



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

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTIMICROBIANO DE
LECTINAS EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS MARINHOS**

FORTALEZA

2023

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTIMICROBIANO DE LECTINAS
EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS MARINHOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Aquáticos

Orientador: Prof. Ph.D. Alexandre Holanda Sampaio

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

FORTALEZA

2023

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)

- A444a Almeida, Alexandra Sampaio de.
Avaliação do potencial antibiofilme e antimicrobiano de lectinas extraídas de organismos marinhos /
Alexandra Sampaio de Almeida. – 2023.
95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Coorientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes..
1. Biofilme. 2. Lectinas. 3. Organismos marinhos. I. Título.
- CDD 639.2
-

ALEXANDRA SAMPAIO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTIMICROBIANO DE LECTINAS
PERTENCENTES A ORGANISMOS MARINHOS

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

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Marina Teresa Torres Rodriguez
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rosa Helena Rebouças
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAR)

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa.

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

A minha irmã Ester Sampaio, a minha pessoa no mundo, por sempre me apoiar e ficar ao meu lado em todos os momentos.

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

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

A minha co-orientadora Professora Gleire Menezes que me acolheu quando mais precisei e abriu as portas do LAMAP. Gratidão por toda ajuda, conversas, abraços, apoio, por ser uma amiga.

Ao Professor Celso Nagano, pelos ensinamentos, incentivo e principalmente por todas as vezes que me ajudou, sei que eu perturbava muito mas o senhor sempre estava disposto a me ajudar.

A Professora Oscarina Viana que me recebeu de braços abertos no LAMAP e me ajudou todas as vezes em que eu estava desesperada. Obrigada pelas conversas, risadas, nossos cafezinhos e por me mostrar que o LAMAP é uma família que acolhe e ajuda. A senhora é um exemplo de professora e pessoa para mim.

A Cristiane Teles por toda ajuda, ensinamentos e principalmente por sua positividade que foi tão importante para mim nesses meses, a sua fé de que tudo ia dar certo fizeram a diferença na minha jornada.

Aos meus amigos lindos, Vladila, Tereza, Raquel, Larissa, Robério, Jhones, Daniel que além de ajudarem nos experimentos ainda foram “obrigados” a me dar colo, me ouvir, me aconselhar, digo e repito que esse caminho até o dia de hoje ficou mais leve e divertido por causa de vocês. E a nossa amizade quero levar por toda a vida.

A minha trigêmea Karolina que tem sido minha parceira desde o mestrado, obrigada por sua amizade e por deixar essa caminhada até o sonhado título de Doutora mais fácil, que honra poder dividir com você esse sonho.

Aos meus companheiros de laboratório Ivis, Pedro Rebeca, Marina, Jéssica, Yasmin, Anna, Iorrana por toda ajuda.

Aos meus amigos lindos que caminham ao meu lado há muito tempo e que nem a distância foi capaz de nos separar Andressa, Pedro Arthur, Vitória.

As minhas amigas maravilhosas Dayara, Juliana, Vladila (vou agradecer a ela de novo) por estarem ao meu lado e acreditarem em mim.

As minhas amigas fitness Bruna, Juliene, Thawlia, Luciana, Patrícia, Cida por todo apoio, conversas e incentivo, a amizade de vocês é um presente.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.” (JOSUÉ 1:9).

RESUMO

O potencial biotecnológico dos organismos marinhos é conhecido desde muitos séculos atrás, e com o decorrer dos anos, vários compostos biologicamente ativos passaram a ser isolados deles. Dentre esses compostos, estão as lectinas, que são proteínas com capacidade de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos, e que possuem várias aplicações biológicas como atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme bacteriano. Os biofilmes são capazes de proporcionar um ambiente “seguro” para os patógenos de peixes e camarões persistirem nos sistemas de aquicultura e, além disso, nesses biofilmes pode haver a presença de patógenos humanos, gerando um potencial risco à saúde pública. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi fazer uma varredura de potenciais atividades biológicas de lectinas isoladas de organismos marinhos contra microrganismos planctônicos e biofilme bacteriano. Foram utilizadas seis lectinas, sendo quatro de algas vermelhas – AML, BTL, BSL, SFL e duas de esponjas AFL e ALL. E essas lectinas foram testadas frente a sete cepas bacterianas sendo duas de referência ATCC (*American Type Culture Collection*): *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e cinco pertencentes ao acervo da coleção de culturas microbianas Profa. Regine Vieira (CMRV): *Streptococcus mutans*, *Samonella* ser. Brandeirup Lamap 18, *Pseudomonas* 246B, *Vibrio parahaemolyticus* 53, *Vibrio alginolyticus* 39. Também foi usada a cepa fúngica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INQS (FIOCRUZ) *Candida albicans* e o *Aspergillus niger* (CRMV). Foram realizados testes antibacterianos de mínima concentração inibitória (MIC) e aglutinação, testes antifúngicos, testes antibiofilme e letalidade contra náuplios de artemia. Como resultado constatou-se que apenas as lectinas de esponjas AFL e ALL apresentaram resultados satisfatórios no teste de MIC inibindo o crescimento das cepas Gram positivas, já no teste de aglutinação todas as lectinas foram capazes de aglutinar várias cepas com destaque para BTL, AFL e ALL que aglutinaram uma maior quantidade, nos testes antifúngicos houve inibição do crescimento do *Aspergillus niger* pelas lectinas AML, BSL, SFL, AFL e ALL. Nos testes antibiofilme todas as lectinas foram capazes de inibir o crescimento de biofilme de alguma cepa, com destaque para AML que inibiu de todas as cepas. Nos ensaios de letalidade SFL foi tóxica, assim deve-se ter cuidado com a aplicação dessa lectina. Diante de tudo que foi encontrado podemos afirmar que as lectinas de organismos marinhos são potentes ferramentas com ação antimicrobiana e antibiofilme que podem ser utilizadas em diversas atividades inclusive na aquicultura.

Palavras-chave: biofilme; lectinas; organismos marinhos.

ABSTRACT

The biotechnological potential of marine organisms has been known for many centuries, and over the years, several biologically active compounds have been isolated from them. Among these compounds are the lectins, which are proteins capable of recognizing and binding in a specific and reversible way to carbohydrates, and which have several biological applications such as antimicrobial activity and inhibition of bacterial biofilm formation. Biofilms are able to provide a “safe” environment for fish and shrimp pathogens to persist in aquaculture systems and, in addition, these biofilms may contain human pathogens, generating a potential risk to public health. Thus, the objective of the present work was to scan the potential biological activities of lectins isolated from marine organisms against planktonic microorganisms and bacterial biofilm. Six lectins were used, four from red algae – AML, BTL, BSL, SFL and two from AFL and ALL sponges. And these lectins were tested against seven bacterial strains, two of which are ATCC (American Type Culture Collection) reference: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and five belonging to the collection of microbial cultures Profa. Regine Vieira (CMRV): *Streptococcus mutans*, *Salmonella* ser. Brandeirup Lamap 18, *Pseudomonas* 246B, *Vibrio parahaemolyticus* 53, *Vibrio alginolyticus* 39. The fungal strain of the National Institute for Quality Control in Health – INQS (FIOCRUZ) *Candida albicans* and *Aspergillus niger* (CRMV) were also used. Antibacterial minimum inhibitory concentration (MIC) and agglutination tests, antifungal tests, antibiofilm tests and lethality against artemia nauplii were performed. As a result, it was found that only the AFL and ALL sponge lectins showed satisfactory results in the MIC test, inhibiting the growth of Gram positive strains, while in the agglutination test all lectins were able to agglutinate several strains, with emphasis on BTL, AFL and ALL that agglutinated a greater amount, in the antifungal tests there was inhibition of the growth of *Aspergillus niger* by the lectins AML, BSL, SFL, AFL and ALL. In the antibiofilm tests, all lectins were able to inhibit the growth of biofilm of some strain, with emphasis on AML, which inhibited all strains. In lethality trials SFL was toxic, so care must be taken with the application of this lectin. In view of all that was found, we can say that lectins from marine organisms are powerful tools with antimicrobial and antibiofilm action that can be used in various activities, including aquaculture.

Keywords: biofilm; lectins; marine organisms.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 -	Representação da estrutura de uma lectina e sua ligação a porções glicídicas na superfície microbiana	25
Figura 2 -	Estrutura de uma lectina contendo o CTLD.....	26
Figura 3 -	Modelo de desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	39
Figura 4 -	Bactérias positivas para teste de vermelho congo.....	53
Figura 5 -	Imagens da aglutinação de células bacterianas monocultura por ação de lectinas de algas marinhas.....	57
Figura 6 -	Imagens da aglutinação de células bacterianas monocultura por ação de lectinas de esponjas marinhas.....	59
Figura 7 -	Resultados dos testes de atividade antifúngica das lectinas de organismos marinhos.....	61
Figura 8 -	Imagens dos resultados do teste de atividade antibiofilme das lectinas de organismos marinhos.....	64

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	Porcetagem de cepas bacterianas aglutinadas pelas lectinas.....	55
Gráfico 2	Ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	63

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Lectinas de organismos marinhos com atividade antibacteriana.....	29
Tabela 2 -	Lectinas de organismos marinhos com atividade antifúngica.....	36
Tabela 3 -	Lectinas utilizadas nos experimentos.....	46
Tabela 4 -	Cepas bacterianas indicadoras de atividade.....	47
Tabela 5 -	Cepas fúngicas indicadoras de atividade	47
Tabela 6 -	Resultados do teste de aderência em vidro e em microplacas de poliestireno.....	54
Tabela 7 -	Resultados da atividade antibacteriana das lectinas em concentrações de 250/500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	55
Tabela 8 -	Resultado do teste de aglutinação de células bacterianas por lectinas de organismos marinhos em concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	56
Tabela 9 -	Resultados da atividade antifúngica das lectinas extraídas de organismos marinhos em concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	61
Tabela 10 -	Resultado do teste de atividade antibiofilme bacteriano de lectinas extraídas de organismos marinhos nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA.....	15
2.1	Potencial biotecnológico dos organismos marinhos.....	15
2.2	Lectinas.....	17
2.2.1	<i>Lectinas de organismos marinhos e seu potencial biotecnológico.....</i>	19
2.2.2	<i>Propriedades antimicrobianas das lectinas.....</i>	23
2.2.3	<i>Características das lectinas com potencial antimicrobiano.....</i>	24
2.2.4	<i>Lectinas de organismos marinhos com potencial antibacteriano.....</i>	27
2.2.5	<i>Lectinas de organismos marinhos com potencial antifúngico.....</i>	35
2.3	Biofilmes.....	38
2.3.1	<i>O que são e como são formados.....</i>	38
2.3.2	<i>Biofilmes e suas implicações na saúde humana.....</i>	41
2.3.2	<i>Biofilmes na aquicultura.....</i>	42
2.3.3.1	<i>As bactérias no ambiente aquícola.....</i>	46
3	METODOLOGIA.....	46
3.1	Lectinas utilizadas.....	46
3.2	Seleção das cepas.....	47
3.2.1	<i>Purificação das cepas bacterianas.....</i>	48
3.3	Produção de biofilme.....	48
3.3.1	<i>Vermelho congo.....</i>	48
3.3.2	<i>Teste de aderência em vidro.....</i>	49
3.3.3	<i>Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC).....</i>	49

3.4	Mínima Concentração Inibitória - MIC.....	49
3.5	Aglutinação de células bacterianas.....	50
3.6	Atividade antifúngica.....	51
3.7	Letalidade em náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	51
3.8	Atividade antibiofilme.....	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Lectinas utilizadas.....	53
4.2	Produção de biofilme.....	53
4.2.1	<i>Vermelho congo - AVC</i>	53
4.2.2	<i>Teste de aderência em vidro e em microplacas de poliestireno (TMC)</i>	54
4.3	Mínima Concentração Inibitória – MIC.....	54
4.4	Aglutinação de células bacterianas.....	55
4.5	Atividade antifúngica.....	59
4.6	Letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	62
4.7	Atividade antibiofilme.....	63
5	DISCUSSÃO	69
5.1	Atividade antibacteriana.....	70
5.1.1	<i>Mínima concentração inibitória – MIC</i>	70
5.1.2	<i>Aglutinação de células bacterianas</i>	72
5.2	Atividade antifúngica.....	73
5.3	Letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	75
5.4	Atividade antibiofilme.....	75
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico dos organismos marinhos é conhecido desde muitos séculos atrás, onde muitos deles eram utilizados no tratamento de diversas enfermidades, mas de forma empírica, e com o decorrer dos anos, vários compostos biologicamente ativos passaram a ser isolados desses organismos (JASPARS *et al.*, 2016). Dentre esses compostos, as lectinas, que são proteínas com capacidade de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos, têm se destacado em várias aplicações biológicas, dentre elas estão atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme bacteriano (OGAWA *et al.*, 2011). Podem mediar a identificação de microrganismos através da interação com carboidratos complexos em superfícies microbianas promovendo comunicações hospedeiro-patógeno, ativação de defesa imunológica e sinalização célula-célula (PROCOPIO *et al.*, 2017).

Encontrar compostos que apresentem potencial antimicrobiano têm sido de extrema importância, visto que os microrganismos estão ficando cada vez mais resistentes aos fármacos existentes no mercado. Dessa forma, as lectinas surgem como uma opção viável e eficaz de antimicrobianos e os mecanismos envolvidos nessa atividade incluem a capacidade de formação de poros, seguida de alterações na permeabilidade celular e, posteriormente, interações com os componentes da parede celular bacteriana (COELHO *et al.*, 2018). Especula-se que a atividade antifúngica desempenhada pelas lectinas esteja associada à propriedade de ligação à quitina, visto que essa ligação pode ocasionar desintegração da parede celular do fungo ou na parada da síntese de uma nova parede celular (COELHO *et al.*, 2018).

Uma outra importante atividade das lectinas é o potencial antibiofilme sendo bastante relevante, principalmente nos dias de hoje, visto que a maioria das infecções microbianas estão associadas a formação do biofilme (MISHRA *et al.*, 2023). Quando as bactérias estão nessa estrutura, ficam mais resistentes a ação de substâncias antibióticas do que os microrganismos na forma planctônica (livres), tornando difícil e limitado os tratamentos terapêuticos contra essas infecções (SINGH; KULKARNI, 2022; VASCONCELOS *et al.*, 2014). Biofilmes são comunidades sésseis microbianas caracterizados por células ligadas a superfícies bióticas ou abióticas, que estão embebidas em uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) autoproduzidas, como polissacarídeos, DNAs extracelulares (eDNAs) e proteínas (KIM; LEE, 2016). Quando há a formação do biofilme, a agregação densa das células e a matriz exopolissacarídica (EPS) fornecem resistência e proteção física, aprimorando a troca genética, concentrando os sinais de detecção do *quorum sensing* (QS) e dificultando a ação dos antimicrobianos (LI; LEE, 2017). *Quorum sensing* é um processo de

comunicação célula a célula que permite sinalização entre espécies e entre reinos que coordenam genes de virulência e terapias antiquorum-sensing têm sido descritas para lectinas animais e vegetais (COELHO, 2018).

É importante destacar que os biofilmes inicialmente foram descritos no ambiente aquático, sendo dessa forma, uma presença bastante comum nos sistemas de aquicultura. São capazes de proporcionar um ambiente “seguro” para os patógenos de peixes e camarões persistirem nos sistemas de aquicultura e, além disso, nesses biofilmes pode haver também a presença de patógenos humanos, gerando um potencial risco à saúde pública (CAI; ARIAS, 2017; KING *et al.*, 2004). O biofilme oferece proteção as bactérias contra substâncias biocidas incluindo antibióticos e desinfetantes que podem ser utilizados na preparação dos viveiros e nas estruturas do cultivo, isso gera grande preocupação, pois dificilmente as bactérias patogênicas serão eliminadas do sistema aquícola, podendo ocasionar doenças recorrentes acarretando diversos prejuízos ao produtor (KING *et al.*, 2004).

É de extrema importância a busca por alternativas que visem impedir a formação de biofilme nos sistemas de aquicultura, nesse contexto as lectinas de organismos marinhos, que já exibiram importantes atividades biológicas incluindo atividade antibiofilme, podem vir a ser uma ferramenta biotecnológica auxiliando na proteção dos animais cultivados e das pessoas que irão consumi-los, beneficiando também o produtor, que além de alcançar sucesso no cultivo poderá fornecer um alimento de qualidade e seguro ao consumidor (KING *et al.*, 2004).

