivados, além de poder ser administrados em tratamentos de feridas e na medicina regenerativa (KHALID *et al.*, 2018; RAPOSO, 2015).

No setor farmacêutico, as algas podem ser usadas como potencial candidato de interesse, pois são ricas fontes de compostos biologicamente ativos peculiares, incluindo metabólitos primários e secundários. Elas são fornecedoras de uma gama de produtos para esta área, pois podem ser exploradas para aplicações comerciais como vacinas e nutrientes que muitas vezes não estão disponíveis de outra forma ou não são produzidos devido seu alto valor (SHARMA; SHARMA, 2017).

Essa alta variabilidade natural das moléculas bioativas pode ser explicada, dentre outros fatores, por suas relações evolutivas, diversificação química e ecológica. Além disso, a variação na concentração de compostos marinhos bioativos das algas é bastante influenciada por mudanças ambientais como luz, nutrientes, salinidade, contaminantes, pH, temperatura, disponibilidade de CO<sub>2</sub> e interações bióticas (KHALID *et al.*, 2018).

Quando comparadas com outros organismos que também são importantes para estudos biotecnológicos, as algas marinhas possuem um grande diferencial, a capacidade de ser cultivada e, conseqüentemente, produzir em grande quantidade compostos bioativos vinculado a alguma espécie (BENEDETTI *et al.*, 2018).

Como foi relatado, as algas são uma ótima fonte de componentes bioativos, dentre elas as proteínas. Estas, apresentam perfis completos de aminoácidos essenciais, possuindo um teor proteico maior que outras fontes convencionais, como os alimentos carne, ovo e afins. Entretanto, alimentos a base de algas ainda são escassos no mercado (KOYANDE, 2019).

## 1.2 Lectinas

Lectinas formam um grupo de proteínas de origem não imune que se ligam reversivelmente aos carboidratos. Elas não estão envolvidas na síntese ou catálise dos mesmos e não pertencem as principais classes de imunoglobulinas (KILPATRICK, 2000).

A palavra lectina tem origem do latim “*legere*”, que tem como significado ‘selecionar’ (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Elas foram descritas no final do século XIX como sendo proteínas de plantas que possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos (SELL; COSTA, 2000). Presente na natureza, as lectinas são encontradas em vários organismos distintos, dentre eles plantas, animais e microrganismos (GONDIM *et al.*, 2019).

Através de estudos dessas lectinas foi possível descobrir que elas podiam ser específicas a diferentes grupos sanguíneos humanos, sendo esta descoberta muito importante para se determinar o tipo sanguíneo de cada indivíduo. Além disso, a maioria delas aglutinam eritrócitos dos diferentes grupos de sangue humano, atuando em concentrações semelhantes (HERNANDEZ DIAZ *et al.*, 1999).

Até o início os anos 70, as lectinas já tinham sido observadas em diferentes organismos, principalmente plantas, mas poucas eram as que tinham sua purificação realizada. Esse fato só mudou com a introdução da cromatografia de afinidade, originalmente para o isolamento de concanavalina A, do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), sendo a primeira hemaglutinina obtida de forma pura (SHARON; LIS, 2004).



A principal característica das lectinas, que é a presença de locais de ligações para carboidratos específicos, é essencial para a determinação do seu papel biológico (SANTOS *et al.*, 2014). Em alguns processos, tais como infecções bacterianas, parasitárias e virais, é necessário conhecer as interações que ocorrem entre proteínas e carboidratos, e para tal finalidade, os estudos de lectinas se tornam imprescindíveis, já que elas possuem essa capacidade única de identificar informações codificadas na estrutura tridimensional (WIEDERSCHAIN, 2013).

Observou-se que a interação das lectinas com as células pode ser inibida, na maioria das vezes, por açúcares. Isso levou a conclusão de que elas se ligam a sacarídeos na superfície celular, fornecendo assim, marcadores úteis para técnicas histoquímicas e para microscopia eletrônica no estudo da estrutura e função da membrana plasmática (HERNANDEZ DIAZ *et al.*, 1999).

O interesse por lectinas foi estimulado através da observação de que elas são ferramentas inestimáveis para se realizar a detecção, o isolamento e a caracterização de glicoconjugados, em especial de glicoproteínas. Ainda, esse interesse também surgiu pois observou-se que elas servem para o exame de alterações que ocorrem nas superfícies celulares durante processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (LAM; NG, 2011).

É sabido que muitos estudos já foram realizados com lectinas, podendo ser observado diversas atividades já relatadas, como atividade antifúngica (NABETAH *et al.*, 2021), efeito antibiofilme (CARNEIRO *et al.*, 2017), atividade antibacteriana (BJARNASON; MAGNUSDOTTIR, 2021), anti-inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2012), antiviral (GONDIM *et al.*, 2019) e anticâncer (HUNG; TRINH, 2021). Além disso, recentes estudos mostram a eficiência das lectinas contra o vírus SARS-CoV-2, vírus este responsável pela catastrófica pandemia de COVID-19 (SHEEHAN *et al.*, 2020).

### ***1.2.1 Lectinas de algas marinhas***

Nas algas marinhas, as proteínas estão presentes em diversas formas e locais, como enzimas, componente da parede celular e ligadas a carboidratos e pigmentos. Além dos aminoácidos essenciais, algumas espécies possuem proteína com capacidades biotivas, como ficobiliproteínas e lectinas (STENGEL *et al.*, 2011).

Quando comparadas com os demais organismos as lectinas de algas marinhas foram isoladas e caracterizadas lentamente, sendo identificadas pela primeira vez em 1966 por Boyd

e Almodóvar. Eles foram os responsáveis por relatar a primeira observação de lectinas em algas marinhas (CALVETE *et al.*, 2000). As lectinas de algas marinhas se diferenciam das lectinas vegetais em várias características físico-químicas. Elas são proteínas monoméricas, ou seja, apresentam baixo peso molecular, possuem alta proporção de aminoácidos ácidos e ponto isoelétrico na faixa de 4 a 6. Comumente, apresentam menor afinidade por monossacarídeos e maior afinidade por oligossacarídeos e/ou glicoproteínas, além de não necessitarem de íons metálicos para suas atividades biológicas (ROGERS; HORI, 1993).

As lectinas de algas marinhas podem ser agrupadas em três categorias principais distintas com base nas suas propriedades de ligação a carboidratos, sendo elas: lectinas específicas de N-glicano de tipo complexo; lectinas específicas de N-glicano com alto teor de manose; e lectinas com ambas as especificidades citadas acima (SINGH; THAKUR; BANSAL, 2015).

Em relação a suas estruturas, há poucas lectinas de algas marinhas caracterizadas, mas seu estudo se faz importante para se fornecer medidas das taxas de mudanças na própria estrutura, que em grande parte são essenciais para suas funções biológicas. Entretanto, apesar das poucas informações nesta área, os resultados já disponíveis mostraram que existe uma variedade de famílias em diferentes espécies estudadas (TEIXEIRA *et al.*, 2012; SHARON *et al.*, 2005). Como exemplo, as lectinas das macroalgas marinhas vermelhas *Hypnea cervicornis* e *Hypnea musciformis*, encontradas na costa brasileira, quando comparadas as lectinas da *Hypnea japonica*, encontrada na costa do Japão, é possível observar diferenças estruturais entre elas, evidenciando esta variedade entre espécies do mesmo gênero em ambientes distintos (NAGANO *et al.*, 2005).

Enquanto as lectinas isoladas das algas vermelhas *Eucheuma serra*, *E. amakusaensis* e *E. cottonii* apresentaram características e sequência N-terminal semelhantes, sugerindo que as lectinas de espécies deste gênero estão agrupadas em uma mesma família de lectinas de algas (KAWAKUBO *et al.*, 1999).

Para a estrutura secundária, algumas lectinas de algas marinhas já foram estudadas e determinadas, como a AML, da *Amansia multifida*, que apresentou em sua estrutura muitas conformações em folhas- $\beta$ , assim como a a SfL da alga *Solieria filiformis*, ambas determinadas por meio da técnica de Dicroísmo Circular (DC), sendo esta muito importante para se examinar a estrutura e estabilidade de proteínas em solução (ABREU *et al.*, 2022; FONTENELLE *et al.*, 2018; MESQUITA *et al.*, 2021).

Poucas lectinas de algas marinhas possuem sua estrutura tridimensional determinada. A lectina GRFT, isolada da alga marinha vermelha *Griffithsia* sp., descrita por Ziólkowska e Wlodawer (2006), foi a primeira lectina de alga com a estrutura tridimensional determinada. Outras lectinas de macroalgas marinhas possuem sua estrutura tridimensional predita por programas computacionais, como a SfL-1 e SfL-2, isoformas da lectina isolada da *Solieria fioliformis* (CHAVES *et al.*, 2017).

Muitas lectinas já foram observadas em algas marinhas, sendo encontradas em maior abundância nas algas vermelhas. Nos últimos anos, as algas marinhas vermelhas se tornaram importantes fontes de lectinas, e deste modo muitas delas têm sido isoladas e caracterizadas (SINGH; WALIA, 2018). A primeira que foi purificada e teve sua caracterização realizada parcialmente foi a lectina da alga *Ptilota plumosa* (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). As lectinas encontradas nesse grupo apresentam especificidade de carboidratos para glicoproteínas complexas ou para N-glicanos de alta manose, e devido a isto, essas interações geram respostas bioquímicas na qual pode-se utilizar em pesquisas para a ciência. Assim sendo, devido essa sua propriedade de reconhecimento, elas são potenciais candidatas para a inibição de inúmeras doenças virais (SINGH; WALIA, 2018).

### ***1.2.2 Aplicações biotecnológicas de lectinas de algas marinhas***

Nos últimos anos houve um aumento no isolamento e nas aplicações biotecnológicas de lectinas de algas, resultante do aumento da demanda por novas substâncias biologicamente ativas (SINGH; THAKUR; BANSAL, 2015). Isso se deu porque observou-se que essas proteínas apresentam um alto potencial em várias áreas do ramo biotecnológico, devido algumas de suas características como: tamanho molecular e seletividade para carboidratos complexos, glicoconjugados presentes na superfície celular e estabilidade térmica e química (NAGANO *et al.*, 2002).

É notório o potencial que as lectinas oriundas de algas marinhas possuem em várias atividades, como atividade antiviral, anti-inflamatória, anticancerígena, antinociceptivos e antibacteriana, possuindo, em alguns casos, a capacidade de diagnóstico e de tratamento seletivo (SINGH; WALIA, 2018).

A lectina extraída da macroalga vermelha *Hypnea musciformis* diminui de forma significativa a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em uma concentração de 250 µg/mL, e apresentou uma pequena redução nas células de *Staphylococcus aureus* quanto

ao número de células viáveis (VASCONCELOS, 2013). Também, notou-se a primeira evidência de atividade antifúngica de Q-Griffithsin (Q-GRFT), variante recombinante resistente à oxidação de Griffithsin, que se liga a  $\alpha$ -manana na parede celular de *Candida albicans* (NABETAH *et al.*, 2021).

Segundo estudos de Rodrigues e colaboradores (2012), os resultados dos efeitos analgésicos e anti-inflamatório do Cc-SP<sub>2</sub>, fração da alga verde *Caulerpa curpressoides*, podem ser aplicados na biomedicina como ferramenta natural na dor e inflamações agudas. A lectina oriunda da alga vermelha *S. filiformis* também possui capacidades de efeito anti-inflamatório, além de possuir importância em atividades antinociceptivas, representando um potente agente terapêutico para estudos futuros (ABREU *et al.*, 2016).

Várias lectinas já mostraram atividade antiviral altamente potente, dentre elas as lectinas Sfl e HML, originadas das algas *S. filiformis* e *H. musciformis*. Esses achados indicaram que essas lectinas podem gerar novos compostos antivirais com grande potencial terapêutico (GONDIM *et al.*, 2019). A lectina da alga vermelha *Kappaphycus striatus*, KSL, já mostrou efeitos anti-cancerígenos contra cinco linhagens celulares de carcinoma, tornando-se uma boa fonte funcional para aplicações nesta área (HUNG; TRINH, 2021).

A GRFT, possui um alto potencial biotecnológico apresentando ação antiviral contra o vírus do HIV (O'KEEFE *et al.*, 2009) e antiviral in vitro, combinada com carragenina, contra o da herpes simplex 2 (HSV-2) e o papilomavírus humano (HPV) (LEVENDOSKY *et al.*, 2015). Além disso, no último ano esta lectina se apresentou positivamente eficaz contra o vírus SARS-CoV-2 (ALSAIDI *et al.*, 2021).

O vírus do SARS-CoV possui proteínas S que são altamente N-glicosiladas, assim, algumas lectinas advindas de algas marinhas como ASL-1 e ASL-2 da alga *Agardhiella subulata*, BU14 (*Porphyra umbilicalis*), MeL (*Meristiella echinocarpa*), Sfl (*Solieria filiformis*) e KAA-2 (*Kappaphycus alvarezii*) por exemplo, possuem conformações estruturais capazes de reconhecer as proteínas S de coronavírus, sendo assim, potentes candidatas para atividades contra este vírus (BARRE *et al.*, 2021).

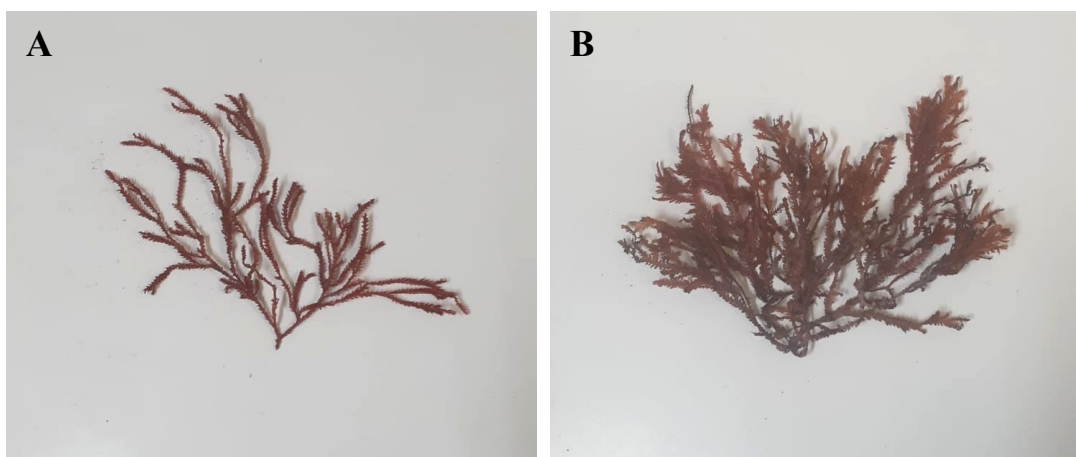
Em relação a atividade antibacteriana, as lectinas de algas já demonstraram possuir efeitos contra algumas cepas, como as do gênero *Vibrio* por exemplo (HAZEN *et al.*, 2007). A lectina EDA, da alga marinha *Eucheuma denticulatum*, inibiu o crescimento bacteriano do *V. alginolyticus* (HUNG *et al.*, 2015a), assim como a lectina da alga *Kappaphycus striatum*, a KSA-2, que além da inibição do *V. alginolyticus*, inibiu o crescimento de *Enterobacter cloacae* (HUNG *et al.*, 2015b).

### 1.3 Gênero *Bryothamnion*

As algas do gênero *Bryothamnion* estão dispostas no filo Rhodophyta, sendo elas encontradas ao longo da costa da América do Sul e do Oceano Atlântico. Segundo Guiry e Guiry (2019), as algas deste gênero possuem como características talos eretos com até 20 cm de altura, ramos rígidos, cilíndricos, triangulares ou achatados em seção e determinados na maioria dos segmentos.

Este gênero foi inicialmente descrito por Kützinger em 1843 sem uma designação da espécie-tipo. No início foram descritas duas espécies, a *Bryothamnion seaforthii* e a *Bryothamnion lindenbergii*, sendo a primeira baseada na *Fucus seaforthii* Turner e a segunda na *Thamnophora disticha* Lindenberg. Mas foi em 1849 que Kützinger fundiu o gênero *Physcophora* em *Bryothamnion* e reconheceu cinco espécies, três deles com ramos complanados, *B. seaforthii* Kützinger, *B. ramellosum* Sonder e *B. lindenbergii* Kützinger e duas espécies de ramos triangular, *B. triangulare* e *B. hipnoides*. Em 1889, a espécie-tipo do gênero foi designada, *Bryothamnion seaforthii*, entretanto, atualmente apenas três das seis espécies descritas permanecem em vigor, sendo a *B. triquetrum* e a *B. seaforthii* (FIGURA 1) as mais relatadas em regiões tropicais e subtropicais (GARCÍA-SOTO; LOPEZ-BAUTISTA, 2018).

Figura 1 – Algas marinhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*.



Fonte: Autor. A: *Bryothamnion triquetrum* e B: *Bryothamnion seaforthii*.

#### 1.3.1 Lectinas do gênero *Bryothamnion*

Segundo a literatura, alguns compostos extraídos de espécies desse gênero já mostraram possuir propriedades terapêuticas como anti-inflamatório, antioxidantes e antibacteriano (FONTENELLE *et al.*, 2018; ALVES, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Dentre as espécies presentes neste gênero, duas delas se destacam em relação as suas lectinas, a *Bryothamnion seaforthii* e a *Bryothamnion triquetrum*. As lectinas pertencentes a essas espécies apresentam massa molecular na faixa de <10 kDa, 91 aminoácidos e uma grande resistência a altas temperaturas (AINOUZ *et al.*, 1995).

#### 1.3.1.1 *Bryothamnion triquetrum*

No ano de 2000, a BTL, lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*, foi a primeira a possuir sua estrutura primária determinada. Apresentada em SDS-PAGE como uma banda larga com cerca de 6-8 kDa de massa molecular, composta por 91 aminoácidos e exibindo três isoformas (8949,8 m/z, 8964,5 m/z e 8980,0 m/z). Esta lectina possui duas pontes dissulfeto intracadeias, e isso pode estar relacionado à sua alta estabilidade térmica e sua capacidade de potencialmente oligomerizar (CALVETE *et al.*, 2000).

Sua estrutura secundária também já foi determinada, por meio de espectroscopia de dicroísmo circular, sendo composta principalmente por  $\beta$ -fitas, apresentando grande resistência a variações de temperatura e pH. Além disso, a BTL apresentou efeitos anti-inflamatórios em grupos de camundongos (FONTENELLE *et al.*, 2018).

Esta lectina também se mostrou potente na proteção a danos causados pela diabetes induzidas, evidenciando possuir atividades anti-hiperglicêmica e antioxidante, diminuindo os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides em ratos (ALVES, 2015). Ainda, ela foi capaz de inibir a aderência em estreptococos, obtendo resultados estatisticamente significativo para *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sobrinus* (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Em outros estudos, observou-se que a BTL mostrou capacidade de diferenciar variantes de células de carcinoma de cólon humano em relação aos seus glico-receptores de membrana celular (PINTO *et al.*, 2009). Assim, esta lectina tem potencial anticancerígeno e também pode ser usada como agente de liberação de drogas devido à sua especificidade de carboidratos (SINGH; WALIA, 2018).

#### 1.3.1.2 *Bryothamnion seaforthii*

A lectina da *Bryothamnion seaforthii*, BSL, possui a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos e de coelho, perdendo sua capacidade de aglutinar eritrócitos na presença das glicoproteínas fetuína, avidina e mucina. Em SDS-PAGE ela é observada como uma banda larga com uma massa molecular aparente de 9 kDa na presença e na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol. A análise por espectrometria de massas revelou que BSL contém uma mistura de cinco isoformas, nomeadas de: BSL1, BSL2, BSL3, BSL4 e BSL5 em  $m/z$  8898,1 +/- 2, 8960,8 +/- 2, 9012,8 +/- 2, 9065,8 +/- 2 e 9096,1 +/- 2, respectivamente. Essas isoformas são polipeptídeos compostos por 91 resíduos de aminoácidos, incluindo quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto intracadeia (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

Assim como a BTL, a BSL também tem sido usada para diferenciar variantes de células de carcinoma de cólon humano (PINTO *et al.*, 2009), e pode bloquear de forma eficiente a adesão dos estreptococos orais aos seus receptores de mucina na película adquirida por meio de um mecanismo de competição, inibindo mais de 75% da adesão de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

A lectina também apresentou atividades anti-hiperglicêmicas e antioxidantes em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (DE ALENCAR ALVES *et al.*, 2020), diminuiu a formação de biofilme de *S. aureus* em concentrações variando de 31,25 a 250  $\mu\text{g/mL}$  (VASCONCELOS, 2013), é uma potente candidata para atividade antiviral (GONDIM *et al.*, 2019), além de apresentar efeito pró-cicatrizante em camundongos, possivelmente por induzir células do sistema imunológico na fase inflamatória (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

## 2 OBJETIVO

### Objetivo geral

Caracterizar estruturalmente as lectinas BTL e BSL oriundas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*, respectivamente, e observar o efeito aglutinante contra cepas bacterianas. Além de realizar um comparativo entre as mesmas.

### Objetivo específico

- Determinar a estrutura secundária da BSL e BTL através do dicroísmo circular;
- Avaliar os efeitos de temperatura na estrutura secundária das duas lectinas;
- Estabelecer a especificidade por glicoproteínas da BSL e BTL;
- Realizar uma predição da estrutura tridimensional das duas proteínas;
- Avaliar a capacidade de aglutinação bacteriana das lectinas contra diferentes cepas;
- Analisar comparativamente os resultados obtidos da BSL e BTL.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta de algas e purificação das lectinas BTL e BSL

Espécimes das algas vermelhas *B. triquetrum* e *B. seaforthii* foram coletados na região entre marés da praia da Pedra Rachada, no município do Paracuru, no Ceará. A coleta e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados e regulados pelos órgãos competentes (SISBIO ID; 33913-8 e SISGEN ID; AC14AF9).

O material foi limpo de epífitas e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até ser usado. A purificação da BTL e da BSL foi realizada, separadamente, de acordo com os métodos utilizados por Ainouz *et al.*, (1995), com algumas modificações. As algas foram descongeladas, lavadas com água destilada e moídas até se tornarem um pó fino sob o uso de nitrogênio líquido, extraídas com três volumes de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM por cerca de 16 h sob agitação, filtradas em um tecido de náilon e centrifugadas em  $7000\times g$  por 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi acidificado e mantido a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de aproximadamente 2 h e 30 min. Os precipitados foram removidos por centrifugação a  $15000\times g$  por 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi ajustado para pH 7,0 e, então, foi realizada uma precipitação com sulfato de amônio na saturação de 60%. As proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação, ressuspensas em um volume pequeno de tampão fosfato (PB) 20 mM, pH 7,0 e aplicadas a uma coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada e lavada com PB, sendo em seguida eluída com NaCl 1 M no mesmo tampão. Frações de 2 mL foram coletadas manualmente a um fluxo de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e analisadas por um espectrofotômetro para medir a absorvância a 280 nm e testadas para atividade hemaglutinante com sangue de coelho. As frações não adsorvidas foram recromatografadas na mesma coluna, reunidas, dialisadas contra água e liofilizadas.

#### 3.2 Avaliação da pureza das lectinas

O grau de pureza da BTL e BSL foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, corado com Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970). O gel de 15% foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1 h.

A massa molecular das lectinas já estimada anteriormente por SDS-PAGE (CALVETE *et al.*, 2000; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012) foi observada novamente comparando com

marcador de massa molecular referente a HSA (Albumina sérica humana) de 66 kDa, rSfL (lectina recombinante de *Solieria filiformis*) de 30 kDa e CCL (lectina de *Chondrilla caribensis*) de 15 kDa.