A produção de animais aquáticos precisa aprimorar sua estrutura e protocolos a fim de otimizar o combate a doenças e proteger os animais em cativeiro contra potenciais patógenos no ambiente (MCKENZIE *et al.*, 2018). Entretanto, esses objetivos têm que ser alcançados sem colocar em risco a saúde e segurança dos consumidores. Alinhado com essas necessidades, a busca por novas substâncias ou detecção de bioatividades em substâncias já conhecidas são alternativas importantes no combate aos microrganismos patogênicos para os animais aquáticos sem agregar riscos para humanos.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma varredura de potenciais atividades biológicas de lectinas isoladas de organismos marinhos (algas e invertebrados) contra microrganismos planctônicos e biofilme bacteriano.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Potencial biotecnológico dos organismos marinhos

Os oceanos são responsáveis por cobrir cerca de 70% da superfície da terra, abrigando uma infinidade de organismos que vão desde seres unicelulares (bactérias) até organismos multicelulares e complexos (tubarões, peixes), compreendendo também seres acelulares (vírus) (ROMANO *et al.*, 2017). Durante a evolução, os organismos marinhos foram expostos a adversidades e ambientes hostis (temperatura, salinidade, luz, escassez de alimento, pressão) o que resultou no desenvolvimento de eficientes mecanismos de defesa contra predadores, capacidade de localizar parceiros e suprir a concorrência por recursos limitados, possibilitando a sua sobrevivência. Assim, é possível explicar a presença do grande número de moléculas com potencial biotecnológico presentes nos organismos marinhos, justificando o aumento no interesse por estudos de prospecção e aplicação dessas biomoléculas (RUOCCO *et al.*, 2016; JASPARS *et al.*, 2016). É muito importante ressaltar que uma parcela significativa da biodiversidade da Terra se encontra presente no ambiente marinho (MORA *et al.*, 2011). Entretanto, os cientistas só começaram a investigar os oceanos na metade do século XX (ROMANO *et al.*, 2017).

Dessa forma, podemos afirmar que os organismos marinhos constituem uma rica e importante fonte de compostos com potencial biotecnológico, e que podem pertencer as mais diversas classes, como peptídeos (DOIRON *et al.*, 2018), nucleosídeos (PROKSCH *et al.*, 2002), enzimas (SHARIFIAN *et al.*, 2018), proteínas (VENKTESAN *et al.*, 2017), carotenóides (GALASSO; CORINADELSI; SANSONE, 2017), polissacarídeos (RUOCCO *et al.*, 2016), sem mencionar os famosos metabólitos secundários que têm sido bastante estudados (GARCIA *et al.*, 2018; MAXIMO; LOURENÇO, 2018). A maioria dos compostos produzidos por organismos marinhos não possuem análogos terrestres sendo únicos em termos de estrutura química e atividade biológica, o que torna esses produtos interessantes para o ser humano visando suas possíveis aplicações na produção de medicamentos para o tratamento de diversas doenças (JASPARS *et al.*, 2016).

A utilização de substâncias extraídas de organismos marinhos no tratamento e prevenção de doenças é relatado desde muitas décadas atrás, onde podemos citar como exemplo, a utilização das algas vermelhas *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus* no tratamento popular (medicina tradicional) para resfriados, dores de garganta e doenças pulmonares como tuberculose (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Os antigos povos que

habitavam regiões costeiras, principalmente os chineses e japoneses, consumiam uma variedade de algas ricas em iodo, que, sem dúvida, foram responsáveis pela baixa incidência de bócio entre eles (THAKUR *et al.*, 2005). As algas foram os primeiros organismos marinhos usados no tratamento de doenças devido a facilidade de obtenção (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

No início dos anos 1950, Ross Nigreli cientista no Laboratório Osborn do aquário de Nova Iorque, extraiu uma toxina dos órgãos do pepino do mar das Bahamas (*Actinopyga agassizi*), que foi denominada de “Holothurin” e apresentou atividade antitumoral em camundongos. Embora a “Holothurin” nunca tenha sido comercializada, esta descoberta incentivou a prospecção de novas drogas oriundas do ambiente marinho (NIGRELI *et al.*, 1967; ROMANO *et al.*, 2017).

Ainda na década de 50, foram descobertos dois nucleosídeos (*spongothymidine* e *spongouridine*) oriundos da esponja marinha *Cryptotethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1950). Estes nucleosídeos foram a base para a síntese de duas drogas: Ara-A e Ara-C, sendo este o primeiro agente anti-câncer derivado de um composto marinho, e o Ara-A reconhecido como uma droga antiviral (PROKSCH *et al.*, 2002). Atualmente o Ara-C que também é conhecido como citarabina é utilizado no tratamento de pacientes com leucemia (mielóide aguda e crônica, linfocítica aguda e promielocítica aguda) e linfoma (Hodgkin e encontrados no revestimento do cérebro e da medula espinhal) (SCHWARTSMANN, 2000). Ara-A ou vidarabina foi licenciado como o primeiro nucleosídeo antiviral para o tratamento de infecção sistêmica por vírus do herpes, sendo umas das primeiras drogas derivadas do ambiente marinho aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA - EUA) (SANG VO *et al.*, 2011). Apenas 20 anos depois, em 2007, foi aprovado outro agente anticâncer de origem marinha, a trabectedina (Yondelis), oriunda do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, utilizada no tratamento de sarcomas de tecidos e câncer de ovário (SCHOFFSKI *et al.*, 2008).

Em 2010, um terceiro agente anticancerígeno marinho, a Eribulina, foi desenvolvido a partir do metabólito produzido pela esponja *Halichondria okadai* comercializado como Halaven (MENIS; TWELVES, 2011).

Um outro exemplo de composto oriundo do ambiente marinho e bastante importante utilizado na indústria farmacêutica é o Ziconotida (Prialt®, Elan Corporation), um peptídeo descoberto no gastrópode marinho *Conus magus*, utilizado no tratamento da dor aguda e crônica (MENIS; TWELVES, 2011).

De acordo com o último balanço realizado em 2020 foram isolados 1407 novos produtos marinhos. Tais compostos foram obtidos de microrganismos marinhos, fitoplâncton,

algas verdes, marrons e vermelhas, esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermos (CARROLL *et al.*, 2022). Em 2019 foram isolados 1490 compostos e em 2018 este número chegou a 1554 (CARROLL *et al.*, 2021). Apesar da quantidade de produtos naturais marinhos já isolados ainda há um potencial enorme para a descoberta de novos compostos que podem ter importantes aplicações principalmente na área da saúde humana e animal.

Entretanto, mesmo com elevado número de compostos isolados, caracterizados e que apresentam atividades biológicas importantes, a sua comercialização e utilização no desenvolvimento de fármacos ainda é pequena (CARROLL *et al.*, 2021; JASPARS *et al.*, 2016). Como principais motivos para que isso ocorra estão o tempo e o custo para que o produto chegue ao mercado, as dificuldades encontradas na purificação do composto, baixo rendimento e preocupação com o impacto ecológico na obtenção da matéria prima (TORJESSEN, 2015; JASPARS *et al.*, 2016). No entanto, com o passar dos anos foram desenvolvidas técnicas capazes de fornecer caminhos biossintéticos, principalmente através da engenharia genética, onde o gene responsável pelo composto de interesse é transferido para uma bactéria para ser produzido em larga escala sem causar prejuízos ao ambiente (JASPARS *et al.*, 2016; THISSERA *et al.*, 2022).

Diante de tudo que foi exposto, podemos afirmar que a busca por compostos marinhos que possuam atividade biotecnológica e visando sua aplicabilidade se reveste de grande importância, como para as ciências biomédicas. Nesse contexto podemos destacar as lectinas de organismos marinhos, que têm sido largamente estudadas quanto a sua presença, possibilitando uma excelente fonte de biomoléculas com atividades biológicas relevantes já descritas.

1.2 Lectinas

As lectinas podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados e substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície celular, não alterando a estrutura covalente das ligações glicosídicas, de forma reversível e não covalente (SAMPAIO *et al.*, 1998).

A principal característica das lectinas é a sua capacidade de reconhecer e se ligar de forma específica a carboidratos, e tal reconhecimento pode ser tão específico quanto à interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima (MINKO, 2004). Em geral, essas proteínas

podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade a carboidratos, fonte, estrutura molecular e sequência de aminoácidos (CHEUNG *et al.*, 2015).

Naturalmente, as lectinas existem como monômeros e homo e heteroagregados (isto é, dímeros e tetrâmeros). No entanto, eles são compostos principalmente de várias subunidades, cada uma com um ou vários domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs) (MURAMOTO, 2017). São classificadas com base em suas sequências de aminoácidos, homologia estrutural e dependência de cátions. Por exemplo, as lectinas de organismos marinhos são geralmente classificadas como lectinas do tipo C (CTLs), galectinas (anteriormente chamadas de lectinas do tipo S), lectinas do tipo F (FTLs), lectinas do tipo X (XTLs), lectinas do tipo I (ITL), lectinas do tipo P, pentraxinas, lectinas do tipo ricina, e lectinas de ligação a manana (ELUMALAI *et al.*, 2019; CAMMARATA *et al.*, 2016). Além disso, podem ser categorizadas de acordo com suas preferências de ligação ao açúcar, em lectinas de ligação a ramnose (RBL), lectinas de ligação a fucose (FBL), lectinas de ligação a galactose (GBL), lectinas específicas de GlcNAc, lectinas de ligação a manana (MBL), e lectinas específicas de GalNAc (AHMMED *et al.*, 2022).

São amplamente distribuídas na natureza, estando presente em todos os organismos microbianos, vegetais e animais, e podem também estar envolvidas em vários processos celulares que dependem do reconhecimento específico de carboidratos complexos (OGAWA *et al.*, 2011), podendo identificar os tipos de células e os estágios de desenvolvimento celular, incluindo células-tronco embrionárias (ES) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) através de aplicações histoquímicas, citometria de fluxo e análise *microarray* (TOYODA *et al.*, 2010).

Estas proteínas podem ainda ser utilizadas numa variedade de estudos biotecnológicos, incluindo pesquisa sobre o câncer e imunologia, devido a sua habilidade de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, superfícies celulares, fluidos fisiológicos e, principalmente, por sua capacidade de decifrar o glicocódigo (SHARON; LIS, 2004). As lectinas têm se destacado em várias aplicações biológicas, dentre elas estão atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme bacteriano (MISHRA *et al.*, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2020). Pois podem mediar a identificação de microrganismos através da interação com carboidratos complexos em superfícies microbianas promovendo comunicações hospedeiro-patógeno, ativação de defesa imunológica e sinalização célula-célula (PROCOPIO *et al.*, 2017).

Vale ressaltar, que as lectinas isoladas de animais podem apresentar funções imunológicas e não imunológicas. Entre as funções imunológicas estão: defesa, tráfego e

reconhecimento celular e modulação da resposta imune, e como funções não imunológicas estão: mediação da endocitose, interações célula-célula, regulação do crescimento celular, tráfego intracelular de glicoconjugados, limpeza de restos celulares, ligações extracelulares (MELO *et al.*, 2014; AHMMED *et al.*, 2022). Assim, podemos observar de forma bastante clara que as lectinas estão envolvidas em vários processos biológicos importantes para o animal (ALMEIDA, 2017).

Com o passar dos anos o interesse nas lectinas têm aumentado, justamente pelo fato delas apresentarem importantes atividades biológicas já conhecidas e outras ainda para serem descobertas, incluindo a elucidação dos mecanismos usados na sua ação (ALMEIDA, 2017).

1.2.1 *Lectinas de organismos marinhos e seu potencial biotecnológico*

Na descoberta de compostos bioativos a partir de recursos marinhos, as lectinas são um dos candidatos promissores, principalmente como agentes terapêuticos. A habilidade dessas proteínas em se ligar a carboidratos de forma específica, possibilita o reconhecimento de proteoglicanos, glicoproteínas e glicolípídios, resultando na regulação de várias células via glicoconjugados e seu fenômeno fisiológico e patológico através das interações patógeno-hospedeiro e comunicações célula a célula (OGAWA *et al.*, 2011). Lectinas isoladas a partir de organismos marinhos possuem algumas características importantes, como baixa imunogenicidade, e podem se ligar a glicanos complexos diferentemente das lectinas isoladas de plantas (FERREIRA *et al.*, 2019).

Um dos exemplos mais conhecidos de lectinas isoladas de organismos marinhos com potencial biotecnológico é a Griffithsin (GRFT) que foi isolada a partir de um extrato aquoso da alga vermelha *Griffithsia* sp. Essa lectina demonstrou forte atividade anti-HIV, se ligando a várias glicoproteínas virais de maneira dependente de monossacarídeos, que a partir desse mecanismo consegue ter sua ação anti-HIV (LEE, 2019). Além de inibir o HIV, a lectina Griffithsin também apresentou atividade antiviral contra vários tipos de vírus incluindo o coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) onde a GRFT se liga especificamente à glicoproteína S (spike) da SARS-CoV inibindo a entrada viral (LEE, 2019; O'KEEFE *et al.*, 2009) foi descoberto que ela também é capaz de inibir a infecção por SARS-CoV-2 in vitro, tal fato é de extrema relevância pois a GRFT pode ser mais uma ferramenta no combate a COVID-19 (CAI *et al.*, 2020). Um estudo no ano de 2016 revelou que a GRFT inibiu o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) utilizando o mesmo mecanismo de quando inibe o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, as glicoproteínas S podem variar

de tamanho e sequência dependendo do tipo de coronavírus mas compartilham a mesma organização onde apresentam os domínios S1 e S2. O domínio S1 é responsável pela ligação do receptor à superfície da célula hospedeira, enquanto S2 contém o mecanismo de fusão, a GRFT vai atuar impedindo a ligação entre a glicoproteína S e a célula hospedeira (MILLET *et al.*, 2016). A GRFT pode reconhecer a manose com alta afinidade possuindo assim, atividade antiviral de amplo espectro (LUSVARGHI; BEWLEY, 2016), além disso já foi comprovado que é seguro para humanos, conforme demonstrado no ensaio clínico de fase I do GRFT como um microbicida anti-HIV para prevenção da transmissão sexual do HIV em populações saudáveis (LEE, 2019).

A Griffithsin apresenta potente inibição do Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDv) que infecta populações de suínos na Ásia, Europa e América do Norte, causando enormes perdas econômicas, PEDv é um coronavírus portanto a GRFT vai atuar como foi mencionado anteriormente impedindo a glicoproteína S, Griffithsin além de prevenir a infecção por PEDv também foi capaz de impedir a disseminação viral entre células infectadas e não infectadas (LI *et al.*, 2019). Dessa forma, podemos afirmar que as lectinas são importantes candidatas a anti-coronavírus devido à natureza altamente glicosilada da proteína spike (MILLET *et al.*, 2016). Assim, uma ampla gama de Coronaviridae sp. sensível à griffithsin é um atributo essencial dessa proteína antiviral e determina as perspectivas de seu uso em estratégias anti-coronavírus (ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2020). A próxima etapa no desenvolvimento de um novo medicamento deve ser o estudo de sua ação em ensaios clínicos (ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2020).

Ao contrário dos medicamentos antivirais, que se baseiam na supressão do ciclo de vida do vírus, as lectinas visam prevenir a penetração do vírus nas células hospedeiras e a disseminação do vírus (CHEUNG *et al.*, 2015). As lectinas de algas têm especificidade a carboidratos com características físico-químicas únicas em comparação as lectinas de plantas, assim podem inibir a replicação de muitas classes de vírus, incluindo Ebola, influenza A e B, hepatite C, sarampo e herpes simplex tipo 1 (CHEUNG *et al.*, 2015; ZAPOROZHETS; BESEDNOVA, 2020). Um estudo revelou que a alga marinha vermelha BSL apresentou atividade anti-hiperglicêmica em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, mostrando o potencial de tal lectina como um possível medicamento no combate a diabetes, que é uma das doenças que mais têm crescido nos últimos anos (ALVES *et al.*, 2020). A lectina CiL-1 isolada a partir da *Codium isthmocladum* apresentou efeito anti-inflamatório e antinociceptivo contra várias dores testadas em peixe-zebra adulto pela modulação de TRPA1 (canal iônico localizado na membrana plasmática de muitas células humanas e animais) através da ligação lectina-

glicano, as algas marinhas são fontes de compostos naturais potencialmente relevantes (ALVES *et al.*, 2022).

Em relação as lectinas isoladas de invertebrados marinhos, é importante destacar que elas podem desempenhar um papel relevante nos mecanismos de defesa do animal, reconhecendo invasores, danificando as células independentes e mediando a atividade biológica de células (RAMASUBRAMANIAN; PRIYADARISINI, 2022). A lectina presente nos ovos da *Aplysia kurodai* denominada de AKL-40 mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* e *Bacillus cereus*, e forte atividade antifúngica contra *Talaromyces verruculosus*. Além disso, aglutinou células de carcinoma ascítico de Ehrlich e reduziu seu crescimento em até 58,3% in vivo, quando injetado em camundongos, AKL-40 também inibiu o crescimento de células de eritroleucemia humana (SWARNA *et al.*, 2021). Assim, podemos perceber a multifuncionalidade de uma única lectina podendo desempenhar diversas e relevantes atividades biológicas.

Lectinas geralmente têm seu nível de expressão (lectina produzida de forma recombinante) aumentado quando desafiados por fungos, agindo de maneira semelhante para eliminar bactérias patogênicas invasoras. Assim, essas proteínas que possuem atividade antifúngica podem ser importantes na imunidade inata do animal, no reconhecimento de patógenos e nas interações célula-célula (CHEUNG *et al.*, 2015). Uma lectina conhecida como ADL isolada a partir da esponja marinha *Axinella donnani* apresentou potente atividade antifúngica contra *Penicillium crysogenum* e *Aspergillus flavus*, esses resultados indicam que a lectina pode ser importante para a microbiologia clínica e ter aplicações terapêuticas. (RATHEESH; RAUF, 2018). Outro exemplo é a lectina isolada da *Lampratra japonica* (lampreia) que foi capaz de aglutinar o fungo *Candida albicans*, sugerindo que a lectina possa desempenhar um papel importante na imunidade inata contra leveduras no sistema circulatório interno da lampreia (XUE *et al.*, 2013).

A atividade anticancerígena de lectinas isoladas de organismos marinhos tem se revelado como uma das mais promissoras aplicações biotecnológicas dessas proteínas. Na literatura é possível encontrar diversos exemplos como a H-3, uma das lectinas da esponja marinha *Haliclona caerulea* que foi capaz de reduzir a viabilidade celular de MCF7 (células de câncer de mama), sem prejudicar as células normais. Foi observado também que H3 reduziu drasticamente a adesividade das células MCF7 em cultura (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018). Um outro exemplo é a HOL-18, lectina isolada da esponja marinha *Halichondria okadai*, que foi capaz de matar as células T da leucemia Jurkat e as células da eritroleucemia K562 de maneira dose dependente (MATSUMOTO *et al.*, 2012). O gene que codifica a lectina TTL

isolada do caranguejo *Tachypleus tridentatus* foi inserido em um vetor oncolítico do vírus vaccinia (oncoVV) para formar oncoVV-TTL, que mostrou atividade antitumoral significativa em um modelo de camundongo com carcinoma hepatocelular (LI *et al.*, 2018). Com base em suas características as lectinas podem induzir apoptose e autofagia e inibir a angiogênese, representando assim uma interessante estratégia anticancerígena (BARRE *et al.*, 2019). As lectinas pertencem a uma classe particular de glicoproteínas não imunogênicas e têm a característica de se ligar seletivamente a sequências específicas de açúcares na superfície das células, esta propriedade é explorada para se ligarem exclusivamente a células cancerígenas e exercer atividade antitumoral através da indução de diferentes formas de morte celular regulada e inibição da proliferação de células cancerígenas (BARRE *et al.*, 2019).

Algumas lectinas isoladas de diferentes organismos marinhos foram capazes de inibir a formação de biofilme bacteriano, como é o caso da lectina presente nos ovos da *Aplysia dactylomela* (ADEL), que foi capaz de inibir a formação do biofilme bacteriano de *Staphylococcus aureus* (CARNEIRO *et al.*, 2017a). A lectina isolada da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL) inibiu a formação do biofilme pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017b), assim como a lectina presente na esponja marinha *Aplysina fulva* foi capaz de reduzir significativamente o biofilme das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2019). Um outro exemplo é a lectina isolada do camarão *Penaeus semisulcatus* que inibiu a formação do biofilme das bactérias Gram-negativas *Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas hydrophila*, sugerindo uma potencial estratégia terapêutica na indústria aquícola para o manejo da doença (PREETHAM *et al.*, 2020).

Lectinas isoladas de algas marinhas vermelhas também têm apresentado significativa atividade antibiofilme, é o caso da BSL isolada da *Bryothamnion seaforthii* e da HML isolada da *Hypnea musciformis* que inibiram a formação de biofilme da bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (VASCONCELOS *et al.*, 2014), algas marinhas verdes também apresentam atividade antibiofilme, por exemplo duas lectinas (CiL-1 e CiL-2) da *Codium isthmocladum* foram capazes de inibir significativamente a formação de biofilme das bactérias Gram positivas patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CARNEIRO *et al.*, 2020). Estudos mostram que as bactérias em biofilme ficam mais resistentes a antibióticos do que na forma planctônica, pois eles formam estruturas complexas e bem-organizadas, assim os tratamentos terapêuticos contra essas matrizes microbianas são mais difíceis e limitados (VASCONCELOS, 2013; SINGH; KULKARNI, 2022).

2.2.2 Propriedades antimicrobianas das lectinas

O uso extensivo de agentes antimicrobianos em humanos, animais e plantas favorece o surgimento de microrganismos resistentes a essas drogas. Apesar do grande número de antimicrobianos de amplo espectro comercialmente disponíveis, os microrganismos frequentemente desenvolvem novos mecanismos de resistência para escapar da ação antimicrobiana sendo responsáveis por aumentar as infecções hospitalares e a taxa de mortalidade por essas doenças (COELHO *et al.*, 2018). Existe um grande interesse em isolar substâncias antimicrobianas de fontes naturais, como as lectinas que já demonstraram possuir potencial satisfatório.

As lectinas são biomoléculas versáteis com notáveis efeitos antimicrobianos contra bactérias, fungos e protozoários. Como as lectinas se ligam a carboidratos presentes na superfície do patógeno, podem causar danos à parede celular e impedir a fixação dos microrganismos nas células hospedeiras (FONSECA *et al.*, 2022).

Essas proteínas são de ocorrência natural sendo comumente secretadas em resposta a agentes invasores, como bactérias e fungos, ligando-se a carboidratos presentes na superfície de patógenos e leucócitos, o que resulta em efeitos antimicrobianos diretos e indiretos, respectivamente (LIU *et al.*, 2019). Os papéis antimicrobianos das lectinas incluem bloqueio de invasão e infecção, inibição do crescimento e germinação, regulação da adesão e migração de células microbianas, e o estado de oligomerização delas podem influenciar sua atividade biológica e a capacidade máxima de ligação e a associação entre as cadeias polipeptídicas pode alterar as taxas de ligação carboidrato-lectina, influenciando diretamente o potencial antimicrobiano (COELHO *et al.*, 2018).

Além disso, as lectinas geralmente sofrem oligomerização adicional após sua ligação aos glicanos da superfície microbiana. Essa estrutura oligomérica aumenta a afinidade funcional e favorece a ligação multivalente da lectina ao microrganismo (WESENER *et al.*, 2017).

Os mecanismos antimicrobianos das lectinas incluem a capacidade de formação de poros, seguida de alterações na permeabilidade celular e, posteriormente, indica interações com os componentes da parede celular, nos casos da bactéria. Já a atividade antifúngica das lectinas parece estar associada à propriedade de ligação à quitina, resultando na desintegração da parede celular ou na interrupção da síntese de nova parede celular durante o desenvolvimento ou divisão do fungo (COELHO *et al.*, 2018).

As células microbianas usam um mecanismo de comunicação chamado de *Quorum sensing* (QS) que permite coletivamente ajustar o comportamento em resposta a uma variedade de mecanismos, como densidade e diversidade de espécies. Algumas lectinas podem apresentar efeito anti QS o que vai impedir a comunicação dos microrganismos interferindo na expressão gênica que torna sem virulência os microrganismos patogênicos (SILVA *et al.* 2016).

O reconhecimento de glicoconjugados de membrana de microrganismos permite que as lectinas atuem como agentes inibitórios da formação e crescimento de biofilme, o que vem a ser interessante já que os microrganismos quando em biofilme se tornam mais resistentes (COELHO *et al.*, 2018).

Além disso, estudos revelaram que as lectinas são capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática de alguns fungos e causar mudanças morfológicas como a formação de pseudo-hifas, redução na formação de hifas e danos às paredes celulares, indicando possíveis mecanismos de atuação dessas proteínas com potencial antifúngico (REGENTE *et al.*, 2014).

Uma variedade de métodos laboratoriais pode avaliar a eficácia das lectinas antimicrobianas; a primeira indicação de atividade antimicrobiana por ensaios *in vitro* permite a descoberta de novos compostos e seu modo de ação. As lectinas antimicrobianas avaliadas por ensaios *in vivo* podem favorecer as avaliações pré-clínicas para assegurar eficácia, segurança e a melhor dosagem (BARTON *et al.* 2014). A identificação desses mecanismos representa um passo importante para a aplicação efetiva de novos fármacos, pois será útil para estabelecer estratégias de liberação de fármacos, aumentar a eficácia de possíveis formulações, bem como prever mecanismos de resistência microbiana futura e inevitável (PICHL *et al.*, 2016).

2.2.3 Características das lectinas com potencial antimicrobiano

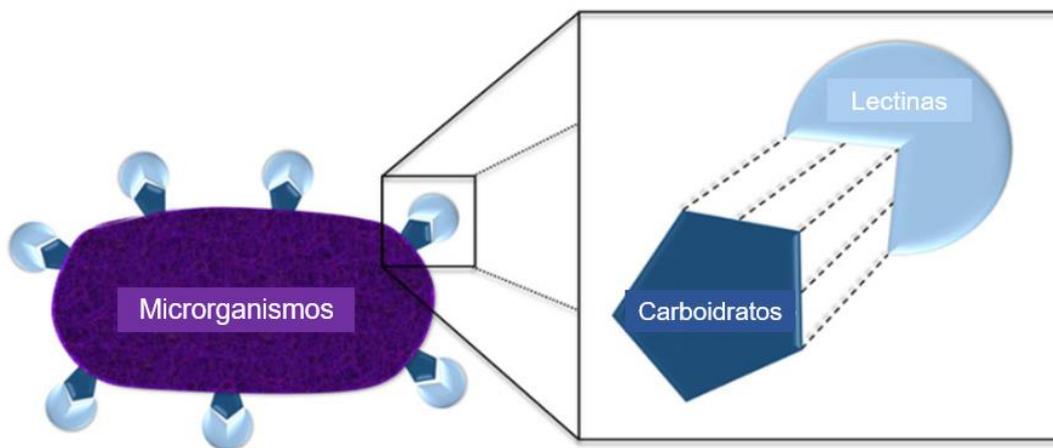
Os glicanos presentes na superfície celular estão particularmente relacionados com a patogenicidade de alguns microrganismos. Uma variedade de glicanos compõem a parede celular de bactérias que, por sua vez, protege esses microrganismos da lise osmótica, há também açúcares específicos expressos apenas em células procarióticas que podem ser considerados alvos importantes para diagnóstico e ação de drogas (TRA; DUBE, 2014).

A parede celular das bactérias Gram-positivas possui ácidos teicurônicos, teicóico e peptidoglicano, enquanto as das bactérias Gram-negativas contêm lipopolissacarídeos. Interações hidrofóbicas, van der Waals e pontes de hidrogênio entre a lectina e o sítio de açúcar

ajudam a lectina a se ligar aos carboidratos expostos na membrana externa ou na parede celular da bactéria, gerando um sítio na membrana celular, criando seu alvo para a apoptose pela remoção de componentes intracelulares (SILVA; ARAÚJO, 2021).

Um exemplo da atração entre lectinas e os carboidratos presentes na superfície microbiana pode ser observado na Figura 1, onde a lectina se liga por forças atrativas, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (FERNANDEZ-ALONSO *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2018).

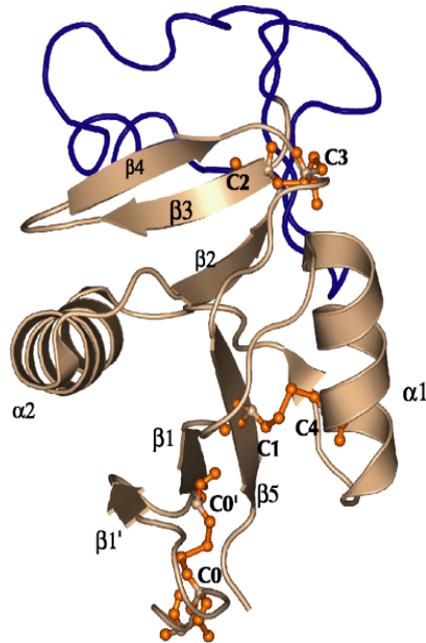
Figura 1 - Representação da estrutura de uma lectina e sua ligação a porções glicídicas na superfície microbiana.



Fonte: COELHO *et al.*, 2018 com adaptações. As linhas tracejadas mostram as forças atrativas de ligação.

Há casos de lectinas que requerem íons para interagir com os carboidratos, são as chamadas lectinas dependentes de Ca^{2+} ou tipo C, e há alguns anos foram denominadas de proteínas contendo o CTLD (domínio lectinico tipo C) (VASTA *et al.*, 2012), o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) dessas proteínas é altamente conservado sendo formado uma estrutura de dupla alça estabilizada na base por duas pontes de dissulfeto altamente conservadas como observado na Figura 2 (GASMI *et al.*, 2017). As lectinas do tipo C podem reconhecer e se ligar a carboidratos específicos presentes na superfície de patógenos, elas também são consideradas como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que desempenham papéis significativos no não autorreconhecimento e na eliminação de microrganismos invasores (FERNANDEZ-ALONSO *et al.*, 2013). Além de funcionar como PRRs, os CTLs também participam de outras respostas imunes, como atividade antibacteriana, fúngica ou viral (VASTA *et al.*, 2012; WOHLSCHLAGER *et al.*, 2014).

Figura 2 - Estrutura de uma lectina contendo o CTLD (domínio lectinico tipo C)



Fonte: ZELENSKY; GREADY, 2005. Representação em desenho de uma estrutura CTLD típica. A região do loop longo é mostrada em azul. As pontes de cistina são mostradas como bastões laranja. A ponte de cistina específica para CTLDs de forma longa também é mostrada.

Um obstáculo substancial ao tratamento existente de doenças bacterianas é a falta de sondas específicas que possam ser usadas para diagnosticar e tratar bactérias patogênicas de maneira seletiva, deixando o microbioma praticamente intacto. Para enfrentar este problema, há uma necessidade urgente de desenvolver terapias e diagnósticos específicos de patógenos (TRA; DUBE, 2014), nesse cenário as lectinas se destacam já que são capazes de reconhecer os glicanos presentes na parede celular das bactérias de maneira específica. Podendo atuar como uma valiosa ferramenta biotecnológica com estratégias terapêuticas de diagnóstico direcionado (FONSECA *et al.*, 2022).

Um estudo demonstrou uma outra função importante que as lectinas exercem no combate aos microrganismos, elas podem potencializar o efeito do antibiótico. Tal fato foi observado na lectina da *Dioclea violacea*, a proteína não apresentou atividade antibacteriana relevante contra bactérias multirresistentes, como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. No entanto, foi capaz de potencializar o efeito antibacteriano do antibiótico gentamicina, reduzindo a concentração inibitória mínima contra *S. aureus* e *E. coli* em 80,1% e 60,3%, respectivamente. Assim, os autores propuseram que a lectina atua entregando o fármaco às células alvo através do reconhecimento de carboidratos na membrana, o que leva à liberação de gentamicina, facilitando a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano (SANTOS *et al.*, 2020; FONSECA

et al., 2022). Diante do que foi exposto, podemos observar a gama de potenciais atividades antimicrobianas que as lectinas podem exercer.

2.2.4 *Lectinas de organismos marinhos com potencial antibacteriano*

Organismos marinhos, incluindo peixes, crustáceos, moluscos e algas produzem uma infinidade de lectinas, incluindo lectinas ligantes de ramnose (RBL), lectinas ligantes de fucose (FTL), lectinas ligantes de manose, galectinas, lectinas ligantes de galactose e lectinas do tipo C (AHMMED *et al.*, 2022).

É possível encontrar várias lectinas de organismos marinhos que possuem atividade antibacteriana, uma bastante relatada é a aglutinação, em que as lectinas reconhecem os componentes da parede celular bacteriana, como lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano (PGN), fazendo com que ocorra a aglomeração dessas bactérias. Facilitando assim a eliminação delas, agindo com uma notável atividade imunomoduladora e, portanto, podendo estimular o sistema de defesa contra agentes invasores (FONSECA *et al.*, 2022). Um exemplo é a lectina tipo C extraída do crustáceo *Procambarus clarkii* que apresentou atividade aglutinante na presença de *Staphylococcus aureus* e *Vibrio alginolyticus*. Além disso, a inoculação da lectina no crustáceo facilitou a eliminação da bactéria *Vibrio alginolyticus*, indicando um possível papel no sistema imunológico do animal (ZHANG *et al.*, 2018). Uma lectina recombinante denominada de rLvCTL3 obtida a partir do camarão *Litopenaeus vannamei*, mostrou atividade aglutinante contra *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus subtilis*. Essa lectina foi capaz de reduzir a mortalidade de camarões infectados com *Vibrio parahaemolyticus*, é importante ressaltar que rLvCTL3 foi detectado em todos os tecidos de camarões, especialmente em hemócitos e brânquias, sugerindo que ela pode estar envolvida no reconhecimento de patógenos e na resposta imune (LI *et al.*, 2014). A CGL, lectina de mexilhão *Crenomytilus grayanus*, inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, principalmente de *Escherichia coli* onde ligou-se fortemente aos resíduos de galactose presentes na superfície das células bacterianas (KOVALCHUK *et al.*, 2013). Esse tipo de ligação pode causar danos à membrana, levando à geração de poros, que resulta na morte celular (ZHANG *et al.*, 2020).