### 3.3 Dicroísmo circular da BTL e BSL

A determinação da composição de estrutura secundária da BTL e BSL foi realizada utilizando um espectropolarímetro, Jasco J-810 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) ligado a um peltier com temperatura controlada.

As lectinas foram suspensas em uma solução contendo fosfato 20 mM e pH 7, e em uma concentração aproximada de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> foram dispostas em uma cubeta de quartzo retangular com um caminho ótico de 1 mm e cada espectro adquirido com uma média de 8 acumulações, com resolução 1 nm e velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup>. A aquisição foi realizada de 190-250 nm (UV distante).

As porcentagens das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha e conformação desordenada foram estimadas utilizando o algoritmo e base de dados Selcon 3 (SREERAMA; WOODY, 2000) acessado pelo servidor DichroWeb (WHITMORE; WALLACE, 2008).

Para a determinação da temperatura de *melting* as lectinas, separadamente, foram submetidas a uma rampa de temperatura variando de 23 a 95 °C, enquanto a elipicidade foi monitorada a 210 nm (GREENFIELD, 2007).

### 3.4 Teste de inibição da atividade hemaglutinante com as duas lectinas

Para a inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados glicoproteínas, como foi descrito previamente por Sampaio *et al.*, (2002). As lectinas foram submetidas a teste de inibição da atividade hemaglutinante, separadamente, para que a especificidade das proteínas fosse observada e determinada a concentração mínima do carboidrato, capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos (CMI – Concentração mínima inibitória).

As glicoproteínas utilizadas foram: Mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), fetuína bovina, mucina submaxilar bovina (BSM), transferrina humana, asialofetuína e tiroglobulina Além disso, também foram utilizados para o teste manana de levedura, LPS (Lipopolissacarídeo) 0111:B4 de *Escherichia coli* e ácido lipotécóico de *Staphylococcus aureus*.

### 3.5 Modelagem da estrutura tridimensional das proteínas

#### 3.5.1 Análise do domínio de reconhecimento a carboidratos

A sequência de aminoácidos das isoformas mais intensas de BTL (8.981 Da) (CALVETE *et al.*, 2000) e BSL (9.064 Da) (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012) foram submetidas ao banco de dados de proteínas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), um recurso online usado para determinar a arquitetura de domínio de proteínas.

#### 3.5.2 Predição estrutural

A predição estrutural e a localização no componente celular da isoforma mais abundantes das lectinas BSL e BTL foram feitas através do servidor C-I-TASSER (ZHENG *et al.*, 2021).

A sequência de aminoácidos da isoforma das duas lectinas foi enviada ao servidor para a modelagem, onde os melhores modelos resultantes do programa foram selecionados com base nas pontuações de C e TM.

### 3.6 Aglutinação de bactérias

O teste de aglutinação foi realizado com as cepas do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) *Escherichia coli* ATCC 11303 (*E.coli* 11), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* 25), *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (*S. aureus* 70), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (*S. epidermidis* 12), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (*S. epidermidis* 35) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa* 27), sendo as cepas *S. aureus* 70 e *S. epidermidis* 12 resistentes a metilina.

A aglutinação de bactérias foi conduzida de acordo com Melo *et al.* (2014), com algumas modificações. As cepas de *E.coli* 11, *S. aureus* 25, *S. aureus* 70, *S. epidermidis* 12, *S. epidermidis* 35 e *P. aeruginosa* 27 foram inoculadas em meio LB (Luria Bertani) a 37 °C por um período de 24 h. Em seguida, foram centrifugadas a 2000×g por 10 min, lavadas 3 vezes com TBS e suspensas em TBS com formaldeído 4%, sendo assim mantidas por mais 24 horas. Após esse período, foram novamente lavadas mais três vezes com tampão TBS para o teste de aglutinação. As bactérias foram ajustadas para uma concentração celular de 2x10<sup>8</sup> CFU a partir de uma curva de calibração predeterminada para cada cepa pelo LIBS por espectrofotômetro.

Para o ensaio de aglutinação foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  da proteína BSL e BTL solubilizadas em TBS nas concentrações de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Em seguida, as proteínas foram incubada com um volume igual de suspensão bacteriana por um período de uma hora. Os resultados foram observados após incubação em um microscópio de luz (Olympus CBB).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação das lectinas BTL e BSL

As proteínas BSL e BTL foram purificadas seguindo o protocolo previamente estabelecido (AINOUZ *et al.*, 1995), utilizando as técnicas de precipitação de proteínas (acidificação e fracionamento com sulfato de amônio 0-60%) e a cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose, cada uma com sua própria coluna cromatográfica. A coluna foi lavada com tampão fosfato 0,02M pH 7,0, onde o pico não retido de ambas, chamado P1-DEAE, foram coletados para a realização de atividade hemaglutinante e testes posteriores.

A acidificação é um tratamento ácido que promove a remoção de pigmentos, que por ventura acabam interferindo nas etapas seguintes, como na cromatografia. A HCA, lectina da alga vermelha *H. cervicornis*, é um exemplo de proteína oriunda de alga que apresentou este processo na sua etapa de purificação (NAGANO *et al.*, 2005).

Um método comumente utilizado para a precipitação de proteínas é o fracionamento com sulfato de amônio. Esta técnica pode promover uma remoção de proteínas, alterando a solubilidade das mesmas, tornando-se assim, uma etapa importante para purificação (ENGLARD; SEIFTER, 1990). O isolamento de lectinas presentes nas algas vermelhas *Solieria filiformis*, *Hypnea musciformis* e *Tichocarpus crinitus* utilizaram este método de precipitação (BENEVIDES; LEITE; FREITAS, 1996; NAGANO *et al.*, 2002; MOLCHANOVA *et al.*, 2010).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica bastante utilizada devido a sua eficiência no isolamento de lectinas, em especial de algas marinhas. Ela é aplicada nas etapas iniciais de purificação e se tratando de algas vermelhas é benéfica na retirada de pigmentos (SINGH; WALIA, 2018). Algumas espécies como *Amansia multifida*, *Caulerpa cupressoides*, *Meristiella echinocarpa* e *Gracilaria canaliculata* são exemplos de algas marinhas vermelhas que tiveram a cromatografia de troca iônica nos processos de purificação de suas respectivas lectinas (MESQUITA *et al.*, 2021; DE QUEIROZ *et al.*, 2016; CHAVES *et al.*, 2018; TRANG, 2021). A lectina Sfl, da alga *Solieria filiformis*, foi purificada da mesma forma que BTL e BSL, através de precipitação com sulfato de amônio e por cromatografia de troca iônica, a DEAE-Sephacel (CHAVES *et al.*, 2017).

BTL e BSL foram testadas contra eritrócitos de coelhos, apresentando atividade hemaglutinante contra estes. Esses resultados estão de acordo com os já realizados por Ainouz

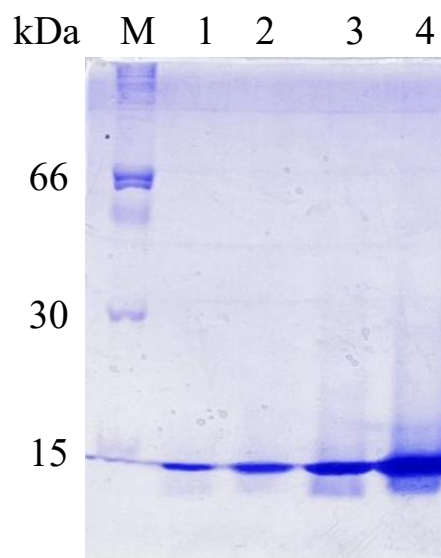
*et al.*, (1995), onde a lectina de *B. seaforthii* exibiu hemaglutinação contra eritrócitos de coelho, galinha e vaca tratados com tripsina, e a lectina de *B. triquetrum* aglutinou eritrócitos de coelho, galinha, cabra, porco e humano ABO, também tratados com tripsina.

A maioria das lectinas de algas vermelhas aglutinam preferencialmente eritrócitos de coelho e ovelha (SINGH; WALIA, 2018). A lectina da alga *Acrocystis nana* se mostrou capaz de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com tripsina, assim como das algas *Kappaphycus alvarezii* e *Solieria filiformis*, mostrando similaridade com os resultados de BTL e BSL (ANAM *et al.*, 2017; HIRAYAMA *et al.*, 2016; CHAVES *et al.*, 2018).

#### 4.2 Avaliação da pureza das lectinas

As lectinas purificadas foram submetidas à SDS-PAGE, para se realizar um comparativo com as massas já observadas anteriormente com as mesmas lectinas, onde foi analisado o peso molecular em condições não redutoras e a pureza das mesmas, obtendo-se como resultado uma banda larga com uma massa estimada semelhante para BTL e BSL, estando de acordo com o observado em estudos anteriores (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; CALVETE *et al.*, 2000) (FIGURA 2).

Figura 2 – SDS-PAGE da purificação da BTL e BSL.



Fonte: Autor. M: marcador molecular (HSA – 66 kDa; rSfL – 30 kDa; CCL - 15kDa). 1: 1 µL de BTL (1 mg/50 µL). 2: 1 µL de BSL (1 mg/50 µL). 3: 5 µL de BTL (1 mg/50 µL). 4: 5 µL de BSL (1 mg/50 µL).

Nascimento-Neto e colaboradores (2012), ao analisarem as características das isoformas da lectina da alga *B. seaforthii* por eletroforese, obtiveram uma banda larga, com peso estimado em 9 kDa.

Para BTL, Fontenelle e colaboradores (2018) observaram a massa molecular da lectina em SDS-PAGE, resultando em um peso de 9 kDa. Calvete e colaboradores (2000), também observaram esta lectina com uma banda larga e massa molecular de 6-8 kDa, corroborando com o resultado obtido neste estudo.

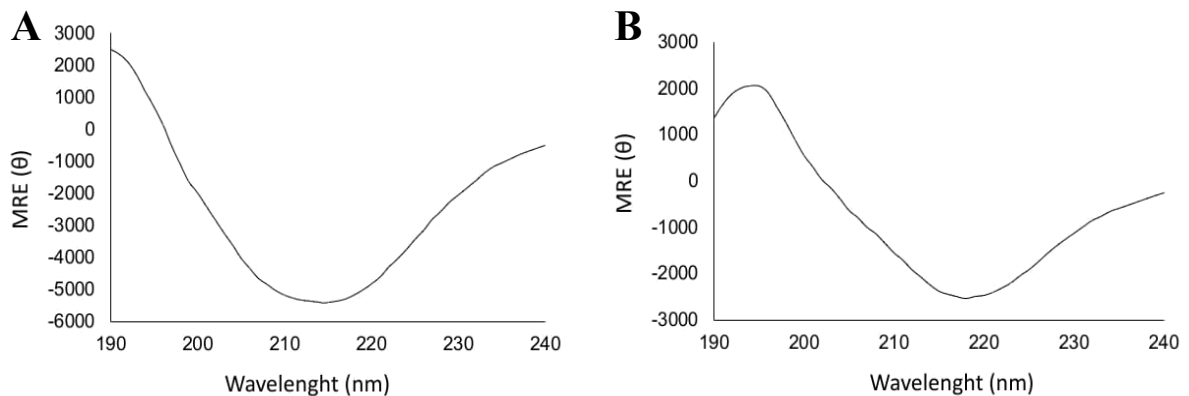
#### **4.3 Dicroísmo circular de BTL e BSL**

Para a determinação da estrutura secundária de proteínas é comum a utilização da técnica de Dicroísmo Circular (DC), que serve para examinar a estrutura e estabilidade das proteínas em solução, sendo medido como uma função do comprimento de onda. Nesta técnica ocorre a absorção diferenciada da luz, circularmente polarizada à direita e à esquerda, obtendo-se assim, a composição estrutural da proteína quanto a quantidade de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e outros. Além disso, com a utilização desta técnica, é possível se obter a impressão digital da estrutura terciária, a integridade dos sítio de ligação do cofator, alterações conformacionais causadas pela ligação, dobramento de proteínas e conclusões sobre as características gerais da estrutura de proteínas (SHARON *et al.*, 2005).