Lectinas de organismos marinhos podem ainda opsonizar bactérias invasoras através do aumento da fagocitose. Um claro exemplo é a HSL lectina do pepino-do-mar *Holothuria scabra*, que reduziu o número de unidades formadoras de colônias quando exposta a infecção bacteriana artificial desde o primeiro dia de teste, atingindo a inibição completa no

quinto dia de inoculação. Esta lectina também inibiu o crescimento bacteriano *in vitro* em comparação com a ampicilina usada como controle (GODWA *et al.*, 2008).

A lectina CgLec-4E isolada da ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) foi capaz de aglutinar e inibir o crescimento do microrganismo *Vibrio alginolyticus*. Essa bactéria patogênica tem sido responsável por causar mortalidade em massa em cultivos de ostras e de outros animais cultivados como camarão, sendo também patogênica para humanos em que causam desde gastroenterite até infecções sistêmicas (IYAMA *et al.*, 2021). No mesmo estudo a ostra foi desafiada com *Vibrio alginolyticus* e observou-se como resultado que a CgLec-4E teve sua expressão aumentada principalmente na glândula digestiva sugerindo que a infecção bacteriana pode induzir a síntese dessa lectina em *Crassostrea gigas*. A glândula digestiva das ostras é responsável por filtrar os alimentos no ambiente aquático, portanto, esse tecido mucoso também está envolvido na resistência a invasores patogênicos (IYAMA *et al.*, 2021).

Uma outra atividade antibacteriana e bastante relevante desempenhada pelas lectinas é a atividade antibiofilme. Essas proteínas podem impedir a aderência de microrganismos a uma superfície, o que pode afetar a formação de biofilme, uma vez que a adesão é o primeiro passo neste processo. A formação de biofilme é um importante mecanismo de resistência bacteriana, representando uma causa significativa de infecções persistentes e recorrentes. Assim como a indução de agregação, a formação de biofilme tem sido associada ao aumento da frequência de mutações bacterianas fazendo com que ocorra uma menor suscetibilidade aos antibióticos, por isso lectinas que com potencial antibiofilme são tão interessantes (FONSECA *et al.*, 2022). Algumas lectinas podem afetar apenas a formação do biofilme e não causar dano algum nas bactérias na forma planctônica, um exemplo é a AFL lectina extraída da esponja marinha *Aplysina fulva* foi eficaz na inibição da emissão do biofilme por *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, mas sem afetar suas formas planctônicas (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Na tabela 1 estão listadas as lectinas isoladas de organismos marinhos relatadas na literatura que possuem alguma atividade antibacteriana, como inibição do crescimento bacteriano, antibiofilme e aglutinação.

Tabela 1 - Lectinas de organismos marinhos com atividade antibacteriana.

ESPÉCIE	LECTINA	MICROORGANISMOS INIBIDOS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>Portunus trituberculatus</i>	rPtCLec2	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Aglutinação	LIU <i>et al.</i> , 2021
<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjSJL-1	<i>Vibrio splendidus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>	Aglutinação	ZHAO <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudocentrotus depressus</i>	PdMBCL 1 PdMBCL 2	<i>Lactococcus garvieae</i>	Aglutinação	IYAMA <i>et al.</i> , 2021
<i>Crassostrea gigas</i>	CgLec-4E	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Aglutinação e inibição do crescimento	CHE <i>et al.</i> , 2021
<i>Paralichthys olivaceus</i>	rPoGalectina-9	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>E. tarda</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Aglutinação	YU <i>et al.</i> , 2021
<i>Hemifusus pugilinus</i>	Hp-Lec	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus sp</i>	Aglutinação	SIVAKAMAVALLI <i>et al.</i> , 2021
<i>Venerupis philippinarum</i>	rVpClec-3 rVpClec-4	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio splendidus</i>	Aglutinação	XIN <i>et al.</i> , 2020

<i>Penaeus semisulcatus</i>	semisulcatus lectin	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Antibiofilme	PREETHAM <i>et al.</i> , 2020
<i>Takifugu obscurus</i>	rToCTL1-CRD rToCTL2-CRD	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Aglutinação e Inibição do crescimento	HUANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Salmo salar</i>	Galectina-3C	<i>Moritella viscosa</i>	Aglutinação	PATEL <i>et al.</i> , 2020
<i>Oplegnathus punctatus</i>	rOppFEL	<i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Aglutinação	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjGal-1	<i>Vibrio splendidus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus leteus</i>	Aglutinação e Inibição do crescimento	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Litopenaeus vannamei</i>	rLvPLP	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	Aglutinação	BI <i>et al.</i> , 2020
<i>Lateolabrax japonicus</i>	LjGalBL-1 r LjGalBL-1	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Aglutinação	DANG <i>et al.</i> , 2019
<i>Aplysina fulva</i>	AFL	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Antibiofilme	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2019

<i>Sebastes schlegelii</i> (black rockfish)	SsGal8	<i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Streptococcus parauberis</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Vibrio tapetis</i>	Aglutinação	MADUSANKA <i>et al.</i> , 2019
<i>Metapenaeus monoceros</i>	MmLec	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Antibiofilme	PREETHAN <i>et al.</i> , 2019
<i>Metapenaeus dobsoni</i>	Md-Lec	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Aglutinação	RUBEENA; PREETHAM, 2019
<i>Halichondria okadai</i>	HOL-18	<i>Shigella boydii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Inibição do crescimento e antibiofilme.	HASAN; OSEKI, 2019
<i>Oplegnathus punctatus</i>	rOppCTL	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Aglutinação	LIU <i>et al.</i> , 2019
<i>Portunus trituberculatus</i>	rPtLTL1	<i>Bacillus aquimaris</i> , <i>Micrococcus lysodeik</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i>	Aglutinação	LU <i>et al.</i> , 2018

		<i>Chryseobacterium indologensis</i>		
<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjCTL-2	<i>Vibrio splendidus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>	Aglutinação	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>Apostichopus japonicus</i>	rSJL-1	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactococcus garvieae</i>	Aglutinação	ONO <i>et al.</i> , 2018
<i>Procambarus clarkii</i>	PcLec6	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i>	Aglutinação	ZHANG <i>et al.</i> , 2018
<i>Chondrilla caribensis</i>	CCL	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> .	Antibiofilme	MARQUES <i>et al.</i> , 2018
<i>Aplysia dactylomela</i>	ADEL	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antibiofilme	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2017
<i>Portunus pelagicus</i>	Pp-Lec	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter murlinae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morgani</i> , <i>Bacillus pumulis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Inibição do crescimento e Antobiofilme	JAYANTHI <i>et al.</i> , 2017
<i>Aplysina lactuca</i>	ALL	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Antibiofilme	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2017

<i>Mytilus trossulus</i>	MTL	<i>Vibrio proteolyticus</i>	Aglutinação	LITOVCHENKO <i>et al.</i> , 2016
<i>Echinometra lucunter</i>	ELEL	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aglutinação	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2015
<i>Litopenaeus vannamei</i>	rLvgalectina	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aeromonas veronii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Inibição do crescimento	CHA <i>et al.</i> , 2015
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BSL	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antibiofilme	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypnea musciformis</i>	HML	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antibiofilme	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2014
<i>Holothuria grisea</i>	HGA-2	<i>Escherichia coli</i>	Aglutinação	MELO <i>et al.</i> , 2014
<i>Litopenaeus vannamei</i>	LvCTI3	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	Aglutinação	LI <i>et al.</i> , 2014
<i>Epinephelus coioides</i>	rEc-CTL	<i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Aglutinação	WEI <i>et al.</i> , 2010.
<i>Holothuria scabra</i>	HSL	<i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Shigella sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	Inibição do crescimento	GODWA <i>et al.</i> , 2008
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	rFc-hsL	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,	Inibição do crescimento	SUN <i>et al.</i> , 2008

		<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	rmFc-hsL	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inibição do crescimento	SUN <i>et al.</i> , 2008
<i>Rachycentron canadum</i>		<i>Escherichia coli</i>	Inibição do crescimento	NGAI; NG, 2007
<i>Solieria filiformes</i>	SFL	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibição do crescimento	HOLANDA <i>et al.</i> , 2005
<i>Cliona varians</i>	CvL	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Inibição do crescimento	MOURA <i>et al.</i> , 2006
<i>Suberites domuncula</i>	<i>Suberites lectin</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	Inibição do crescimento	SCHRODER <i>et al.</i> , 2003
<i>Modiolus modiolus</i>		<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio ordalii</i>	Aglutinação	TUNKIJJANUKIJ <i>et al.</i> , 1997

Fonte: Autora, 2022.

2.2.5 Lectinas de organismos marinhos com potencial antifúngico

Evidências indicaram que, assim como a interação com componentes bacterianos, a interação de lectinas com carboidratos fúngicos pode envolver diferentes graus de afinidade (WU *et al.*, 2016). As lectinas geralmente inibem o crescimento fúngico alterando a estrutura da membrana celular fúngica ou ligando-se a carboidratos da parede celular fúngica, assim a

interação com os glicanos e peptidoglicanos leva à morte dos fungos pela permeabilização da parede celular (AHMMED *et al.*, 2022).

Embora muitas lectinas tenham suas atividades antifúngicas atribuídas à sua capacidade de interagir com os carboidratos, estudos têm demonstrado que essas moléculas podem se relacionar com outros componentes (além dos glicanos) da superfície celular dos fungos, induzindo alterações morfológicas (como a transição de leveduras para formas filamentosas), aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição da produção de biofilme (FONSECA *et al.*, 2022).

As lectinas derivadas de plantas são as mais relatadas na literatura quando se fala em atividade antifúngica, corroborando as evidências de que participam da defesa das plantas contra insetos, bactérias e fungos (YAN *et al.*, 2005; KONOZY *et al.*, 2022). Entretanto, podemos encontrar diversas lectinas de organismos aquáticos que apresentaram atividade antifúngica (ZHAO *et al.*, 2021; SADANANDAN; RAUF, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

Foi verificado que a lectina de mexilhão *Crenomytilus grayanus*, identificada como (CGL), teve sua expressão elevada no manto de animais infectados com *Pichia pastoris*, atingindo o pico de concentração após 12 horas e retornando ao padrão original em 24 horas. O maior nível de expressão de CGL no manto implica que esta lectina poderia ter uma contribuição significativa para a prevenção da reprodução microbiana, uma vez que o manto é constantemente lavado com água do mar contendo patógenos e poluentes. No mesmo estudo CGL apresentou atividade antifúngica contra as cepas dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e st. *Mycelia* em que foi capaz de inibir a germinação de esporos e o crescimento de hifas (CHIKALOVETS *et al.*, 2015). Um exemplo similar é a MTL lectina isolada do mexilhão *Mytilus trossulus* que foi submetida ao ensaio de inibição da germinação de esporos, inibindo o crescimento dos fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Haematonectria*, *Aspergillus* e *Alternaria* (CHIKALOVETS *et al.*, 2016).

A lectina FCL obtida a partir da esponja marinha *Fasciospongia cavernosa* inibiu o crescimento de cinco fungos fitopatogênicos, apresentando uma potente atividade antifúngica contra *Penicillium chrysogenum* e *Candida albicans* (SADANANDAN; RAUF, 2021).

Além de inibir o crescimento dos fungos as lectinas de organismos aquáticos também podem causar a aglutinação, um exemplo é a Semisulcatus-lectina isolada do camarão *Penaeus semisulcatus* que aglutinou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PREETHAN *et al.*, 2020).

A investigação de potenciais agentes antifúngicos de origem natural que possuam segurança alimentar e baixa toxicidade para animais e humanos com a finalidade de utilização

em culturas de alimentos é primordial (VAN DER WATT *et al.*, 2011; PREETHAN *et al.*, 2020). Nesse contexto, as lectinas que apresentam atividade antifúngica podem ser usadas como um fungicida natural, melhorando a produção de alimentos e consequentemente gerando impactos positivos na segurança alimentar e na qualidade do meio ambiente (SADANANDAN; RAUF, 2021).

Assim, a descoberta de lectinas com potencial de antifúngico obtidas a partir de organismos aquáticos são de grande relevância. Na tabela 2 estão listadas as lectinas com essas características já relatadas na literatura.

Tabela 2 - Lectinas de organismos marinhos com atividade antifúngica.

ESPÉCIE	LECTINA	MICROORGANISMOS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
		INIBIDOS		
<i>Griffithia</i> sp	Q-Griffithsin,	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i>	Inibição do crescimento	NABETA <i>et al.</i> , 2021
<i>Hemifusus pugilinus</i>	Hp-Lec	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Inibição do crescimento	SIVAKAMAVALLI <i>et al.</i> , 2021
<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjSJL-1	<i>Pichia pastoris</i> , <i>Yarrowia lipolytic</i>	Aglutinação	ZHAO <i>et al.</i> , 2021
<i>Fasciospongia cavernosa</i>	FCL	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Candida albicans</i>	Inibição do crescimento	SADANANDAN; RAUF, 2021
<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjGal-1	<i>Pichia pastoris</i>	Aglutinação	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Semisulcatus-lectina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	PREETHAN <i>et al.</i> , 2020
<i>Halichondria okadai</i>	HOL-18	<i>Aspergillus niger</i>	Inibição do crescimento	HASAN; OSEKI, 2019
<i>Metapenaeus monoceros</i>	MmLec	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	PREETHAN <i>et al.</i> , 2019
<i>Metapenaeus dobsoni</i>	Md-Lec	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	RUBEENA; PREETHAM, 2019

<i>Apostichopus japonicus</i>	rAjCTL-2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aglutinação	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>Apostichopus japonicus</i>	rSJL-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	ONO <i>et al.</i> , 2018
<i>Axinella donnani</i>	ADL	<i>Penicillium crysogenum</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Inibição do crescimento	RATHEESH; REAU, 2018
<i>Portunus pelagicus</i>	Pp-Lec	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	JAYANTHI <i>et al.</i> , 2017
<i>Mytilus trossulus</i>	MTL	<i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Haematonectria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i>	Inibição do crescimento	CHIKALOVETS <i>et al.</i> , 2016
<i>Crenomytilus grayanus</i>	CGL	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> e st. <i>Mycelia</i>	Inibição do crescimento	CHIKALOVETS <i>et al.</i> , 2015
<i>Argopecten irradians</i>	AiCTL-7	<i>Pichia pastoris</i>	Aglutinação	KONG <i>et al.</i> , 2011
<i>Epinephelus coioides</i>	rEc-CTL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aglutinação	WEI <i>et al.</i> , 2010

Fonte: Autora, 2022.

2.3 Biofilmes

2.3.1 O que são e como são formados

Os microrganismos podem estar na natureza na forma planctônica (livre) ou em biofilmes (agrupados). O desenvolvimento do conceito de biofilme aconteceu de forma gradual, e podemos defini-los como comunidades microbianas complexas, estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies, que estão associadas a uma matriz extracelular (EPS) composta por vários tipos de biopolímeros derivados do metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2011). A matriz extracelular consiste em celulose, alginatos, poli-N-acetil glucosamina, ácido teicóico extracelular, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, fosfolipídios, polissacarídeos,

DNA extracelular e outros compostos orgânicos (SIMÕES *et al.*, 2010) , cerca de 90% da biomassa dos biofilmes é composta por EPS (STEWART; FRANKLIN, 2008).

Os biofilmes têm altas densidades celulares variando de 10^8 a 10^{11} células por grama de peso úmido. Eles estão persistentemente ligados a superfícies bióticas e abióticas, desde o dente ou pulmão humano e o intestino de uma vaca até uma rocha submersa em um riacho em movimento rápido (GEBREYOHANNES *et al.*, 2019).

A primeira noção da existência de biofilme parte do princípio de que em ambientes aquáticos as bactérias são predominantemente encontradas ligadas as superfícies. Outro fato que corrobora com essa observação, é a incrustação por microrganismos nos cascos de embarcações que navegam nos oceanos, fato que constitui um grande problema na navegação marítima há muito tempo (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

As primeiras pesquisas envolvendo a formação de biofilme foram iniciadas com o objetivo de localizar e quantificar bactérias em diversos ecossistemas que tinham habilidade de formar consórcios funcionais em comunidades sésseis altamente protegidas, buscando entender como esse mecanismo funcionava através inicialmente de técnicas morfológicas (CONSTERTON, 2004).

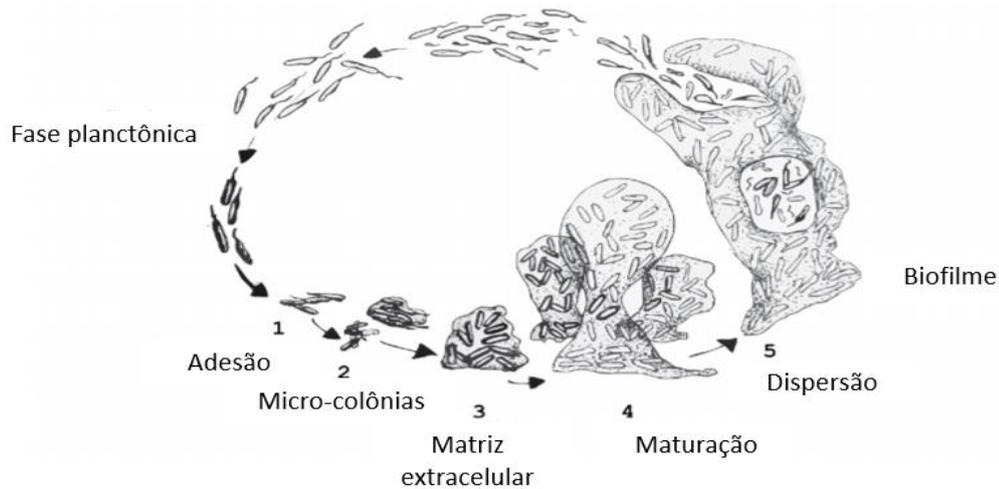
. O que impulsionou os estudos de biofilmes foi o surgimento de infecções bacterianas crônicas causadas por eles, principalmente a dificuldade de controlar tais infecções e explicar sua natureza. Os estudos ganharam força com o surgimento do microscópio confocal de varredura a laser, devido sua capacidade de examinar amostras hidratadas vivas em superfícies opacas (CONSTERTON, 2004).

Os biofilmes podem ser formados por uma única espécie microbiana ou por múltiplas espécies (mistos), além disso, podem se estabelecer em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas. Apesar de poder ser capaz de se mostrar de forma mista na maioria dos ambientes, os biofilmes formados por uma única espécie são alvos de mais estudos pois estão associados a infecções, como por exemplo a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, muito pesquisada por apresentar elevada formação dessas comunidades bacterianas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2021).

Resumidamente no ciclo biológico do biofilme temos: adesão microbiana, formação de colônias, maturação do biofilme e dispersão final (Figura 3). Há indícios de que as bactérias iniciam o biofilme a partir de estímulos ambientais específicos, como uma forma de resposta, que está ligada também a disponibilidade de nutrientes no meio, onde passam por uma transição de uma existência planctônica (“solitária”) para uma existência baseada na comunidade (PALUCH *et al.*, 2020). A adesão inicial a superfície é fraca, assim essa etapa tem

caráter reversível. Portanto, se alguma coisa atrapalhar esse estágio inicial a formação do biofilme será interrompida, mas caso não haja nenhum empecilho a adesão aumentará tornando-se permanente (LICKER *et al.*, 2017).

Figura 3 - Modelo de desenvolvimento do biofilme bacteriano.



Fonte: LICKER *et al.*, 2017. Inicialmente as bactérias estão na forma planctônica, 1- Adesão, 2- Formação das micro colônias, 3- Produção da matriz extracelular, 4- Maturação, 5- Dispersão.

Vale ressaltar que existe um mecanismo de comunicação entre as bactérias o QS que depende diretamente da densidade populacional bacteriana, sendo essa comunicação chave fundamental no processo de estabelecimento e formação do biofilme (PALUCH *et al.*, 2020). No QS há a comunicação célula a célula, que pode controlar a expressão de genes relacionados a fenótipos de virulência em patógenos humanos clínicos (PAPENFORT; BASSLER, 2016). A detecção desse mecanismo de comunicação envolve a produção, liberação e identificação de moléculas de sinalização extracelular conhecidas como autoindutores (pequenas moléculas que controlam a detecção do QS pela interação com receptores específicos), que são detectados pelas bactérias e passam a executar um comportamento coletivo, como se o biofilme fosse um único organismo (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Alguns estudos já relataram a importância do QS na formação dos biofilmes, mas ainda não se sabe em detalhes como funciona, embora é conhecido que existem os inibidores de *quorum sensing* (QSI), que têm mostrado eficiência na inibição da formação do biofilme. Dessa forma, os QSI são propostos como promissores agentes antibiofilmes, podendo inibir a síntese ou degradação direta do sinal, inibição da ligação da molécula de sinal ao receptor e/ou inibição da cascata de transdução de sinal. Assim os QSI podem ajudar no tratamento e

gerenciamento clínico de infecções microbianas. (BRACKMAN; COENYE, 2015; REEN *et al.*, 2018). É importante frisar que o QS ocorre de forma diferente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo variar também de espécie para espécie, e em ambas, a detecção ocorre por meio de diversos sinais químicos (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017).

Estudos sugerem a utilização de moduladores sintéticos como medicamentos anti-*virulência*, pois eles podem agonizar ou antagonizar a detecção do QS. Ao contrário dos antibióticos tradicionais, os moduladores sintéticos não afetam o crescimento das bactérias patogênicas, mas interrompem sua virulência (REEN *et al.*, 2018).

Quando ocorre o estágio inicial de fixação do biofilme, as bactérias aderidas passam a produzir uma matriz de exopolissacarídeos fortalecendo sua aderência e, a partir daí o biofilme sofrerá maturação se tornando uma estrutura tridimensional complexa de células que poderão alterar seu funcionamento fisiológico em resposta as condições presentes no biofilme (BRACKMAN; COENYE, 2015; STOODLEY *et al.*, 2002). É importante mencionar que as células bacterianas podem se soltar do biofilme tanto de forma ativa ou passiva, voltando ao estado planctônico podendo ou não colonizar outras superfícies (BRACKMAN; COENYE, 2015).

Quando estão maduros os biofilmes apresentam uma estrutura tridimensional bastante complexa, onde há a formação de microambientes que podem diferir com relação a osmolaridade, suprimento nutricional e densidade celular (FUX *et al.*, 2005; GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2021).

2.3.2 *Biofilmes e suas implicações na saúde humana*

O número de infecções causadas por biofilmes tem aumentado, entretanto, são mais difíceis de serem detectados do que as bactérias na forma planctônica. O que torna as infecções causadas por essas matrizes tão graves é a resistência que apresentam a antibióticos e as defesas naturais dos hospedeiros, pois os anticorpos assim como os antibióticos não conseguem penetrar no biofilme devido a matriz polimérica que eles formam, além disso, a resistência pode ser disseminada através da transferência horizontal de genes (FUX *et al.*, 2005). Estima-se que os biofilmes sejam responsáveis por cerca de 80% das infecções microbianas, incluindo infecções associadas e não associadas a dispositivos. É do conhecimento geral o responsável pelo aumento da resistência a agentes antimicrobianos, quando os microrganismos estão em biofilme, podendo essa resistência ser aumentada em até 1000 vezes em comparação com as bactérias na forma planctônica. A resistência aos antibióticos pode ser resultante de uma

combinação de fatores genéticos e induzidos (BRACKMAN; COENYE, 2015; DONLAN; CONSTERTON, 2002; LICKER *et al.*, 2017; JAMAL *et al.*, 2018). É importante mencionar que algumas leveduras, como por exemplo espécies pertencentes ao gênero *Candida* podem formar biofilmes, e assim como nas bactérias, apresentam um aumento na resistência a antifúngicos e as defesas naturais do hospedeiro, podendo estar ou não associados a dispositivos (PANNANUSORN; FERNADEZ; ROMLING, 2013; JAMAL *et al.*, 2018).

As infecções causadas pela formação do biofilme microbiano são tão preocupantes que o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos as enquadra como um dos sete desafios mais importantes que devem ser superados para melhorar a segurança dos serviços de saúde, por isso que os avanços nos estudos que enfatizam a formação e funcionamento dos biofilmes são de extrema relevância no gerenciamento dessas infecções (LICKER *et al.*, 2017).

Os biofilmes podem estar envolvidos na formação da cárie dentária e as principais bactérias nesse processo são: *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. Além disso, são responsáveis por uma série de doenças como mastite, otite, pneumonia, osteomielite, fibrose cística, e como já foi mencionado podem contaminar dispositivos e equipamentos médicos implantados que resulta em uma série de complicações (LICKER *et al.*, 2017). Os principais dispositivos onde podem ser encontrados são: lentes de contato, cateteres venosos central, válvulas cardíacas mecânicas, cateteres de diálise peritoneal, próteses articulares, marcapassos, cateteres urinários, prótese vocal (JAMAL *et al.*, 2018), e quando presentes em feridas podem vir a ocasionar um retardo na cicatrização (LICKER *et al.*, 2017).

É de extrema importância a existência de medidas preventivas contra a formação dessas matrizes, como boas condições e práticas de higiene, principalmente, com dispositivos e equipamentos médicos, a fim de se reduzir ao máximo a presença de microrganismos, e como medida preventiva a criação de produtos com superfícies que desfavoreçam a adesão primária impedindo assim seu desenvolvimento (JAMAL *et al.*, 2018).

O grupo de estudos da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Biofilmes de Doenças Infecciosas (ESGB) afirma que são necessários novos métodos para se estudar as infecções causadas por biofilme microbiano e enfatiza que isso só será possível através de uma pesquisa multidisciplinar que envolva microbiologia básica ambiental e microbiologia molecular (LICKER *et al.*, 2017).

2.3.3 Biofilmes na aquicultura

A definição de aquicultura dada pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) é: “a aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas” (FAO, 2020). A composição do microbioma em águas doces e salgadas depende muito de condições físico-químicas, como temperatura, salinidade, condutividade elétrica, composição mineral (CHOLEWINSKA *et al.*, 2022; KROTMAN *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2014).

A existência do biofilme foi proposta inicialmente nos ecossistemas aquáticos, onde observações microscópicas mostraram que a maioria das bactérias nesses ambientes crescem “aglomeradas” nas mais diversas superfícies e interface da água (DONLAN; CONSTERTON, 2002), podendo ainda crescer em toda superfície, até mesmo em contato com água não estéril (WINGENDER; FLEMMING, 2011). Quando as bactérias aquáticas estão “unidas” conseguem se adaptar melhor as condições adversas, como a escassez de nutrientes, além de apresentarem uma maior resistência a estressores, como predação e compostos antimicrobianos (CAI; ARIAS, 2017), os biofilmes oferecem às bactérias aquáticas muitas vantagens em relação a um estilo de vida planctônico. Dessa forma, podem proporcionar um ambiente “seguro” para os patógenos de peixes e camarões, fazendo com que possam persistir nos sistemas de aquicultura e suportar protocolos de desinfecção (CAI; ARIAS, 2017; MILLER *et al.*, 2015). As estimativas sugerem que mais de 90% das bactérias existem dentro de biofilmes (PALUCH *et al.*, 2020).

Na aquicultura, os biofilmes são essenciais para manter os ciclos de nitrogênio e carbono equilibrados no sistema. As bactérias nitrificantes são fundamentais na manutenção da qualidade da água pois vão desintoxicar a amônia produzida pelos animais cultivados. Além disso, biofilmes que crescem em substratos submersos podem melhorar a produção de camarões, sendo considerados uma fonte de proteína de boa qualidade (PANDEY *et al.*, 2014). No entanto, os biofilmes também podem fornecer um ambiente adequado para que os patógenos dos peixes e camarões persistam nos sistemas e resistam a protocolos de desinfecção ou mesmo tratamentos com antibióticos (MILLER *et al.*, 2015; ALMATROUDI *et al.*, 2016).

Muitos patógenos bacterianos ocorrem naturalmente nos ambientes aquáticos e no solo e são capazes de persistir e crescer em biofilmes, podendo prejudicar tanto os animais que vivem ali (cultivados ou não), como também quem consome esses animais ou a água desses ambientes, sendo um potencial risco à saúde pública (WINGENDER; FLEMMING, 2011).

Quando em cultivo, peixes e camarões que apresentam algum tipo de estresse podem ficar mais susceptíveis as bactérias, porém se o animal infectado estiver assintomático (sem sintomas visíveis), sua ingestão pode acarretar danos à saúde humana (KING *et al.*, 2004).

Kunttu e colaboradores em 2012 relataram a presença de *Flavobacterium columnare* em biofilmes presentes nos lagos finlandeses ligados a pisciculturas, sugerindo que o biofilme poderia servir como reservatório para este patógeno que é um dos mais conhecidos por causar doenças em peixes ao redor do mundo em ambientes de cultivo.

Cai e Arias demonstraram através de uma pesquisa que patógenos bacterianos de bagres poderiam se fixar e colonizar superfícies comumente encontradas em instalações de aquicultura, as bactérias *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* e *Edwardsiella tarda* foram capazes de formar biofilmes nos materiais testados (bambu, PVC flexível, forro e rede de nylon), esses resultados mostraram que patógenos bacterianos têm o potencial de colonizar superfícies e podem usar biofilme como reservatório em pisciculturas.

Em um estudo realizado por King e colaboradores (2004), foram encontradas espécies patogênicas de *Bacillus cereus*, *Shigella* e *Vibrio* em um sistema de aquicultura de recirculação. É importante destacar que essas bactérias prejudicam tantos os animais cultivados como também os seres humanos, podendo causar doenças gastrointestinais graves.

Uma das bactérias mais conhecidas na aquicultura são os víbrios e a formação de biofilme dessas bactérias vai depender de genes específicos (biossíntese de flagelos, pili e exopolissacarídeos) e processos regulatórios (por exemplo, *quorum sensing*) (YILDIZ; VISICK, 2009). Os biofilmes de *Vibrio* sp. representam problemas crescentes causando graves ameaças na aquicultura, além disso, os antibióticos não são eficientes no tratamento de infecções bacterianas em formação de biofilme (ARUNKUMAR *et al.*, 2020). A maioria das doenças transmitidas por frutos do mar em todo o mundo são causadas por *Vibrio* spp. tais como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Podendo causar desde infecções leves até doenças mortais, como cólera, gastroenterite, septicemia etc (ARUNKUMAR *et al.*, 2020).

A espécie *Vibrio parahaemolyticus* é um patógeno oportunista que pode causar infecções nos camarões durante períodos de estresse afetando todas as etapas de vida dos animais infectados e quando formam biofilmes, podem ser mais danosos. É importante mencionar que esse microrganismo pode crescer tanto em água salobra como em ambiente marinho, sendo capaz de formar biofilme principalmente em superfícies de quitina, através do uso de flagelos e pili (MIZAN; JAHID; HA, 2015). *V. parahaemolyticus* tem dois tipos de flagelos, polares e laterais, que ajudam na alternância entre as motilidades de natação e enxameação. O flagelo polar promove a formação de biofilme (ARUNKUMAR *et al.*, 2020).

A presença de bactérias potencialmente patogênicas nos biofilmes presentes em sistemas aquícolas aumenta a possibilidade de doenças recorrentes, especialmente se não existir medidas de biossegurança, podendo resultar em perdas econômicas para o produtor (KING *et al.*, 2004). O fato de que organismos resistentes a antibióticos possam crescer em biofilme, causa grande preocupação visto que eles dificilmente serão eliminados do ambiente aquícola, o que vai causar diversos casos de surtos, acarretando prejuízos (KING *et al.*, 2004).

É impossível manter todas as instalações do cultivo livre de patógenos, mas deve-se buscar maneiras de reduzir ao máximo os níveis, principalmente em relação a formação de biofilmes, pois dessa forma, as chances de contaminação dos animais serão reduzidas, favorecendo a saúde dos animais cultivados e consequentemente a saúde pública, além de favorecer economicamente o produtor (KING *et al.*, 2004). Assim, procedimentos que visem controlar a formação e composição bacteriana dos biofilmes são importantes para o desenvolvimento da aquicultura (WIETZ; HALL; HOJ, 2009).

2.3.3.1 As bactérias no ambiente aquícola

O cultivo intensivo de organismos marinhos e dulcícolas tem seus desafios devido em grande parte à presença de uma série de patógenos bacterianos que podem matar ou danificar os produtos da aquicultura, levando a um ônus econômico para a indústria e à escassez de produtos no mercado (RICHARDS, 2014). Essas perdas podem ocorrer em incubadoras e instalações de criação de larvas ou durante qualquer parte do processo de engorda. A introdução de patógenos em peixes e mariscos pode ser através da ração, da água, superfícies contaminadas, aerossóis ou por transmissão de um animal para outro (RICHARDS, 2014).

Muitos patógenos na aquicultura são oportunistas e podem permanecer indetectáveis até que algum estresse os torne suscetíveis à infecção. Os estresses geralmente incluem temperatura, pH ou salinidade impróprios ou mudanças rápidas nesses parâmetros, má oxigenação, acúmulo de produtos químicos tóxicos, como amônia, superlotação, excesso ou falta de alimentação, manuseio excessivo e má qualidade geral da água. As reduções nas perdas foram alcançadas com mais frequência com o tratamento com antibióticos, no entanto, o uso de fármacos a longo prazo levou a resistência das cepas bacterianas aumentando a ineficácia de tais tratamentos (CABELLO, 2006; RICHARDS, 2014).