O Dicroísmo mostra ser muito versátil, pois há uma variedade de condições experimentais que podem ser analisadas nas proteínas, como a variação no pH, na temperatura, no excesso de ligantes e etc (SHARON *et al.*, 2005).

Os espectros de DC das lectinas analisadas exibiram absorção máxima em torno de 190 nm e 194 nm, e uma absorção mínima de 212 nm e 218 nm para BTL e BSL, respectivamente (FIGURA 3). Ambas apresentaram similaridade nas suas absorções. Em estudos anteriores, a proteína BTL já tinha se mostrado com uma emissão máxima de 190 nm, coincidindo com esta analisada (FONTENELLE *et al.*, 2018).

Figura 3 – Espectros de dicroísmo circular da BTL e BSL.



Fonte: Autor. Espectros de dicroísmo circular em UV distante (190-250 nm). A: BTL e B: BSL.

Quando observado as absorções máximas e mínimas de lectinas de algas vermelhas nota-se bastante semelhança. A *Solieria filiformis* apresentou uma absorção máxima igual a BTL, de 190 nm, e a *Meristiella echinocarpa* de 193 nm, bem próximo do obtido pela BSL que foi de 194 nm (CHAVES, 2018). A *Amansia multifida* apresentou uma absorção máxima e mínima de 195 e 216 nm, respectivamente, se assemelhando aos resultados obtidos neste estudo (MESQUITA *et al.*, 2021).

A análise da estrutura secundária para a proteína da *B. triquetrum*, por meio do dicroísmo circular, mostrou uma composição de 10% para  $\alpha$ -hélice, 56% para folhas- $\beta$  e 34% de estruturas randômicas, ou desordenadas. Já para a lectina da *B. seaforthii*, a sua composição foi de 5% para  $\alpha$ -hélice, 51% de folhas- $\beta$  e 44% de estruturas randômicas. Ambas apresentaram resultados semelhantes, com uma predominância de folhas- $\beta$  e baixa composição para  $\alpha$ -hélice.

Fontenelle *et al.*, (2018), mostraram resultados parecidos para a BTL, com uma composição de 3% de  $\alpha$ -hélice, 59% de folhas- $\beta$  e 37% de estruturas não ordenadas, revelando também uma maior composição por estruturas folhas- $\beta$ .

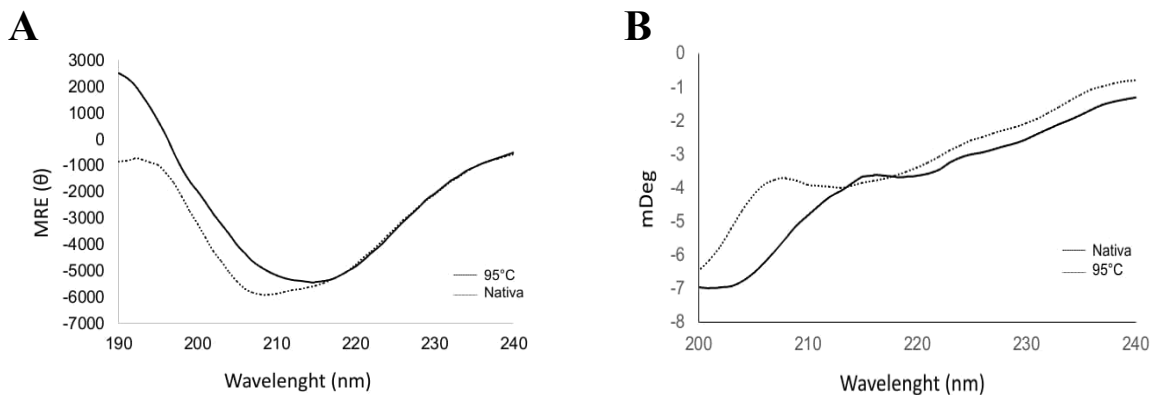
A análise das estruturas secundárias, por dicroísmo, de lectinas de algas marinhas vermelhas resultaram em porcentagens de conformações semelhantes. A lectina da alga *Solieria filiformis* mostrou um perfil característico de folhas- $\beta$  quando analisada (ABREU *et al.*, 2022). Chaves e colaboradores, em 2018, mostraram que a lectina da *Meristiella echinocarpa* é composta por 3% de  $\alpha$ -hélice, 59% de folhas- $\beta$  e 38% de regiões desordenadas. Para a lectina da alga vermelha *Amansia multifida*, sua conformação foi predominante de folhas- $\beta$ , com 64%, seguida por 32% de estruturas randômicas e apenas 4% de  $\alpha$ -hélice (MESQUITA *et al.*, 2021).



Na avaliação para estabilidade térmica, BTL não apresentou alteração acentuada na forma da curva do espectro quando incubada a uma temperatura de 95 °C, presumindo possuir uma alta estabilidade (FIGURA 4). A prova disso foi sua desnaturação, que só ocorreu a partir de 74.4 °C, onde 50% das suas moléculas desnaturaram (FIGURA 5).

Quando avaliada para BSL, a lectina apresentou uma conformação um pouco diferente quando à 95 °C, apesar de seguir a mesma forma da curva (FIGURA 4). Essa diferença com a proteína da *B. triquetrum* ficou mais evidente quando analisado sua temperatura de *melting*, onde metade dela passou para o estágio não dobrado a 66 °C, apresentando uma menor estabilidade térmica (FIGURA 5).

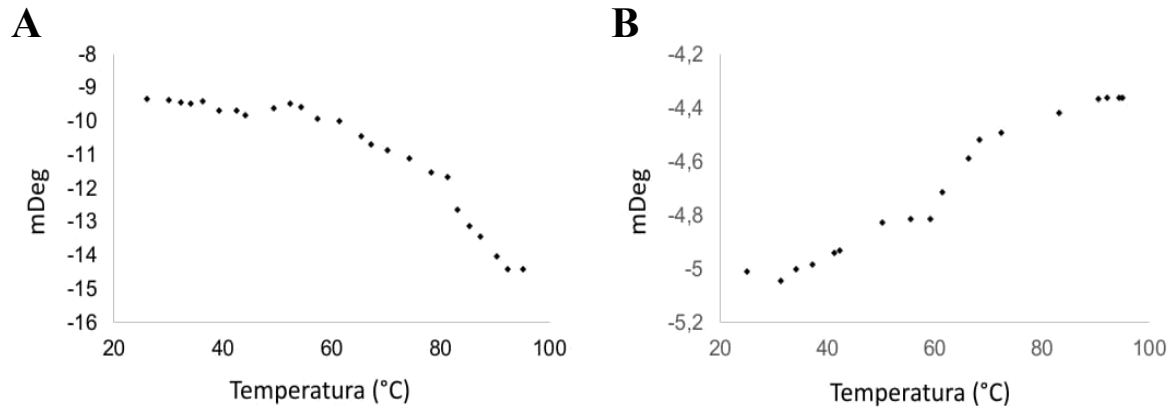
Figura 4 – Avaliação do efeito de temperatura sobre as estruturas secundárias da BTL e BSL.



Fonte: Autor. Espectros de dicroísmo circular na temperatura da forma nativa e na temperatura de 95 °C.

A: BTL e B: BSL.

Figura 5 – Avaliação da Temperatura de *Melting* ( $T_m$ ) de BTL e BSL.



Fonte: Autor. Curva de regressão da  $T_m$  de BTL e BSL em diferentes temperaturas. A: BTL e B: BSL.

Os resultados coletados através da técnica de Dicroísmo circular foram reunidos em apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1 – Resultados oriundos do Dicroísmo Circular (DC).

Lectinas	Absorção máxima	Absorção mínima	Conformação estrutural			Temperatura de <i>melting</i>
			$\alpha$ -hélice	folhas- $\beta$	Estruturas randômicas	
<b>BTL</b>	190 nm	212 nm	10%	56%	34%	74.4 °C
<b>BSL</b>	194 nm	218 nm	5%	51%	44%	66 °C

Fonte: Autor.

A Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) é considerada como a quantidade de calor onde ao menos 50% da estrutura da proteína passa do estágio dobrado para o não dobrado. Quando uma estrutura está parcialmente desnaturada ela pode apresentar perda significativa das funções relacionadas a suas interações (GREENFIELD, 2007; RANJBAR; GILL, 2009).

Algumas lectinas de algas marinhas vermelhas já estudadas e analisadas estruturalmente, apresentam um  $T_m$  um pouco abaixo do que o encontrado neste trabalho. A AmL, da *Amansia multifida*, revelou uma temperatura de *melting* estimada em 42 °C, e a MeL, da alga *Meristella echinocarpa*, apresentou um  $T_m$  de 54 e 61 °C, na ausência e presença de manana, respectivamente (MESQUITA *et al.*, 2021; CHAVES *et al.*, 2018). Abreu e colaboradores (2022), analisaram que a estrutura da lectina da alga *Solieria filiformis*, até 45 °C não alterava sua curva do espectro, mas a partir de 50 °C ocorria a desnaturação de 50% das suas moléculas.

A avaliação da estabilidade térmica da BTL, feita por Fontenelle e colaboradores (2018), foi realizada por fluorescência em temperaturas de 25 a 75 °C. Em seus resultados a lectina manteve sua estrutura estável, sem alterar seus picos máximos, mostrando possuir uma alta estabilidade, atribuída, provavelmente, pela presença de duas pontes dissulfeto intracadeia. Esse resultado corrobora com o obtido neste estudo para a lectina da alga *Bryothamnion triquetrum* em relação a sua estabilidade térmica.

Apesar da não existência de outros estudos da BSL relacionados ao dicroísmo circular e sua estabilidade térmica estrutural, sabe-se que esta lectina apresenta em sua estrutura quatro cisteínas, formando duas pontes dissulfeto intracadeia, sendo este também o provável motivo da sua alta termoestabilidade (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

Com isto, nota-se através dos resultados uma diferença de estabilidade térmica para ambas as lectinas, com diferença de aproximadamente 9 °C para seus Tm, no qual pode ser aferida devido suas disposições de pontes dissulfeto pelas cisteínas (Cys), apresentando nas suas sequências pontes entre Cys<sup>5</sup> – Cys<sup>12</sup> e Cys<sup>62</sup> – Cys<sup>90</sup> para BTL e Cys<sup>5</sup> – Cys<sup>62</sup> e Cys<sup>12</sup> – Cys<sup>90</sup> para BSL (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; CALVETE *et al.*, 2000).

#### 4.4 Teste de inibição da atividade hemaglutinante com as duas lectinas

A atividade hemaglutinante, tanto da BSL quanto da BTL, foi inibida por mucina maxilar bovina e tireoglobulina (TABELA 2).

Tabela 2 – Inibição da atividade hemaglutinante.

Compostos	CMI (BTL)	CMI (BSL)
Mucina de estômago de porco II	X	X
Mucina de estômago de porco III	X	X
Fetuína	X	X
Manana de levedura	X	X
Mucina maxilar bovina	1 mg.mL <sup>-1</sup>	0,125 mg.mL <sup>-1</sup>
Transferina humana	X	X
Asialufetuína	X	X
Tireoglobulina	1 mg.mL <sup>-1</sup>	0,5 mg.mL <sup>-1</sup>
LPS 0111:B4 de <i>E. coli</i>	X	X
Ácido lipotecóico de <i>S. aureus</i>	X	X

Fonte: Autor. CMI: Concentração mínima inibitória. X: Não ocorreu inibição na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

O teste foi realizado utilizando apenas glicoproteínas, pois quando testado anteriormente com açúcares simples (ribose, galactose, frutose e outros) notou-se a não inibição dos mesmos, ocorrendo apenas para glicoproteínas mucina, fetuina e avidina (AINOUZ *et al.*, 1995).

Com resultados semelhante, Nascimento-Neto *et al.*, (2012), realizaram o teste de inibição da atividade hemaglutinante com a lectina da *B. seaforthii*, observando a ocorrência de inibição com as glicoproteínas mucina suína, fetuina e avidina. Já para BTL, a proteína mostrou especificidade para mucina gástrica suína e para a mucina submaxilar bovina, assim como neste estudo (PINTO *et al.*, 2009).

A mucina submaxilar bovina é uma glicoproteína que possui uma estrutura menos ramificada quando comparada com mucinas humanas e é rica em carboidratos, podendo ser utilizada em diversas aplicações devido sua alta viscosidade e biocompatibilidade. Apesar de ser abundante em O-glicanos, estudos já identificaram a presença de N-glicanos do tipo complexo e alta manose na sua composição, sendo eles sulfatados e fucosilados no núcleo (KIM *et al.*, 2019).

A glicoproteína tireoglobulina é produzida pelas células foliculares de tireoide, sendo a principal proteína precursora dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Esta glicoproteína possui dois tipos de cadeias, oligomanose e N-acetilactosamina, sendo que esta última os principais N-glicanos são estruturas biantenárias  $\alpha$ 1-6 fucosiladas (STEURER *et al.*, 2021; NAGANO *et al.*, 2005).

No processo de N-glicosilação, um resíduo de GlcNAc (N-acetilglicosamina) se liga a um resíduo de Asn (asparagina) por meio de uma ligação amida. A Asn presente nessa ligação é pertencente a sequência Asn-AA-Ser/Thr (Serina/Treonina), onde o AA é qualquer aminoácido, exceto a prolina. Os N-glicanos são formados por uma estrutura pentassacarídica (com dois resíduos de GlcNAc e três de manose) chamado de núcleo. Este núcleo é então usado como substrato para a diversificação dos N-glicanos no complexo de Golgi (SCHMALTZ *et al.*, 2011; MOLINARI, 2007).

A fucosilação, que é uma das modificações mais comum de oligossacarídeos em glicoproteínas e glicolípídeos, refere-se a ligação de um resíduo de fucose a um N-glicano, O-glicano ou glicolípídeo, podendo ser dividido entre diferentes tipos como,  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4 e  $\alpha$ 1-6. A fucose é um monossacarídeo, encontrado em glicoproteínas e glicolípídeos, amplamente presentes na superfície celular. Normalmente se ligam as cadeias dos açúcares e

possuem importância nos processos biológicos (VARKI *et al.*, 2009; DO NASCIMENTO, 2014).

Em 2014, Do Nascimento e colaboradores, ao estudar as interações da BTL através da técnica de *glycan array*, mostraram que a lectina possui especificidade restrita por N-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação ( $\alpha$ 1-6). Esse resultado consolida o observado nesse estudo, onde tanto a mucina submaxilar bovina quanto a tireoglobulina apresentam N-glicanos fucosilados.

Essa característica não se mantém apenas para BTL, pois quando analisado a lectina da alga vermelha *Hypnea japonica*, viu-se também esta especificidade restrita para N-glicanos fucosilados do núcleo ( $\alpha$ 1-6), além de apresentarem uma sequência primária bem semelhante da observada em BTL (OKUYAMA *et al.*, 2009).

Como a lectina da BSL apresentou inibição para as mesmas glicoproteínas que a BTL, é plausível supor que esta também possua uma especificidade a N-glicanos complexos com o núcleo fucosilado, tendo em vista que a sua concentração mínima inibitória foi menor que a da BTL, que comprovadamente possui essa especificidade.

## **4.5 Modelagem das estruturas tridimensionais das proteínas**

### **4.5.1 Análise do domínio de reconhecimento a carboidratos**

Ambas as lectinas apresentaram, através da ferramenta online SMART, uma arquitetura de domínio do tipo CBD\_II, localizada entre as posições A<sup>16</sup> e C<sup>90</sup>, com diferença no E-value, que foi de 2021,79 para BTL e 854,78 para BSL. Quanto mais próximo de zero for o E-value mais confiável será o alinhamento, pois este valor é um parâmetro estatístico de confiança do próprio alinhamento (LETUNIC; KHEDKAR; BORK, 2021).

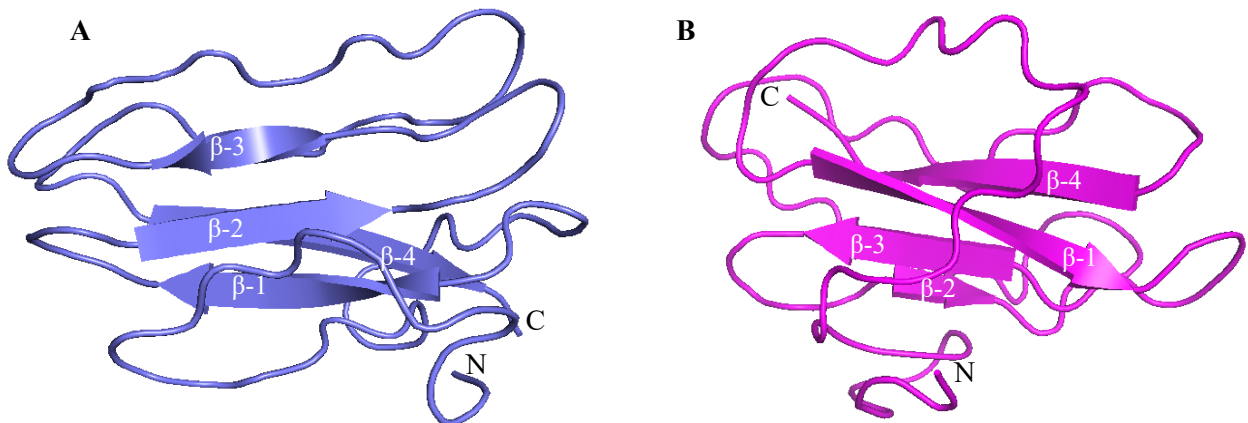
Estruturalmente, o CBD\_II (Domínio de ligação a carboidratos tipo 2) consiste em um domínio catalítico e uma região conservada de aproximadamente 100 aminoácidos, possuindo como função ligação de carboidratos e atividade de hidrolase (MEINKE *et al.*, 1991).

Já foi relatado que algumas proteínas vegetais apresentam um domínio de ligação a carboidratos e um domínio catalítico em suas estruturas, como as quimerolectinas que além do domínio lectínico apresentam um domínio não relacionado que possui uma atividade catalítica bem definida que atua independente do domínio de ligação a carboidratos (PEUMAS; DAMME, 1995).

#### 4.5.2 Predição estrutural

A predição estrutural, obtida através do programa C-I-TASSER, mostrou resultados semelhantes para as duas proteínas. Em BTL, o programa utilizou como *template* uma estrutura cristalina do sistema imune do homem (complemento C5), cujo código de acesso é 7OP0, sendo esta a que possui maior similaridade com a lectina, e apresentou um C-score de -2,58, TM-score de 0,42 e RMSD de 9,3 (FIGURA 6A). Já em BSL, o *template* utilizado de maior similaridade foi uma proteína de membrana da bactéria *Helicobacter hepaticus* (código de acesso: 7S9Y), apresentando C-score de -2,35, TM-score de 0,44 e RMSD de 8,8 (FIGURA 6B) (ZHENG *et al.*, 2021).

Figura 6 – Estrutura tridimensional predita da BTL e BSL.



Fonte: ZHENG *et al.*, (2021). Estrutura tridimensional predita das lectinas BTL (A) e BSL (B), apresentando 4 folhas  $\beta$  ( $\beta$ -1;  $\beta$ -2;  $\beta$ -3 e  $\beta$ -4), numeradas em ordem. N: N-terminal (início da sequência). C: C-terminal (final da sequência).

As pontuações obtidas através do programa C-I-TASSER referentes a confiança e similaridade estão dispostos na TABELA 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos pelo programa C-I-TASSER.

Lectinas	C-score	TM-score	RMSD
<b>BTL</b>	-2,58	0,42	9,3
<b>BSL</b>	-2,35	0,44	8,8

Fonte: Autor. Valores resultantes referentes a confiança e similaridade das estruturas de BTL e BSL.

A estrutura das duas lectinas apresentaram em suas conformações quatro folhas- $\beta$ , corroborando com o que foi observado na análise de dicroísmo circular, onde se obteve uma maior predominância de folhas- $\beta$  e baixas concentrações de  $\alpha$ -hélice.

A confiança do modelo prevista pelo servidor é quantificado pelo C-score, que é calculado com base na significância de alinhamento, na taxa de satisfação do mapa de contato e na convergência de simulações. Quanto mais alto este valor, maior a confiança do modelo, sendo geralmente compreendido na faixa de -5 a 2. O TM-score e o RMSD são padrões usados para medir a similaridade estrutural, estimados com base no C-score e no comprimento da proteína, onde o TM-score varia de 0 a 1, sendo quanto mais alto melhor, e o RMSD varia de 0 a 30 Å, apresentando melhor resultado quando mais próximo de 0. Assim, erros de modelagem local podem resultar em um alto valor de RMSD, isso porque este parâmetro mede as distâncias de todos os pares de resíduos com um peso igual (YANG; ZANG, 2015; ZHENG *et al.*, 2021; ZHANG, 2008).

Com os resultados obtidos para ambas as proteínas, nota-se que elas apresentaram similaridades em suas estruturas. Semelhanças nos valores de C-score, TM-score e RMSD foram observadas, estando este último parâmetro mais próximo do limite mínimo do que do máximo, sendo assim o melhor resultado analisado.

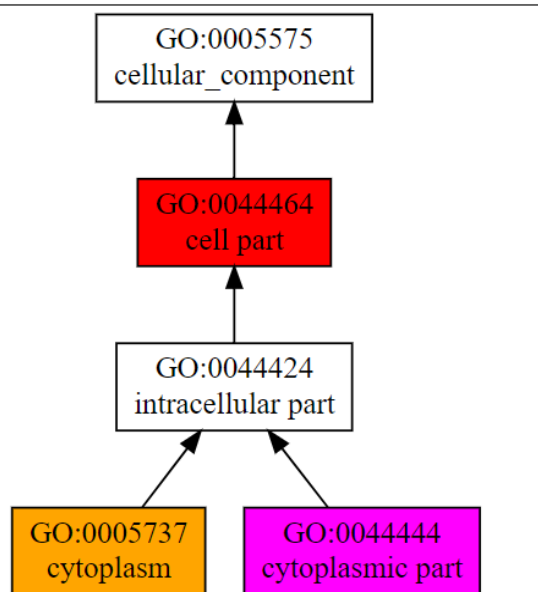
Para obter um comparativo mais completo para as duas estruturas geradas, seria necessário realizar um alinhamento dos carbonos  $\alpha$ , pois através desse procedimento pode-se determinar a similaridade estrutural delas (DELANO, 2002). Além disso, a análise das disposições das pontes dissulfeto para ambas as lectinas também pode estar relacionado as respostas de suas estruturas, tendo em vista que estas pontes estão localizadas em regiões diferentes para BTL e BSL.

Poucos são os estudos referente a predição estrutural de lectinas de algas marinha. Todavia, alguns já realizados, como no caso da CiL-1, da alga *Codium isthmocladum*, mostrou que sua estrutura é composta por quatro folhas- $\beta$  de duas fitas dispostas em forma de barril, e SfL (*Solieria filiformis*), que é formada por dois  $\beta$ -barris. Apesar de conformações distintas quando comparadas com BTL e BSL, eles apresentam uma semelhança, que é a predominância por folhas- $\beta$  em suas estruturas (CARNEIRO *et al.*, 2020; CHAVES *et al.*, 2017).