As práticas aquícolas podem envolver o uso de antibióticos para tratamento e profilaxia, apesar dessa prática ser ilegal em alguns lugares como no Brasil. Como consequência do uso de antibióticos na aquicultura, a resistência é induzida nas bactérias

circundantes na coluna d'água, sedimentos e cepas associadas aos peixes. Através da transferência horizontal de genes, as bactérias podem difundir os genes de resistência a antibióticos e os genes de resistência móveis, espalhando ainda mais os determinantes genéticos. Uma vez desencadeada, a resistência aos antibióticos se espalha facilmente entre as comunidades microbianas aquáticas e, a partir daí, pode atingir bactérias patogênicas ao homem, tornando inútil o uso de antibióticos para a saúde humana (PEPI; FOCARDI, 2021). Os antibióticos podem agir contra as bactérias através de diferentes mecanismos, incluindo a inibição da síntese da parede celular, alteração das membranas celulares, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de ácidos nucleicos, antagonismo competitivo e atividade antimetabólito (PEPI; FOCARDI, 2021). Além da resistência a antibióticos as bactérias presentes no ambiente de cultivo podem ainda formar biofilmes, que como mencionando anteriormente formam uma proteção deixando-as mais resistentes aos tratamentos (ARUNKUMAR *et al.*, 2020). O biofilme atua como um escudo contra a entrada de antibióticos ou agentes antimicrobianos na superfície celular, portanto, desempenha um papel fundamental na resistência aos antibióticos, normalmente, os agentes terapêuticos ficam retidos no biofilme bacteriano, o que reduz a penetração (ARUNKUMAR *et al.*, 2020). A disseminação da resistência a antibióticos de ambientes de aquicultura para ambientes naturais, tem gerado preocupação (SHAW *et al.*, 2014).

A microbiota associada principalmente aos estágios larvais do camarão pode afetar sua saúde e desenvolvimento, e algumas bactérias podem causar mortalidades graves. Em virtude da proibição do uso da maioria dos antibióticos na aquicultura, devido ao surgimento de patógenos resistentes e à detecção de resíduos de antibióticos nos tecidos de camarão por vários países importadores, foi pensada a necessidade de alternativas para substituí-los nos sistemas de incubação (KARUNASAGAR *et al.*, 2007).

De fato, o uso frequente de antibióticos, que são tradicionalmente a linha de defesa mais importante contra doenças bacterianas, tem levantado problemas relacionados ao desenvolvimento e disseminação de resistência. Como resultado, estamos atualmente em uma corrida para desenvolver novas terapias que devem nos permitir continuar controlando as doenças bacterianas no futuro (RICHARDS *et al.*, 2014).

Nesse contexto a descoberta de novas substâncias com potencial antimicrobiano e antibiofilme como por exemplo as lectinas é de extrema importância tendo em vista o cenário atual da aquicultura que cada vez mais sofre com a incidência de microrganismos patogênicos.

2. METODOLOGIA

2.1 Lectinas utilizadas

As lectinas de organismos marinhos foram obtidas no Laboratório de Biotecnologia Marinha (BIOMAR), localizado no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, sendo em seguida analisadas com relação a contaminação por microrganismos, onde uma pequena quantidade de cada lectina (cerca de 1 mg) foi colocada em uma placa contendo ágar TSA. Após 24 e 48 horas o resultado foi observado, e as que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas a um tratamento de luz ultravioleta por 15 minutos, a fim de eliminar a contaminação. Em seguida foram novamente colocadas em uma placa de ágar TSA e o resultado observado após 24 e 48 horas. As lectinas de organismos marinhos utilizadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 5.

Tabela 3 - Lectinas utilizadas nos experimentos

LECTINA	ORIGEM	REFERÊNCIA
AML	Alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 1999
BSL	Alga marinha vermelha <i>Bryothamnion seaforthii</i>	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
BTL	Alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i>	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
SFL	Alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	BENEVIDES; LEITE; FREITAS, 1996
AFL	Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2019
ALL	Esponja marinha <i>Aplysina lactuca</i>	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autora, 2022.

2.2 Seleção das cepas

As cepas bacterianas utilizadas no presente trabalho (TABELA 4) são de origem ambiental com exceção das estirpes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* que foram adquiridas do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rio de Janeiro (*American Type Culture Collection* – ATCC), com relação as cepas de fungos utilizadas (TABELA 5) a espécie *Candida albicans* foi adquirida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INQS (FIOCRUZ) e o *Aspergillus niger*. Todas as cepas fazem parte da coleção de culturas microbianas Profa. Regine Vieira (CMRV). A coleção de culturas microbianas pertence ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) que está localizado no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Tabela 4 - Cepas bacterianas indicadoras de atividade.

BACTÉRIA	ORIGEM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Isolado clínico
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Isolado clínico
<i>Streptococcus mutans</i> INCQS 00446	Águas de galeria pluvial
<i>Samonella</i> ser. Brandeirup Lamap 18	Sedimento do rio Jaguaribe
<i>Pseudomonas</i> 246B	Água do estuário Camurupim-PI
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 53	Fazenda de carcinicultura-PI
<i>Vibrio alginolyticus</i> 39	Fazenda de carcinicultura-PI

Fonte: Autora, 2022.

Tabela 5 - Cepas fúngicas indicadoras de atividade.

FUNGO	ORIGEM
<i>Candida albicans</i> INCQS 40178	Fonte: colo do útero humano
<i>Aspergillus niger</i>	Fonte: bioaerossol

Fonte: Autora, 2022.

3.1.2 Purificação das cepas bacterianas

Todas as cepas bacterianas mencionadas na tabela 4 foram isoladas novamente para garantir que estavam puras. Inicialmente as cepas bacterianas foram crescidas em caldo nutritivo por 48 horas a 35°C, em seguida foi realizado o plaqueamento por esgotamento onde cada bactéria cresceu em seu meio seletivo. Os v́brios cresceram em ágar TCBS (Ágar de Tioissulfato, Citrato, B́ilis e Sacarose), *Pseudomonas* em ágar Cetrimide, *Salmonella* em ágar Verde Brilhante, já *E. coli*, *S. aureus* e *Streptococcus mutans* em Ágar Triptona de Soja (TSA), todas as placas foram incubadas em estufa a 35°C. Após 24 horas de crescimento foi selecionada de cada placa uma colônia que foi repicada para um tubo contendo ágar TSA. Após 24 horas foi realizado a coloração de Gram e as lâminas analisadas em um microscópio óptico (*OLYMPUS*) com aumento de 100x. Nessa etapa foi possível realizar a análise morfotintorial das culturas bacterianas confirmando que estavam puras e prontas para os testes.

2.3 Produção de biofilme

Para analisar se as cepas bacterianas selecionadas eram capazes de produzir biofilme, foram utilizados os seguintes testes:

2.3.1 Vermelho congo

Inicialmente foi preparado o Ágar Vermelho Congo (AVC), com 0,8 g do corante vermelho congo (SIGMA), para 1 L de Ágar Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion Agar-Ágar BHI Difco*), com adição de 36 g de sacarose, com adição de 1% de NaCl para testar cepas de *Vibrio*. As cepas foram renovadas em ágar TSA/24 horas antes do teste, após esse período foram realizadas estrias com as cepas na superfície das placas contendo AVC, sendo incubadas inicialmente a 35°C por 24 h e por mais 48 h em temperatura ambiente. As cepas bacterianas com habilidade de produzir biofilme exibem a coloração preta quando crescem no meio analisado, já as cepas não produtoras permanecem sem pigmentação. Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Freeman, Falkiner e Keane (1989), com modificações.

2.3.2 Teste de aderência em vidro

As cepas bacterianas foram crescidas em ágar TSA por 24 h a 35°C, e para testar as cepas de *Vibrio* foi adicionado 1% de NaCl. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) e incubadas por 48 h a 35°C. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi descartado, e a superfície interna lavada três vezes com água destilada. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de cristal violeta 1% nos tubos de ensaio previamente secos, permanecendo por 1 minuto. Em seguida o conteúdo removido com água destilada, e os tubos sendo invertidos durante 30 minutos para secar. O teste foi realizado em triplicata e os tubos de ensaio que apresentaram biofilme nas paredes corado com cristal violeta foram considerados como resultado positivo. Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia de Christensen *et al.* (1985) com modificações.

2.3.3 Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC)

As cepas bacterianas foram repicadas em ágar TSA por 24 h a 35°C, e aos meios de cultura para crescimento de *Vibrio* foram adicionados 1% de NaCl. Em seguida foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo TSB (Difco) e incubadas por 48h a 35°C. Após esse período, a suspensão bacteriana que cresceu nos tubos contendo TSB foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços com fundo “U”, onde em cada poço foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana sendo o teste realizado em triplicata a 35°C por 48 h. Posteriormente, os inóculos foram removidos e os poços lavados com 200 µL de água destilada estéril por três vezes e secos em estufa a 60°C por 1 h.

Após a secagem dos poços, foram adicionados 200 µL de uma solução de cristal violeta 1% por 1 minuto, em seguida lavagens sucessivas foram realizadas com água destilada e a placa seca em temperatura ambiente.

Como resultado positivo para produção de biofilme foram considerado os poços que apresentaram a coloração roxa. O teste foi realizado como descrito por Christensen *et al.* (1985) com modificações.

2.4 Mínima Concentração Inibitória – MIC

O teste de MIC foi realizado com objetivo de analisar qual a mínima concentração de lectina (TABELA 3) capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas (TABELA 4).

Inicialmente, as bactérias foram crescidas em tubos contendo ágar TSA por 24 h a 35°C. Posteriormente a turbidez bacteriana foi ajustada de acordo com a escala de turbidez 0,5 de McFarland em um espectrofotômetro, onde se utilizou salina com 1% de NaCl para as cepas de *Vibrio* e 0,85% de NaCl para os ajustes dos inóculos bacterianos.

Todo o ensaio foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços, em cada poço foi adicionado caldo *Muller-Hinton* duplo (Difco, Leeuwarden, NL), acrescido com 50 µL de inóculo bacteriano e 50 µL de proteína para a concentração final de 100, 250, 500 µg.mL⁻¹. O teste foi realizado em triplicata e como controle positivo foi usado o antibiótico canamicina, na concentração final de 30 µg.mL⁻¹, enquanto o inóculo bacteriano com o meio de cultura foi usado como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 30°C por 24h, e para auxiliar a visualização do crescimento bacteriano, foi utilizado o Cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5% (Sigma-Aldrich, MO, EUA), colocado em cada poço sendo a microplaca novamente incubada a 30° C por 3h. A mudança de cor para vermelho é indicativo de crescimento bacteriano e, portanto, atividade bactericida negativa. O experimento foi realizado pelo método de diluição de meio de acordo método de microdiluição estabelecido pelo documento técnico da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

2.5 Aglutinação de células bacterianas

A aglutinação de bactérias é outra atividade antibacteriana que pode ser desempenhada por lectinas de organismos marinhos. Foram utilizadas as cepas bacterianas listadas na Tabela 1, crescidas em meio Luria Bertani (LB) a 37°C por 24 h, e para as cepas de *Vibrio*, o caldo foi acrescido de 1% de NaCl. Em seguida, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 2000 x g por 10 minutos, sendo lavadas 3 vezes com tampão fosfato de sódio com NaCl (PBS) e suspensas em PBS contendo formaldeído a 4% durante 16 h a 4°C. Após esse período foram lavadas novamente por mais 3 vezes com tampão Tris com NaCl e cálcio (TBS).

A contagem bacteriana foi realizada pelo método de diluição em série e a turbidez ajustada de acordo com a escala de McFarland 0.5 em espectrofotômetro (*THERMO*) a 625 nm. A aglutinação foi testada adicionando-se 50 µL da lectina na concentração de 100 e 1000 µg.mL⁻¹ a um volume igual da suspensão bacteriana. Os resultados foram observados em um microscópio óptico após 1 h de incubação. O teste foi conduzido de acordo com IMAMICHI; YOKOYAMA, 2010 com modificações.

2.6 Atividade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica foi utilizada a metodologia de difusão em disco, de acordo com o CLSI (2010). Discos brancos de celulose (Laborclin) estéreis foram embebidos com as lectinas de organismos marinhos nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como controle negativo (CN) foram utilizados discos embebidos em água destilada estéril e como controle positivo (CP) discos embebidos no antifúngico nistatina na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As lectinas foram testadas frente ao fungo filamentoso *Aspergillus niger* e à levedura *Candida albicans* INCQS.

Inicialmente as culturas fúngicas foram repicadas para placas de Petri descartáveis contendo Ágar Dextrose Batata (ADB) com incubação de 1-3 dias para a *C. albicans* e de 3-5 dias para o *A. niger* a 28°C. Após esse período, os discos com as diferentes concentrações da lectina (100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o CN e o CP (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram dispostos em novas placas contendo ADB.

Nas placas onde houve crescimento de *A. niger*, foram retirados *slots* com o auxílio de uma ponteira para serem depositados na região central da placa que já estava com os discos dispostos (lectina 100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, CP e CN). Já nos testes com a levedura *C. albicans*, a cultura foi previamente ajustada na escala McFarland 0.5 e, com um *swab* estéril, foi feita inoculação para crescimento confluyente na superfície das placas de ADB, em seguida, os discos (lectina 100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, CP e CN) foram dispostos nas placas, incubadas de 2-7 dias a 28°C, sendo o crescimento acompanhado diariamente, pois *C. albicans* cresce de forma mais rápida. O resultado foi considerado positivo quando apresentou o surgimento de zona de inibição de crescimento, em qualquer grau, ao redor dos discos de papel.

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

O ensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia* sp. foi realizado conforme descrito por Carneiro *et al.* (2012). Os cistos adquiridos comercialmente foram incubados com água do mar (1 g de cistos/L de água do mar) sob iluminação e aeração constante a 28°C. Após 48 horas, a aeração foi interrompida e a iluminação foi dirigida para o fundo do recipiente, que devido ao fototropismo positivo os náuplios se dirigiram para o fundo, ficando na superfície apenas os cistos que não eclodiram. Os náuplios foram recolhidos e usados para o ensaio biológico.

As lectinas foram dissolvidas em água do mar a uma concentração inicial de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (solução mãe). O ensaio foi realizado em placas de Linbro™ de 24 poços onde foram

colocados 10 náuplios em cada poço e o volume final foi ajustado para 2 mL. As lectinas foram adicionadas aos poços nas concentrações finais de 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O experimento foi realizado em triplicata, e como controle negativo foi utilizado 2 mL água do mar com 10 náuplios. Após 24 horas o número de náuplios mortos em cada poço foi contado e foi calculado o percentual de morte para cada concentração. O valor de LC50 (concentração capaz de matar 50% dos indivíduos) foi determinado usando uma análise de Probit, conforme descrito por Finney (1972).

2.8 Atividade antibiofilme

As lectinas da tabela 3 foram testadas com as cepas da tabela 4. Foi utilizada a metodologia de Preetahm *et al.* (2020) com modificações. O ensaio foi realizado em placas de vidro denominadas Kline de 12 poços, em cada poço havia caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 1% de inóculo das diferentes suspensões bacterianas (10^7 UFC/mL), para as cepas de *Vibrio* foi adicionado 1% de NaCl no caldo BHI. As concentrações das lectinas (50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram introduzidas nos poços e incubadas a 37°C por 48 h.

Para examinar a atividade do biofilme, os meios foram descartados e as células fracamente aderentes foram removidas por lavagem completa com água deionizada e deixadas secar ao ar antes da coloração. O biofilme foi corado com 1 mL de corante cristal violeta a 0,4% (p/v) por 10 min. A inibição do biofilme foi observada por microscopia de luz, com o aumento de 40x.

3. RESULTADOS

3.1 Lectinas utilizadas

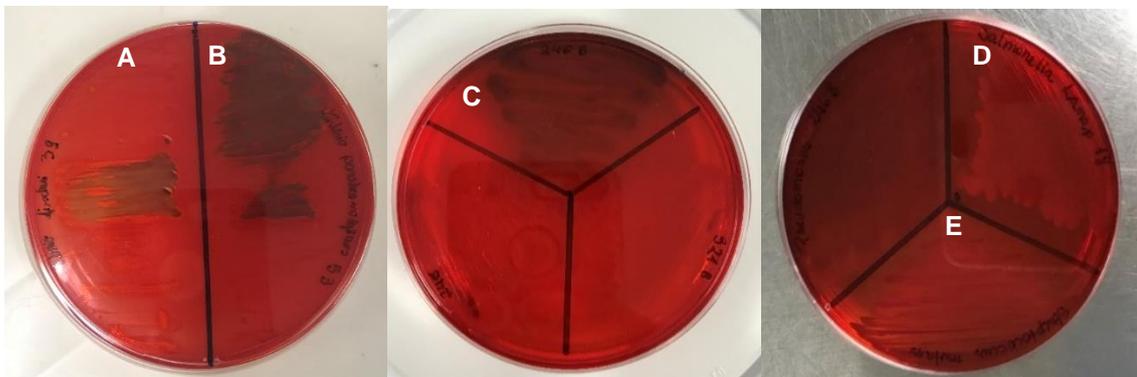
Nos testes de verificação da esterilidade, algumas lectinas não se mostraram adequadas para prosseguir nos testes devido a contaminação microbiana, mesmo após a exposição a radiação UV. Desta forma, apresentamos na tabela 5 as lectinas que viáveis para a pesquisa.