Através do servidor C-I-TASSER, observou-se que a BTL pode está localizada em vários locais no compartimento celular, como na parte da célula com C-score<sup>GO</sup> de 1,00 com alta confiança, no citoplasma com C-score<sup>GO</sup> de 0,83 e na parte citoplasmática com C-score<sup>GO</sup> de 0,50 (FIGURA 7). Para a BSL o programa também mostrou sua localização em várias

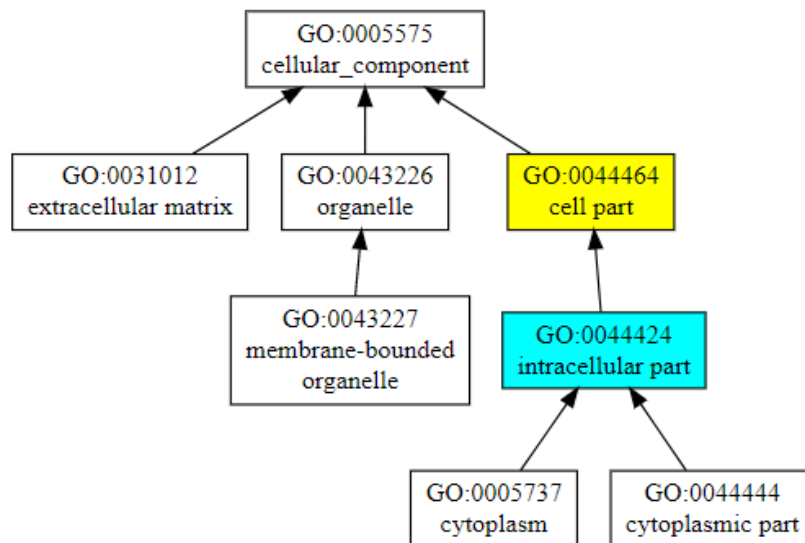
partes no compartimento celular, com maior confiança na parte celular com C-score<sup>GO</sup> de 0,73 e na parte intracelular com C-score<sup>GO</sup> de 0,55 (FIGURA 8).

Figura 7 – Localização da BTL no compartimento celular.



Fonte: ZHENG *et al.*, (2021). As cores representam os termos previstos com segurança. Termos vermelhos: C-score<sup>GO</sup> de 0,9-1,0; Termos laranjas: C-score<sup>GO</sup> de 0,8-0,9; Termos roxos: C-score<sup>GO</sup> de 0,4-0,5.

Figura 8 – Localização da BSL no compartimento celular.



Fonte: ZHENG *et al.*, (2021). As cores representam os termos previstos com segurança. Termos amarelos: C-score<sup>GO</sup> de 0,7-0,8; Termos azuis: C-score<sup>GO</sup> de 0,5-0,6.



O C-score<sup>GO</sup> é uma pontuação de confiança dos termos previstos. Ele varia de 0 a 1, onde quanto mais próximo de 1 mais confiável é a previsão da localização, e no gráfico pode ser diferenciado nas cores vermelho (C-score<sup>GO</sup> entre 0,9 a 1,0), laranja (C-score<sup>GO</sup> entre 0,8 a 0,9), amarelo (C-score<sup>GO</sup> entre 0,7 a 0,8), verde (C-score<sup>GO</sup> entre 0,6 a 0,7), azul (C-score<sup>GO</sup> entre 0,5 a 0,6) e roxo (C-score<sup>GO</sup> entre 0,4 a 0,5) (ZHENG *et al.*, 2021).

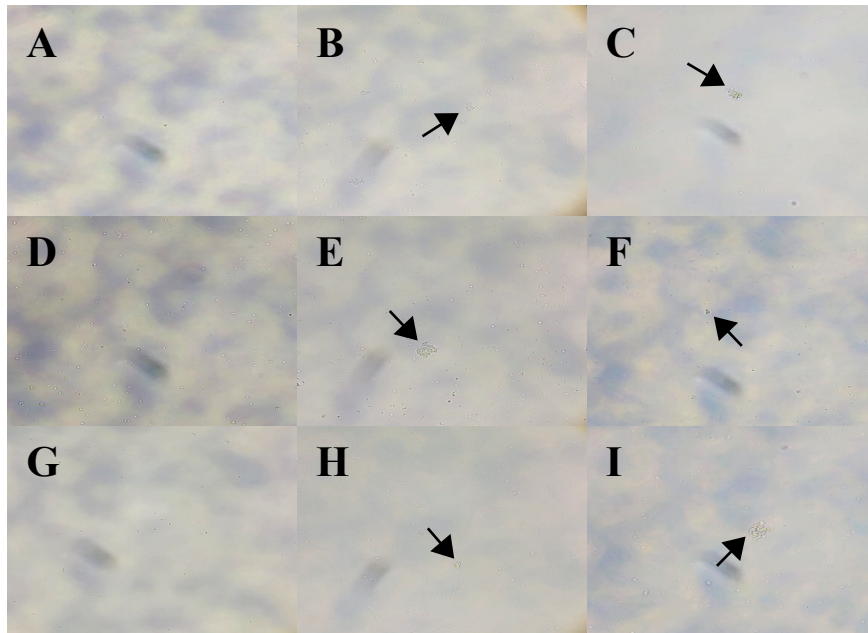
Os quadros em vermelho e laranja indicam que a proteína está presente em qualquer parte constituinte de uma célula, exceto a membrana plasmática. O termo em amarelo informa a localização em qualquer parte constituinte da região extracelular (qualquer parte fora da célula ocupada por fluido, incluindo aqueles que são secretados de uma célula para o sangue ou fluido), fora da membrana plasmática. Já os que estão em azul e roxo indicam a localização em uma estrutura organizada com uma função e morfologia distinta, demarcada por uma membrana, exceto a membrana plasmática, podendo ser na mitocôndria, no núcleo ou em outras organelas (ZHENG *et al.*, 2021).

Uma vez estando presente em várias regiões celulares, estudos realizados por Miguel e colaboradores (2014) demonstraram que as proteínas oriundas de algas marinhas vermelhas *Hypnea cervicornis* (HCL) e *Hypnea musciformis* (HML), estão em maior concentração na parede celular e no citoplasma, estando ausentes nos vacúolos, desempenhando assim, papéis fisiológicos importantes. Deste modo, nota-se que BTL e BSL, por estarem presentes nestes locais, possivelmente podem apresentar grande importância fisiológica.

#### 4.6 Aglutinação de bactérias

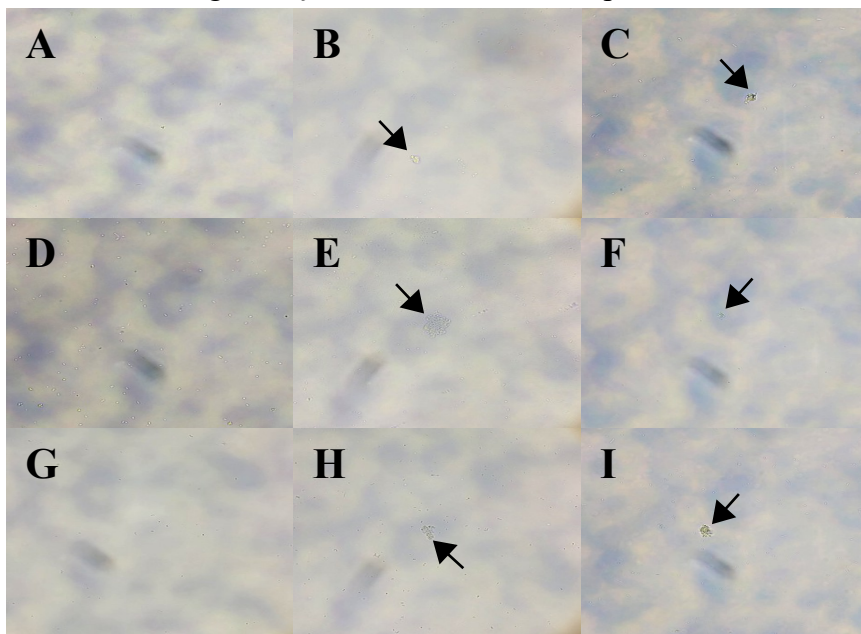
Os ensaios de aglutinação bacteriana mostraram que ambas as lectinas, BTL e BSL, foram capazes de aglutinar células das cepas *S. aureus* 25, *S. epidermidis* 12 e *S. epidermidis* 35 (FIGURA 9 e 10), não sendo capazes de aglutinar as demais cepas *E. coli* 11, *S. aureus* 70 e *P. aeruginosa* 27, tanto nas concentrações de 1 mg.mL<sup>-1</sup> quanto nas de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Figura 9 – Teste de aglutinação da BTL contra as cepas bacterianas.



Fonte: Autor. A: Controle da *S. aureus* 25. B: *S. aureus* 25 com BTL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. C: *S. aureus* 25 com BTL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. D: Controle da *S. epidermidis* 12. E: *S. epidermidis* 12 com BTL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. F: *S. epidermidis* 12 com BTL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. G: Controle da *S. epidermidis* 35. H: *S. epidermidis* 35 com BTL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. I: *S. epidermidis* 35 com BTL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Figura 10 – Teste de aglutinação da BSL contra as cepas bacterianas.



Fonte: Autor. A: Controle da *S. aureus* 25. B: *S. aureus* 25 com BSL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. C: *S. aureus* 25 com BSL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. D: Controle da *S. epidermidis* 12. E: *S. epidermidis* 12 com BSL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. F: *S. epidermidis* 12 com BSL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. G: Controle da *S. epidermidis* 35. H: *S. epidermidis* 35 com BSL em 1 mg.mL<sup>-1</sup>. I: *S. epidermidis* 35 com BSL em 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Através dos resultados, percebe-se a preferência das lectinas pelas bactérias Gram-positivas, tendo em vista que não ocorreu aglutinação com cepas Gram-negativas *E. coli* 11 e *P. aeruginosa* 27.

Algumas lectinas advindas de algas marinhas vermelhas também já mostraram possuir capacidade de aglutinar bactérias. MeL, proteína da *Meristiella echinocarpa*, aglutinou cepas de *Salmonella* multirresistente e *Vibrio alginolyticus*, em uma concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , diferentemente de SfL, da *Solieria filiformis*, que aglutinou *E. coli* e *S. aureus*, mesmo ambas apresentando igual afinidade por carboidratos e pertencendo a mesma família de lectinas.

Em algas verdes a lectina CiL-3, oriunda da *Codium isthmocladum*, demonstrou a capacidade de aglutinar células das cepas *S. aureus*, e *S. epidermidis*, e a BHL aglutinou *E. coli* JM 109 a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , lectina esta da alga *Bryopsis hypnoides* (SABOYA, 2016; NIU *et al.*, 2009).

Em 2013, Vasconcelos realizou um estudo sobre o efeito de algumas lectinas, dentre elas a da alga *Bryothamnion seaforthii* (BSL), contra o crescimento planctônico e formação de biofilme em bactérias e fungos, no qual obteve como resultado apenas uma fraca inibição no crescimento em *S. aureus* JKD 6008, *S. epidermidis* CECT 231, (bactérias Gram-positivas) e *P. aeruginosa* ATCC 10145 (bactéria Gram-negativa).

Em estudos anteriores com BTL, mostrou-se que ela possui a capacidade de inibir 98% do crescimento da bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subs. *Michiganensis* (CMM) e apenas 9,8% do crescimento da Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* (XAP), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho em relação a afinidade por bactérias Gram-positivas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

BSL e BTL também foram capazes de inibir significativamente a formação de biofilmes de cinco diferentes espécies de estreptococos (gênero de bactérias Gram-positivas), que é a principal responsável pelo desenvolvimento de cárie dentária (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Sabe-se que atividade antimicrobiana de lectinas sobre bactérias se dá através da interação delas com os componentes presentes na parede celular bacteriana, dentre eles os peptídeoglicanos, lipopolissacarídeos e ácidos teicóico (PAIVA *et al.*, 2010), interação esta que também ocorre nos processos de atividades de aglutinação.