3.2 Produção de biofilme

3.2.1 Vermelho congo - AVC

No crescimento sobre o meio foi possível selecionar as cepas que apresentaram a melhor produção de exopolissacarídeo indicado pela zona de crescimento com coloração enegrecida no ágar, como podemos observar na figura 4.

Figura 4 - Bactérias positivas para o teste de vermelho congo.



Fonte: Autora, 2022. A - *Vibrio alginolyticus* 39, B - *Vibrio parahaemolyticus* 53, C - *Pseudomonas* 246B, D - *Salmonella* LAMAP 18, E - *Streptococcus mutans*.

3.2.2 Teste de aderência em vidro e em microplacas de poliestireno (TMC)

Após o resultado positivo no teste do vermelho congo, as cepas foram submetidas ao teste de aderência em vidro e em microplacas com os resultados expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado do teste de aderência em vidro e em microplacas de poliestireno.

CEPAS	ADERÊNCIA AO VIDRO	ADERÊNCIA EM MICROPLACA
<i>Pseudomonas</i> 246B	+++	+++
<i>Salmonella</i> ser. Brandeirup LAMAP 18	++	+
<i>Streptococcus mutans</i> INCQS 00446	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> 39	++	++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 53	+++	++

Fonte: Autora, 2022. Forte (+++), Moderada (++), Fraca (+).

Como podemos observar todas as cepas foram capazes de produzir biofilme principalmente *Pseudomonas* 246B e *Vibrio parahaemolyticus* 53 que produziram a maior quantidade de exopolissacarídeos em relação as outras cepas, de modo geral os testes foram capazes de confirmar que as cepas testadas são produtoras de biofilme e, portanto, poderão ser utilizadas na atividade antibiofilme. Quando comparamos o resultado dos dois testes percebemos que os resultados foram parecidos, com exceção das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* 53 e *Salmonella* ser. Brandeirup LAMAP 18 que tiveram uma maior produção de biofilme no teste de aderência em vidro.

3.3 Mínima concentração inibitória - MIC

As lectinas de algas marinhas usadas no presente trabalho: AML, BSL, BTL e SFL não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas (TABELA 4), mesmo na concentração de 500 µg.mL⁻¹ que foi a maior usada no teste.

As lectinas de invertebrados marinhos ALL e AFL também foram testadas em relação a capacidade de inibir o crescimento das bactérias da tabela 4. Como resultado foi observado que ALL e AFL foram capazes de inibir o crescimento das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* nas concentrações de 250 e 500 µg.mL⁻¹. Na tabela abaixo está demonstrado os resultados obtidos no teste de MIC, podemos observar que apenas as lectinas de invertebrados apresentaram atividade antibacteriana.

Tabela 7 – Resultados da atividade antibacteriana das lectinas em concentrações de 250/500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

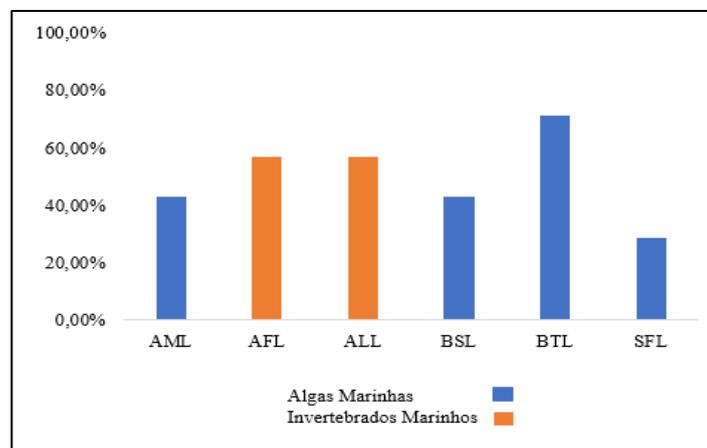
	AML	BTL	BSL	SFL	ALL	AFL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>S. mutans</i> INCQS	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Samonella</i> ser. Brandeirup Lamap 18	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Pseudomonas</i> 246B	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>V. parahaemolyticus</i> 53	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>V. alginolyticus</i> 39	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Fonte: Autora, 2023. Em destaque as lectinas que apresentaram resultados positivos.

4.4 Aglutinação de células bacterianas

De acordo com os resultados da aglutinação de bactérias pelas lectinas de organismos marinhos foi possível afirmar que tanto as lectinas de algas, como as de invertebrados marinhos foram capazes de aglutinar algumas cepas testadas, no gráfico 1 podemos observar a porcentagem de aglutinação das lectinas com relação ao total de cepas bacterianas usadas no teste e na tabela 8 temos um resumo das cepas que foram aglutinadas por cada lectina.

Gráfico 1 – Porcentagem de cepas bacterianas aglutinadas pelas lectinas.



Fonte: Autora, 2023.

Tabela 8 - Resultado do teste de aglutinação de células bacterianas por lectinas de organismos marinhos em concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

	AML	BTL	BSL	SFL	ALL	AFL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-
<i>S. mutans</i> INCQS	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
<i>Samonella</i> ser. Brandeirup Lamap 18	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+
<i>Pseudomonas</i> 246B	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>V. parahaemolyticus</i> 53	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>V. alginolyticus</i> 39	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+

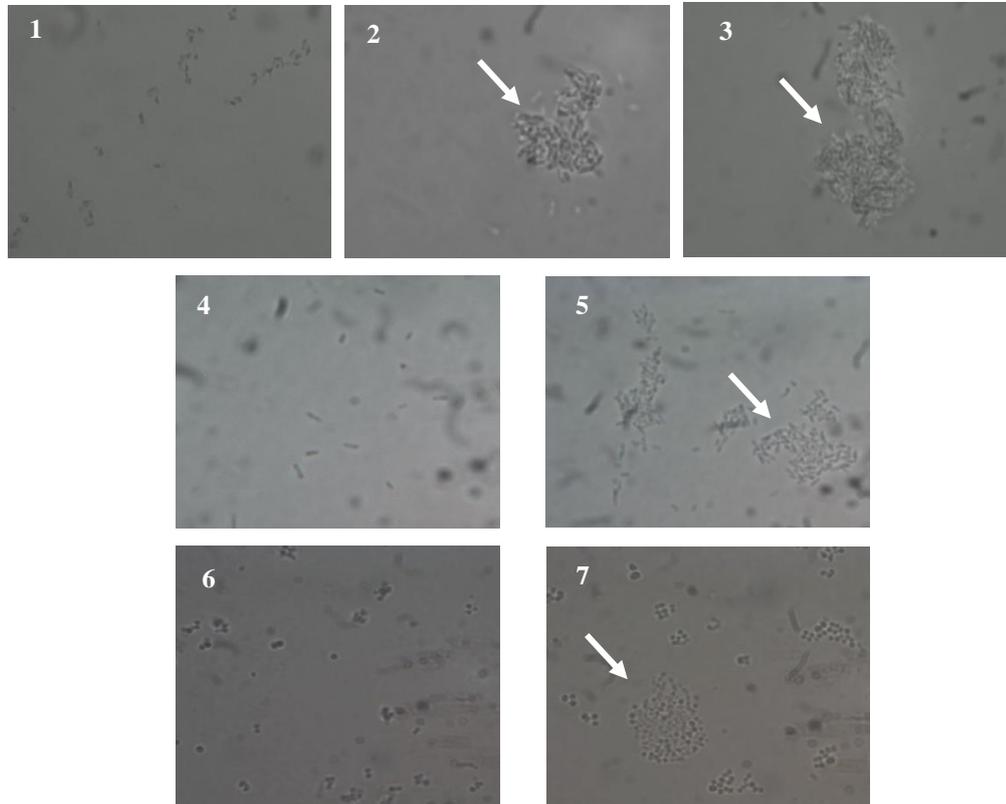
Fonte: Autora, 2023.

As lectinas de algas foi observado que AML conseguiu aglutinar *E. coli* nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *Salmonella* multirresistente na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Streptococcus mutans* na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 3a). Já a lectina SFL foi capaz de aglutinar *E. coli* na maior concentração e aglutinou também *S. aureus* mas de forma mais fraca (FIGURA 5b). A lectina BSL aglutinou *E. coli* e *S. aureus* mas de forma bem fraca e aglutinou também *S. mutans* de forma um pouco mais forte de acordo com as imagens em relação as espécies de *E. coli* e *S. aureus* (FIGURA 5c) e BTL aglutinou fracamente *E. coli* e *S. mutans* mas foi capaz de aglutinar de forma mais forte as bactérias *S. aureus* e *Salmonella* multirresistente (FIGURA 3d).

Na aglutinação das lectinas de invertebrados marinhos foi verificado que a AFL foi capaz de aglutinar as cepas de *E. coli*, *Vibrio alginolyticus* e *Salmonella* multirresistente ambos na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 4a). Já a lectina ALL foi capaz de aglutinar as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* multirresistente (FIGURA 6b).

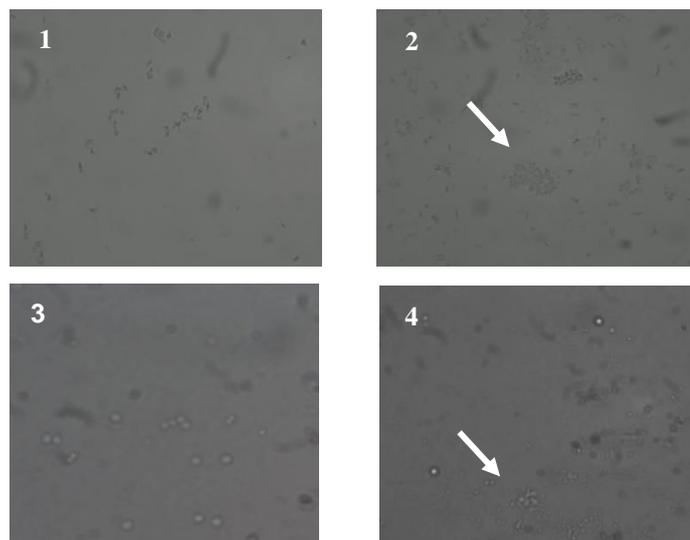
Figura 5 – Imagens da aglutinação de células bacterianas monocultura por ação de lectinas de algas marinhas.

a) AML



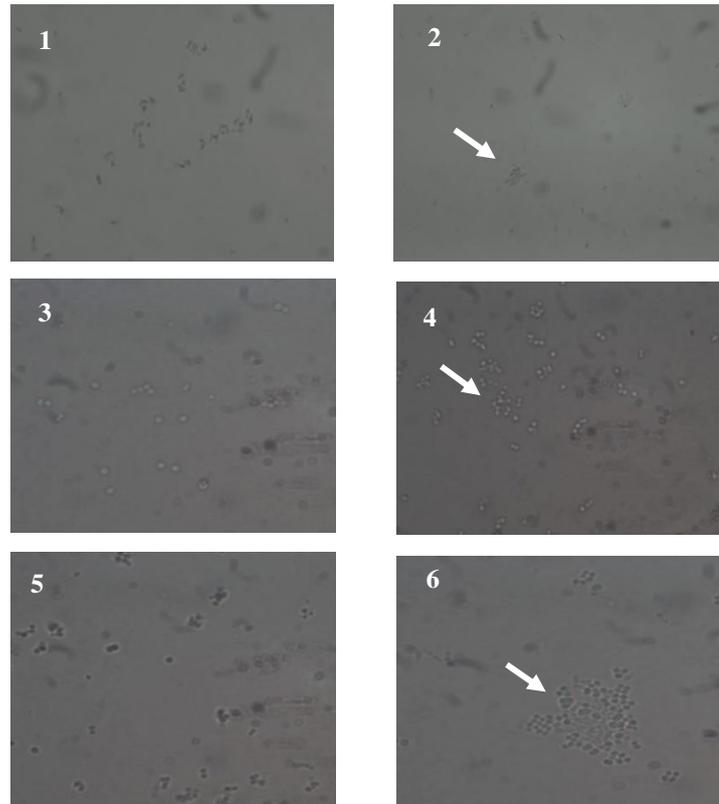
Fonte: Autor, 2022. 1- *E.coli* controle (solução de NaCl 0,85%), 2- *E.coli* com AML 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- *E.coli* com AML 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4- *Salmonella* controle (solução de NaCl 0,85%), 5- *Salmonella* com AML 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 6- *S. mutans* controle (solução de NaCl 0,85%), 7- *S. mutans* com AML 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

b) SFL



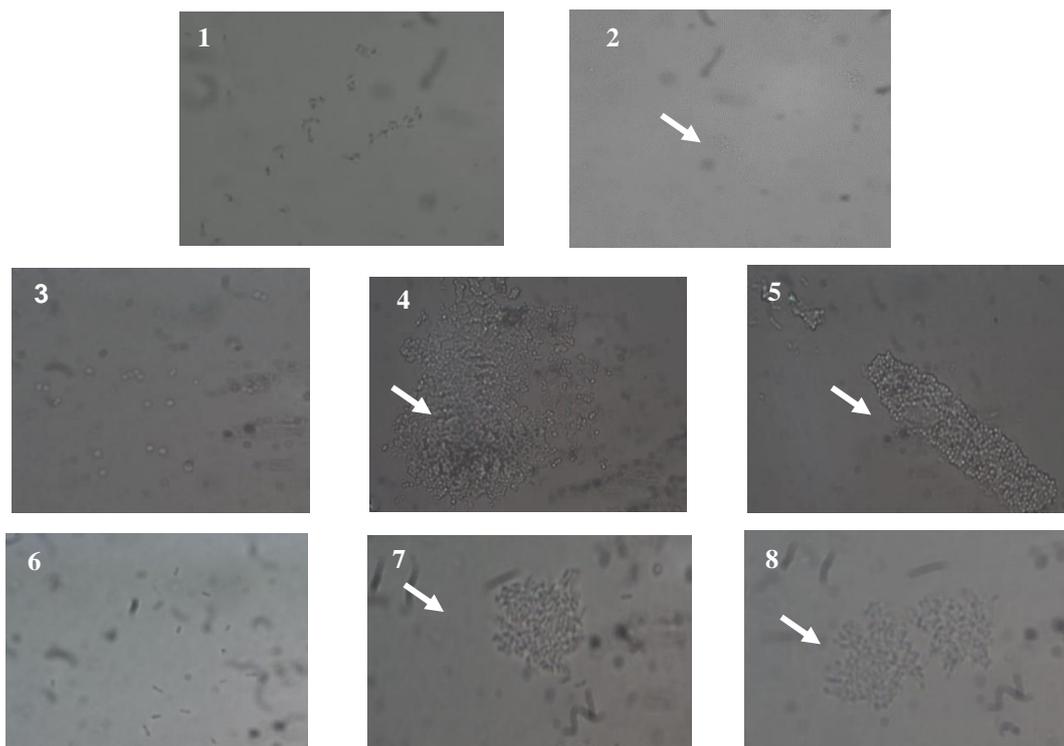
Fonte: Autora, 2022. 1- Controle *E.coli* (solução de NaCl 0,85%), 2- *E.coli* com SFL1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- Controle *S.aureus* (solução de NaCl 0,85%), 4- *S.aureus* com SFL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