Tanto bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas apresentam semelhança nas suas paredes celulares, denominada peptídeoglicana, sendo um dissacarídeo repetitivo (composto por monossacarídeos) unidos por polipeptídeos. A diferença entre os dois grupos ocorre na quantidade de camadas de peptídeoglicanos, que nas Gram-positivas é maior e mais rígida, e na presença de ácidos teicóico e lipopolissacarídeos (LPS) que são características das

Gram-positivas e das Gram-negativas, respectivamente (MADIGAN *et al.*, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Como foi visto, as lectinas de BTL e BSL apresentaram uma maior afinidade pelas bactérias Gram-positivas. Apesar da presença de ácido teicóico em bactérias Gram-positivas e do LPS nas Gram-negativas ser uma das poucas características que as diferenciam, sabe-se que assim como outras estruturas da parede celular, estas também possuem significativas diferenças estruturais, dependendo da espécie bacteriana, mesmo apresentando similaridades em características químicas (BENEDETTI, 2020; SHIRAISHI *et al.*, 2016). Devido a isto, pode-se aferir que o ácido teicóico utilizado para o teste de inibição da atividade hemaglutinante pode apresentar algumas diferenças do encontrado nas cepas bacterianas testadas. Isso é pressuposto pelo fato da existência das diferenças estruturais apresentadas para diferentes ácidos teicóico, não sendo necessariamente o mesmo em cada bactéria.

Mesmo notando-se a preferência das lectinas pelas bactérias Gram-positivas, a aglutinação não foi observada na cepa *S. aureus* 70, pertencente a este grupo de bactérias. Com isto, pode-se pressupor que a interação das proteínas pode estar ocorrendo com algum componente presente na membrana das três bactérias aglutinadas, *S. aureus* 25, *S. epidermidis* 12 e 35, e que não se encontra na *S. aureus* 70. Essa diferenciação pode ocorrer pois, apesar de todas se caracterizarem como Gram-positivas, são cepas diferentes, e, conseqüentemente, podem apresentar características distintas quanto sua morfologia, propriedades bioquímicas e outros, mesmo sendo de espécies iguais, como ocorreu para *S. aureus* 70 e 25 (MARQUES RIBEIRO *et al.*, 2012).

Deste modo, a realização da atividade aglutinante é muito importante pois, analisando a afinidade de lectinas por determinadas bactérias, pode-se utilizar para projetos de biodispositivos ou em aplicações envolvendo a captura bacteriana (GASMI; FERRÉ; HERRERO, 2017). Além disso, pode contribuir para a eliminação de bactérias infecciosas e na identificação de culturas bacterianas (TORRENT *et al.*, 2012; JEMILOHUN; ADEYANJU; BELLO, 2017).

## 5. CONCLUSÃO

As lectinas de *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* isoladas no presente trabalho, e utilizadas para a realização dos estudos de inibição, determinação estrutural e aglutinação bacteriana, apresentaram as mesmas características encontradas em trabalhos previamente publicados. Nossos resultados demonstraram para BTL e BST, uma predominância de folhas- $\beta$  nas suas composições, alta termoestabilidade e uma grande similaridade em suas estruturas. Sabe-se que são poucas as lectinas de algas marinhas que possuem suas estruturas determinadas, e por esse motivo percebe-se a relevância deste trabalho para melhor compreender essas proteínas, mesmo se tratando de uma predição estrutural. Além disso, mostraram potencial biotecnológico através da sua capacidade de aglutinar células bacterianas, preferencialmente por bactérias Gram-positivas. Deste modo, avaliando as semelhanças existentes para as duas lectinas analisadas, é possível concluir que ambas compartilham de várias características em comum, com composição, especificidade e estrutura semelhantes, atribuída possivelmente ao fato de serem lectinas oriundas do mesmo gênero, *Bryothamnion*, e coletadas na mesma região da costa brasileira. Contudo, novos estudos são necessários para se obter uma compreensão mais completa dessas lectinas tão promissoras.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S.; VASCONCELOS, I. M.; MOTA, E. F.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. **Planta Med**, v. 82, n. 7, p. 596-605, april 2016.
- ABREU, T. M. CORPE, F. P.; TELES, F. B.; RIVANOR, R. L. C.; SOUSA, C. N. S.; MEDEIROS, I. S.; QUEIROZ, I. N. L.; FIGUEIRA-MANSUR, J.; MOTA, E. F.; MOHANA-BORGES, R.; MACEDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; JÚNIOR, J. E. R. H.; BENEVIDES, N. M. B. Lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* (Kützinger) PW Gabrielson: Secondary structure and antidepressant-like effect in mice submitted to the lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Algal Research**, v. 65, p. 102715, june 2022.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg**, v. 7, p. 15– 19, 1995.
- ALI, A. Y.; IDRIS, A. M.; EBRAHIM, A. M.; ELTAYEB, M. A. Brown algae (Phaeophyta) for monitoring heavy metals at the Sudanese Red Sea coast. **Applied water science**, v. 7, n. 7, p. 3817-3824, 2017.
- ALSAIDI, S.; CORNEJAL, N.; MAHONEY, O.; MELO, C., VERMA, N.; BONNAIRE, T., CHANG, T.; O'KEEFE, B. R.; SAILER, J.; ZYDOWSKY, T. M.; TELESHOVA, N.; ROMERO, J. A. F. Griffithsin and Carrageenan Combination Results in Antiviral Synergy against SARS-CoV-1 and 2 in a Pseudoviral Model. **Marine Drugs**, v. 19, n. 8, p. 418, 2021.
- ALVES, M. F. A. Atividade antihiperlipidêmica e antioxidante de lectina de *Bryothamnion triquetrum* em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

AMORIM *et al.*, VI Botânica no Inverno 2016 / Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.

ANAM, C.; PRASEPTIANGGA, D.; NUGRAHANI, M. A.; NURHAYATI, T.; FAJARNINGSIH, N. D.; ZILDA, D. S.; CHASANA, E.; YUNUS, A. Preliminary characterization of crude lectin fraction of the red alga, *Acrocystis nana* from wediombo beach of the southern coast of Java island, Gunung kidul, Yogyakarta, Indonesia. **IOP Conf Ser: Mater Sci Eng.** 193: 012016, 2017.

BARRE, A.; DAMME, E. J. M. V.; SIMPLICIEN, M.; LE PODER, S.; KLONJKOWSKI, B.; BENOIST, H.; PEYRADE, D.; ROUGÉ, P. Man-specific lectins from plants, fungi, algae and cyanobacteria, as potential blockers for SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19) coronaviruses: Biomedical perspectives. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1619, 2021.

BASÍLIO, T.H. Biodiversidade e conservação das ilhas costeiras do litoral sul capixaba. São Paulo: Lura Editorial Gráfica, 2020.

BENEDETTI, M.; VECCHI, V.; BARERA, S.; DALL'OSTO, L. Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2018.

BENEDETTI, P. R. Caracterização estrutural de lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Hemagglutinating activity in the red alga *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** (Brazil), 1996.

BHOLA, V.; SWALAHA, F.; KUMAR, R. R.; SINGH, M.; BUX, F. Overview of the potential of microalgae for CO<sub>2</sub> sequestration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 2103-2118, 2014.

BJARNASON, A.; MAGNUSDOTTIR, S. K. A C-Type Lectin with Antibacterial Activity in Weather Loach. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 12, n. 2, p. 1a-1a, 2021.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. **The Journal of Immunology**, v. 73, n. 4, p. 226-231, 1954.

BUGS, L. C.; CUPERITINI, P. M.; WOLF, T. C.; TREICHEL, H. Uso da biomassa de algas como biossorvente para remoção de metais pesados: uma revisão. **CIATEC-UPF**, v. 10, n. 1, p. 53-67, 2018.

CABRAL, I. S. R.; SHIRAHIGUE, L. D.; ARRUDA, L. F.; CARPES, S. T.; OETTERER, M. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 181-192, 2011.

CALVETE, J. J.; COSTA, F. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; BLOCH, C.; SILVEIRA, S.B., FREITAS, B.T.; SAMPAIO, A.H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 2, p. 343-350, 2000.

CARNEIRO, R. F.; TORRES, R. C. F.; CHAVES, R. P.; DE VASCONCELOS, M. A.; DE SOUSA, B. L.; GOVEIA, A. C. R.; ARUDA, F. V.; MATOS, M. N. C.; MATTHEWSCASCON, H.; FREIRE, V. N.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. 50 Purification, Biochemical Characterization, and Amino Acid Sequence of a Novel Type of Lectin from *Aplysia dactylomela* Eggs with Antibacterial/Antibiofilm Potential. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017.

CARNEIRO, R. F.; DUARTE, P. L.; CHAVES, R. P.; SILVA, S. R.; FEITOSA, R. R.; SOUSA, B. L.; ALVES, A. W. S.; VASCONCELOS, M. A.; ROCHA, B. A. M.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S. New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 4263-4276, 2020.



CHAVES, R. P. Caracterização estrutural e potencial biotecnológico de duas lectinas pertencentes a família de lectinas homologas a *Oscillatoria agardhii* agglutinin (OAAH). 2018. 117 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHAVES, R. P.; SILVA, S. R.; SILVA, J. P. F. A.; CARNEIRO, R. F.; SOUSA, B. L.; ABREU, J. O.; CARVALHO, F. C. T.; ROCHA, C. R. C.; FARIAS, W. R. L.; SOUSA, O. V.; SILVA, A. L. C.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S. *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): A new member of the OAAH-lectin family. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2629-2638, 2018.

CHAVES, R. P.; SILVA, S. R.; NASCIMENTO NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; COELHO DA SILVA, A. L.; SAMPAIO, A. H.; LOPES DE SOUSA, B.; CABRAL, M. G.; VIDEIRA, P. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützting) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **Int J Biol Macromol**, v. 107, part A, p. 1320-1329, february 2017.

COTAS, J.; LEANDRO, A.; MONTEIRO, P.; PACHECO, D.; FIGUEIRINHA, A.; GONÇALVES, A. M.; SILVA, G. J.; PEREIRA, L. Seaweed phenolics: From extraction to applications. **Marine drugs**, v. 18, n. 8, p. 384, 2020.

DE ALENCAR ALVES, M. F.; DE ALMEIDA BARRETO, F. K.; DE VASCONCELOS, M. A.; DO NASCIMENTO NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; DA SILVA, L. T.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; TEIXEIRA, E. H. Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International journal of biological macromolecules**, v. 158, p. 773-780, 2020.

DE SOUZA, Z. N.; SANTOS, J. V. O.; NETO, J. M. W. D.; DA SILVA, W. R. C.; FERREIRA, Y. L. A.; CAVALCANTI, I. M. F. Antibacterial and antibiofilm lectins from plants – a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.

DO NASCIMENTO, A. S. F. Lectines recombinantes d'algues rouges marines *Hypnea musciformis* (Wulfen) JV Lamouroux et *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelin) M. Howe: production hétérologue et caractérisation biochimique. 2014. Tese de Doutorado. Université de Grenoble.

DOMOZYCH, D. S.; CIANCIA, M.; FANGEL, J. U.; MIKKELSEN, M. D.; ULVSKOV, P.; WILLIAM, G. T. W. The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. **Frontiers Plant Science**, v. 3, p. 1-7, 2012.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

FABRIS, M.; ABBRIANO, R. M.; PERNICE, M.; SUTHERLAND, D. L.; COMMAULT, A. S.; HALL, C. C.; LABEEUW, L.; MCCAULEY, J. C.; KUZHIUPARAMBIL, U.; RAY, P.; KAHLKE, T.; RALPH, P. J. Emerging technologies in algal biotechnology: Toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 279, 2020.

FONTENELLE, T. P. C.; LIMA, G. C.; MESQUITA, J. X.; LOPES, J. L. S.; BRITO, T. V.; JÚNIOR, F. C. V.; SALES, A. B.; ARAGÃO, K. S.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1122-1130, jun. 2018.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; DE REVIERS, B.; PRADO, J. F.; HAMLAOUI, S. Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Artmed Editora, 2010.

GARCÍA-SOTO, G.; LOPEZ-BAUTISTA, J. Taxonomic notes on the genus *Alsidium* C. Agardh, including the merging of *Bryothamnion Kützinger* (Rhodomelaceae). **Algae**, v. 33, n. 3, p. 215-229, 2018.

GASMI, L.; FERRÉ, J. F.; HERRERO, S. High bacterial agglutination activity in a single CRD C-Type lectin from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biosensors**, v. 7, n. 12, p. 1-9, 2017.

GONDIM, A. C.; DA SILVA, S. R.; MATHYS, L.; NOPPEN, S.; LIEKENS, S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; ROCHA, C. R. C.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; SADLER, P. J.; BALZARINI, J. Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 390-398, 2019.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 16 de maio de 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 20 de abril de 2022.

HAN, T.; SHI, R.; QI, Z.; HUANG, H.; LIANG, Q.; LIU, H. Interactive effects of oyster and seaweed on seawater dissolved inorganic carbon systems: implications for integrated multitrophic aquaculture. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 9, p. 469-478, 2017.

HAZEN, T. H.; WU, D.; EISEN, J. A.; SOBECKY, P. A. Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio spp.* **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7703-7710, december 2007.

HERNANDEZ DIAZ, P.; GONZÁLEZ, O. M.; VÉLEZ, Y. R. P.; BÁEZ, C. F. A.G. Aplicaciones de las lectinas. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**, Ciudad de la Habana, v. 15, n. 2, p. 91-95, agosto 1999.

HIRAYAMA, M.; SHIBATA, H.; IMAMURA, K.; TAKEMASA SAKAGUCHI, T.; HORI, K. High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high-affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. **Mar Biotechnol**, v. 18, p. 144-160, 11 May 2016.

HUNG, L. D.; HIRAYAMA, M.; LY, B. M.; HORI, K. Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, I. 4, p.1657-1669, August 2015a.

HUNG, L. D.; HIRAYAMA, M.; LY, B. M.; HORI, K. Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 99–105, 2015b.

HUNG, L. D.; TRINH, P. T. H. Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. **Journal of natural medicines**, v. 75, n. 1, p. 223-231, 2021.

JEMILOHUN, A. C.; ADEYANJU, A. T.; BELLO, M. M. How useful is the widal test in modern clinical practice in developing countries? A Review. **IJTDH**, v. 26, n. 3, p. 1- 11, 2017.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n.1, p. 186-193, Jan. 2011.

KAWAKUBO, A.; MAKINO, H.; OHNISHI, J.; HIROHARA, H.; HORI, K. Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. **Journal of Applied Phycology**. v. 11, p. 149–156, 1999.

KHALID, S.; ABBAS, M.; SAEED, F.; BADER-UL-AIN, H.; SULERIA, H.A.R. Therapeutic potential of seaweed bioactive compounds. Londn, UK. **IntechOpen**, 2018.

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

KIM, J.; LEE, J.; JANG, Y.; HA, J.; KIM, D.; JI, M.; LEE, Y. K.; KIM, W.; YOU, S.; DO, J.; RYU, C.; KIM, H. H. N-glycans of bovine submaxillary mucin contain core-fucosylated and

sulfated glycans but not sialylated glycans. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, p. 1072-1078, 2019.

KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D. T.; SHOW, P. L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16-24, 2019.

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

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, Jan 2011.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D458-D460, 2021.

LEVENDOSKY, K.; MIZENINA, O.; MARTINELLI, E.; JEAN-PIERRE, N.; KIZIMA, L.; RODRIGUEZ, A.; KLEINBECK, K.; BONNAIRE, T.; ROBBIANI, M.; ZYDOWSKY, T. M.; O'KEEFE, B. R.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. A. Griffithsin and Carrageenan Combination To Target Herpes Simplex Virus 2 and Human Papillomavirus. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7290-7298, 14 set. 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de BROCK. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 624p. 2004.

MARQUES RIBEIRO, K.; CAMPANA PEREIRA, L.; HOCH BATISTA DE SOUZA, C.; ISAY SAAD, S. M. Comportamento de cepas distintas de *Lactobacillus acidophilus* em queijo *petit-suisse*. **ALAN**, Caracas, v. 62, n. 4, p. 347-354, 2012.

MEINKE, A.; GILKES, N. R.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREN, R. A. Bacterial cellulose-binding domain-like sequences in eucaryotic polypeptides. **Protein Seq Data Anal**, v. 4, n. 6, p. 349-353, 1991.

MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, W. M.; MOURA, R. M.; SILVA, G. C.; SOUSA, O. V.; SABOYA, J. P. S.; DO 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**, v. 64, p. 435-442, 2014.

MESQUITA, J. X.; BRITO, T. V.; FONTENELLE, T. P. C.; DAMASCENO, R. O. S.; PONTE DE SOUZA, H. L.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 532-539, 2021.

MIGUEL, T. B. A. R.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; NASCIMENTO, F. E. P.; CUNHA, M.; PIREDA, S. F.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; CAVADA, B. S.; MIGUEL, E. C. ; SAMPAIO, A. H. Morphology, ultrastructure and immunocytochemistry of *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis*-(Hypneaceae, Rhodophyta) from the coastal waters of Ceará, Brazil. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, n. 2, p. 104-116, 2014.

MISHRA, A.; BEHURA, A.; MAWATWAL, S.; KUMAR, A.; NAIK, L.; MOHANTY, S. S.; MANNA, D.; DOKANIA, P.; MISHRA, A.; PATRA, S. K.; DHIMAN, R. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, 2019.

MOLCHANOVA, V.; CHERNIKOV, O.; CHIKALOVETS, I.; LUKYANOV, P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr.(Rhodophyta), v. 53, n. 1, p. 69-78, 2010.

MOLINARI, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. **Natural Chemical Biology**. v. 3, n. 6, p. 313-20, 2007.

NABETAH. W.; KOUOKAM, J. C.; LASNIK, A. B.; FUQUA, J. L.; PALMER, K. E. Novel Antifungal Activity of Q-Griffithsin, a Broad-Spectrum Antiviral Lectin. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00957-21, 2021.

NAGANO, C.S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K. S.; PINTO, V. P. T.; CAVADA, B. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; 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**, v. 14, p. 2167–2176, 2005.

NAGANO, C.S.; MORENO F.B.; BLOCH M.B., PRATES C.; CALVETE M. J.; SAKERSAMPAIO, S.; FARIAS, W.R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein Peptide Letters**, v. 9, n. 2, p. 159-166, 2002.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; DA SILVA, S. R.; SILVA, B. R.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; NASCIMENTO, K. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SILVA Jr., V. A.; PORTO, A. L. F.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p.1936-1954, 2012.

NIU, J.; WANG, G.; LU, F.; ZHOU, B.; PENG, G. Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 3, p. 502-512, 2009.

O'KEEFE, B. R.; VOJDANI, F.; BUFFA, V.; SHATTOCK, R. J.; MONTEFIORI, D. C.; BAKKE, J.; MIRSALIS, J.; D'ANDREA, A. L.; HUME, S. D.; BRATCHER, B.; SAUCEDO, C. J.; MCMAHON, J. B.; POGUE, G. P.; PALMER, K. E. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6099-6104, 2009.

OKUYAMA, S.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; MATSUBARA, K.; HORI, K. Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core ( $\alpha$ 1-6) fucosylated N-glycans. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 912-920, 2009.

OLIVEIRA, S. C. B.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; CAMARGO, E. A.; MORGANTI, R. P.; APARÍCIO, R.; TOYAMA, D. O.; BERIAM, L. O. S.; NUNES, E. V.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; TOYAMA, M. H. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA<sub>2</sub> by BTL<sub>-2</sub>, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. **BMC biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2008.

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**, v. 1, p. 396-406, 2010.

PÉREZ, M. J.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Antimicrobial action of compounds from Marine Seaweed. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 2-38, 2016.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PINTO, V.; DEBRAY, H.; DUS, D.; TEIXEIRA, E. H.; DE OLIVEIRA, T. M.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, A. H.; FILHO, G. C.; NAGANO, C. S.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2009, 2009.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. M. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine drugs**, v. 13, p. 2967-3028, 2015.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI ES, S. L. M.; ARAÚJO, I. W.; QUEIROZ, I. N.; PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; JORGE, R. J.; MONTEIRO, H. S.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M.



- Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacol Reports**, v. 64, n. 2, p. 282- 92, 2012.
- ROGERS, D. J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a bloodgroup B specific lectin. **Medical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.
- ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260, n. 1, p. 589-593, 1993.
- SABOYA, J. P. S. Isolamento, caracterização parcial de lectinas presentes nas algas marinhas verdes *Udotea flabellum* (J. Ellis & Solander) MA Howe 1904 E *Codium isthmocladum* Vickers 1905 (CIL-3) e avaliação da toxicidade e atividade antibacteriana. 2016. 88 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- SANTOS, K. M. Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH. 2014. 25 f. Monografia (Bacharel em Química) - Centro de Ciências Naturais Humanas, Universidade Federal do ABC, 2014.
- SCHMALTZ, R. M.; HANSON, S. R.; WONG, C. H. Enzyme in the Synthesis of Glycoconjugates. **Chemistry Review**. v. 111, p. 4259-4307, 2011.
- SELL, A. M; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 297-303, 2000.
- SHARMA, P.; SHARMA, N. Industrial and biotechnological applications of algae: a review. **Journal of Advances in Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 01, 2017.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SHARON M. K.; THOMAS J. J.; NICHOLAS C. P. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

SHEEHAN, S. A.; HAMILTON, K. L.; RETZBACH, E. P.; BALACHANDRAN, P.; KRISHNAN, H.; LEONE, P.; GOLDBERG, G. S. Evidence that Maackia amurensis seed lectin (MASL) exerts pleiotropic actions on oral squamous cells to inhibit SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease progression. **Research Square**, v. 403, n. 1, p. 112594, 2020.

SHIRAISHI, T.; YOKOTA, S.; FUKIYA, S.; YOKOTA, A. Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. **Bioscience of microbiota, food and health**, v. 35, n. 4, p. 147-161, 2016.

SINGH, R. S.; THAKURA, S. R.; BANSAL, P. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research **Critical Reviews in Microbiology**, v.41, p 77-88, 2015.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of applied phycology**, v. 30, n. 3, p. 1833-1858, 2018.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Secondary Structures: Helix1 Helix2 Strand1 Strand2 Turns Unordered. **Analytical Biochemistry**, v. 287, p. 252-260, 2000.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.

STEURER, S.; SCHNEIDER, J.; BUSCHECK, F.; LUEBKE, A. M.; KLUTH, M.; HUBER-MAGG, C.; HINSCH, A.; HOFLMAYER, D.; WEIDEMANN, S.; FRAUNE, C.; MOLLER, K.; MENZ, A.; BERNREUTHER, C.; LEBOK, P.; SAUTER, G.; SIMON, R.; JACOBSEN, F.; UHLIG, R.; CLAUDITZ, T. S. Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. **Annals of diagnostic pathology**, v. 54, p. 151793, 2021.

TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, K. S.; CARNEIRO, V. A.; NAGANO, C. S.; SILVA, B. R.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Biological applications

of plants and algae lectins: an overview. **Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. InTech, 2012.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; DE 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, n. 4, p. 1001-1006, 2007.

TORRENT, M.; PULIDO, D.; NOGUÉS, M. V.; BOIX, E. Exploring new biological functions of amyloids: bacteria cell agglutination mediated by host protein aggregation. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 11, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p., 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRANG, V. T. D.; HUNG, L. D. N-Acetylneuraminic Acid Specific Lectin and Antibacterial Activity from the Red Alga *Gracilaria canaliculata* Sonder. **International Journal on Algae**, v. 23, n. 2, 2021.

VARKI, A. *et al.* Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, 2009.

VASCONCELOS, M. A. Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico. 2013. 265 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 679–96, 2013.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W174-W181, 2015.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**. v. 9, n. 40, 23 Jan. 2008.

ZHENG, W.; ZHANG, C.; LI, Y.; PEARCE, R.; BELL, E. W.; ZHANG, Y. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. **Cell Reports Methods**, v. 1, n. 3, p. 100014, 2021.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 617–626, 2006.