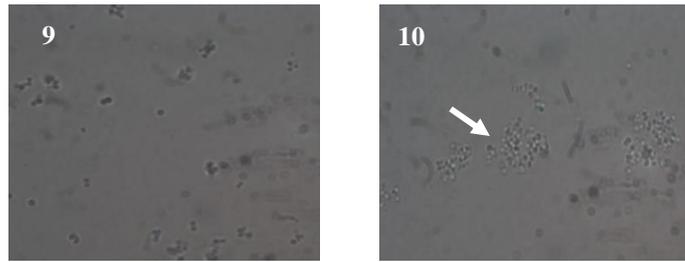
c) BSL



Fonte: Autora, 2022. 1- Controle *E.coli* (solução de NaCl 0,85%), 2- *E.coli* com BSL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- Controle *S.aureus* (solução de NaCl 0,85%), 4- *S.aureus* com BSL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- *S. mutans* controle (solução de NaCl 0,85%), 6- *S. mutans* com BSL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

d) BTL

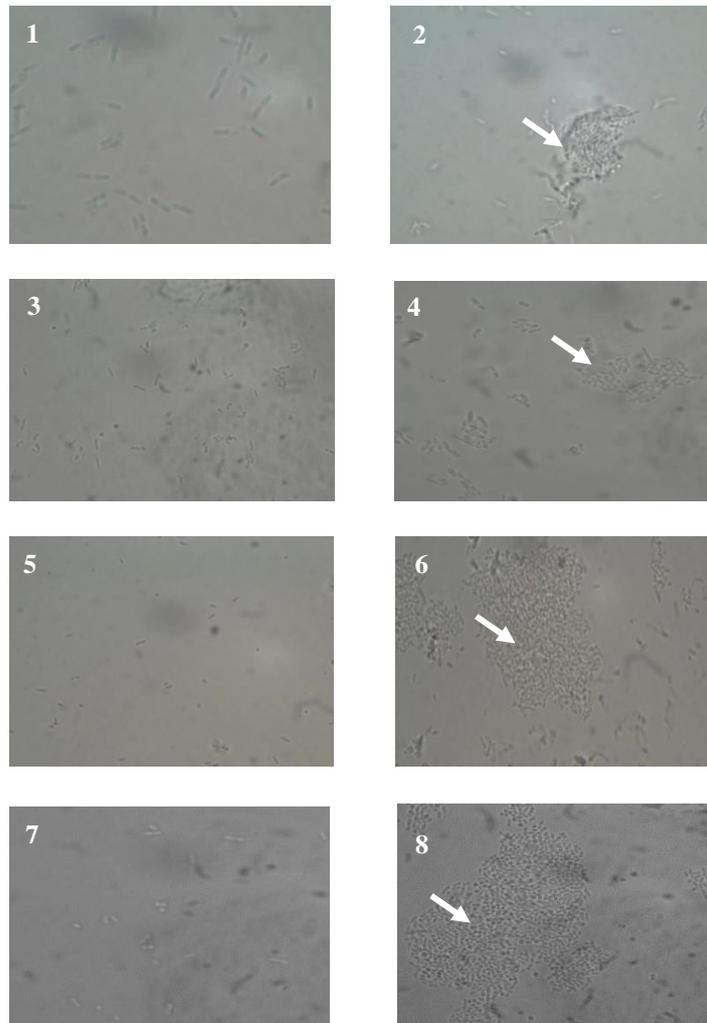




Fonte: Autora, 2022. 1- *E. coli* controle (solução de NaCl 0,85%), 2- *E. coli* com BTL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- *S. aureus* controle (solução de NaCl 0,85%), 4- *S. aureus* com BTL 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- *S. aureus* com BTL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 6- Controle *Salmonella* (solução de NaCl 0,85%), 7- *Salmonella* com BTL 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 8- *Salmonella* com BTL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 9- *Streptococcus mutans* controle (solução de NaCl 0,85%), 10- *Streptococcus mutans* com BSL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

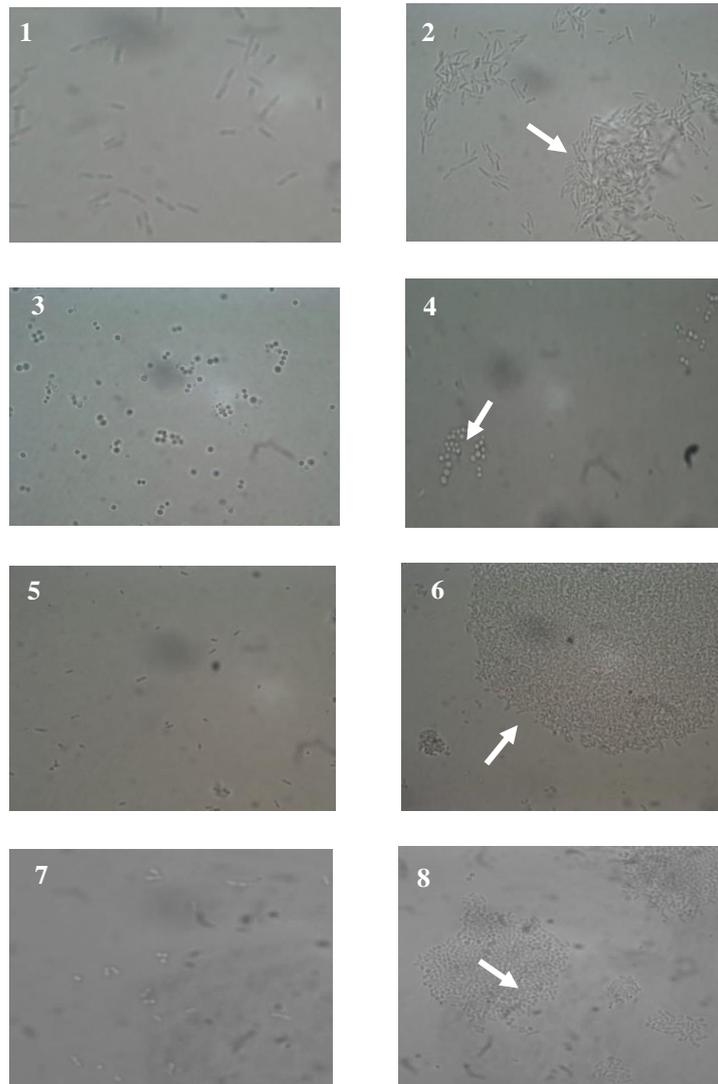
Figura 6 - Imagens da aglutinação de células bacterianas monocultura por ação de lectinas de esponjas marinhas.

a) AFL



Fonte: Autora, 2022. 1- *E. coli* controle (solução de NaCl 0,85%), 2- *E. coli* com AFL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- *V. alginolyticus* controle (solução de NaCl 0,85%), 4- *V. alginolyticus* com AFL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- *Salmonella* controle (solução de NaCl 0,85%), 6- *Salmonella* com AFL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 7- *S. mutans* controle (solução de NaCl 0,85%), 8- *S. mutans* com AFL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

b) ALL



Fonte: Autora, 2022. 1- *E. coli* controle (solução de NaCl 0,85%), 2- *E. coli* com ALL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- *S.aureus* controle (solução de NaCl 0,85%), 4- *S.aureus* com ALL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- *Salmonella* controle (solução de NaCl 0,85%), 6- *Salmonella* com ALL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 7- *S. mutans* controle (solução de NaCl 0,85%), 8- *S. mutans* com ALL 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.5 Atividade antifúngica

As lectinas de organismos marinhos não foram capazes de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans* INCQS (FIGURA 7a). Entretanto, algumas lectinas inibiram o crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, como observado com AML, SFL e AFL na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, BSL e ALL nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 7b). Na tabela 9 temos um resumo dos resultados da atividade antifúngica.

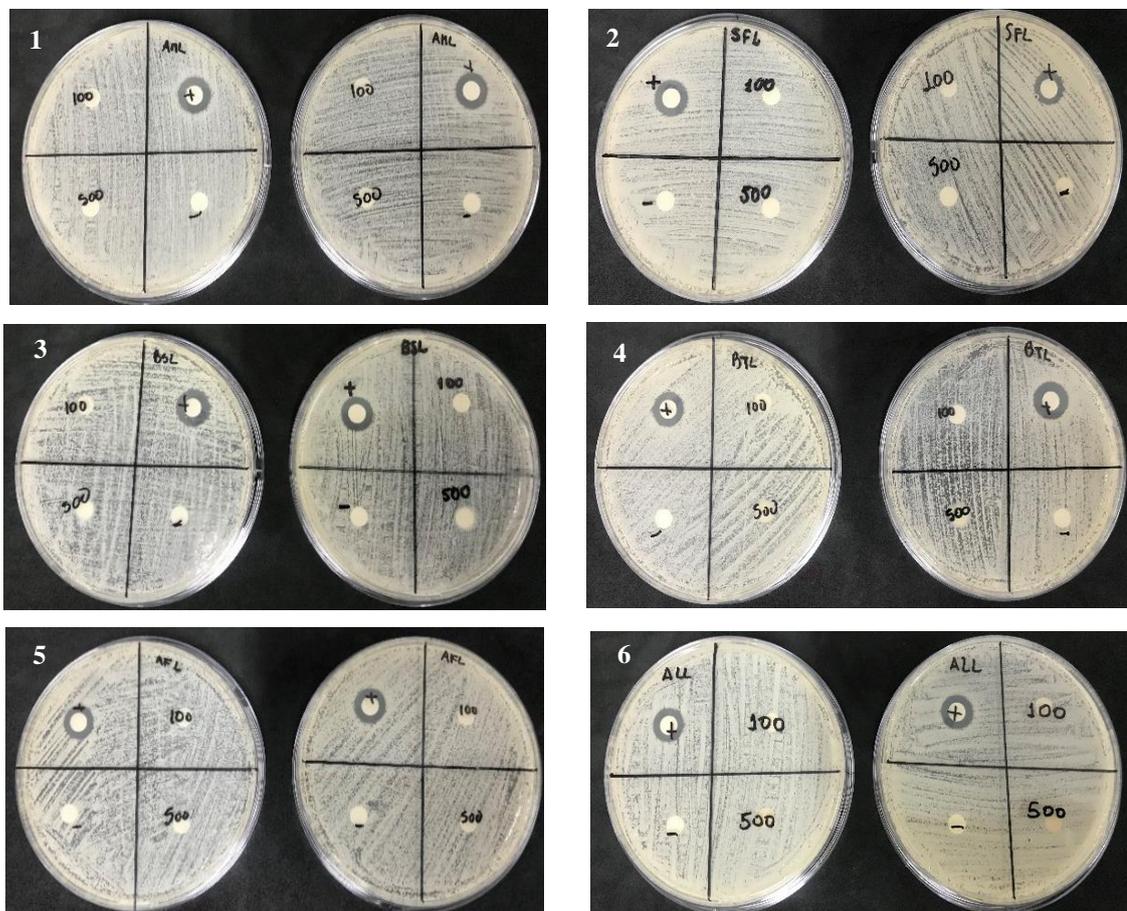
Tabela 9 – Resultados da atividade antifúngica das lectinas extraídas de organismos marinhos em concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

	AML	BTL	BSL	SFL	ALL	AFL
<i>Candida albicans</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Aspergillus niger</i>	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	+/-

Fonte: Autora, 2023.

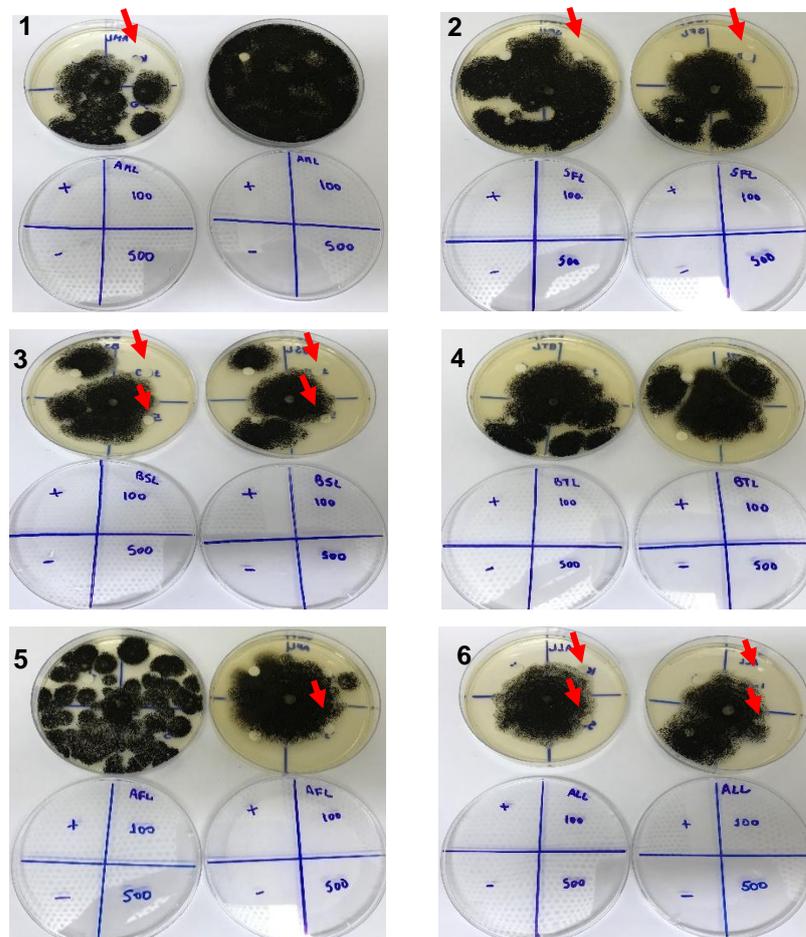
Figura 7 – Resultados dos testes de atividade antifúngica das lectinas de organismos marinhos.

a) *Candida albicans*



Fonte: Autora, 2022. 1- AML na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2- SFL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- BSL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4- BTL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- AFL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6- ALL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

OBS: Todos resultados estão em duplicada incluindo o controle negativo (Água destilada estéril) e o controle positivo (Nistatina na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

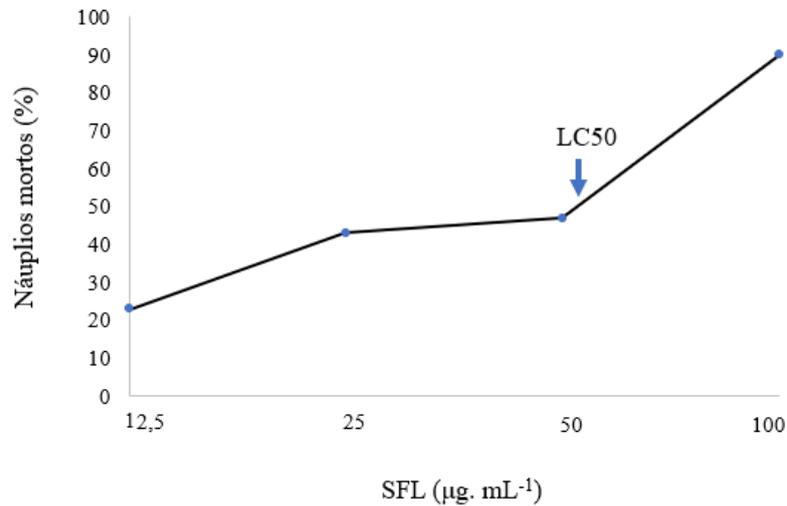
b) *Aspergillus niger*

Fonte: Autora, 2022. 1- AML na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2- SFL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3- BSL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4- BTL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5- AFL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6- ALL na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

OBS: Todos resultados estão em duplicada incluindo o controle negativo (Água destilada estéril) e o controle positivo (Nistatina na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.6 Letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

Os testes de letalidade contra náuplios de artemia foram realizados para as todas as lectinas. A única que apresentou letalidade contra náuplios de *Artemia* foi SFL, como observado no gráfico 2, onde o LC50 da SFL foi de 55,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. A letalidade aumentou conforme o aumento da concentração da proteína, sugerindo que a toxicidade da SFL contra náuplios de artemia é dose dependente.

Gráfico 2 - Ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

Fonte: Autora, 2023.

4.7 Atividade antibiofilme

As lectinas testadas mostraram um potencial antibiofilme frente as cepas bacterianas. Na figura 8a podemos observar os resultados de AML que foi capaz de reduzir o biofilme da *Salmonella* multirresistente, *S. mutans* e *V. alginolitycus* nas concentrações 50 e 100 µg.mL⁻¹ e *E. coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas* e *V. parahaemolyticus* na concentração 100 µg.mL⁻¹. AML foi capaz de reduzir o biofilme de todas as cepas testadas algumas mais do que outras como veremos adiante nas imagens principalmente na maior concentração usada.

A lectina SFL inibiu o biofilme das bactérias *Salmonella* multirresistente nas concentrações 50 e 100 µg.mL⁻¹, e *S. aureus*, *S. mutans*, *Pseudomonas* 246B e *V. alginolitycus* na concentração de 100 µg.mL⁻¹ (FIGURA 8b).

BSL apresentou atividade antibiofilme contra *Salmonella* nas concentrações 50 e 100 µg.mL⁻¹ e para *E. coli* apenas na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Entretanto, o resultado não foi tão expressivo quando comparado com as outras bactérias, *S. aureus* e *S. mutans* foram inibidas na maior concentração. O melhor desempenho foi observado contra o *V. alginolitycus* em que BSL inibiu de forma proeminente o biofilme nas duas concentrações testadas (figura 8c).

BTL inibiu a formação do biofilme apenas das bactérias *Salmonella* na concentração de 100 µg.mL⁻¹, enquanto para *S. aureus* e *S. mutans*, nas concentrações 50 e 100 µg.mL⁻¹ (FIGURA 8d).

ALL, a única lectina de invertebrado marinho utilizada no teste, foi capaz de inibir a formação do biofilme das bactérias: *Salmonella* e *Vibrio alginolyticus* nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli* e *Vibrio parahaemolyticus* na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na tabela 10 temos um resumo dos resultados da atividade antibiofilmes desempenhada pelas lectinas de organismos marinhos.

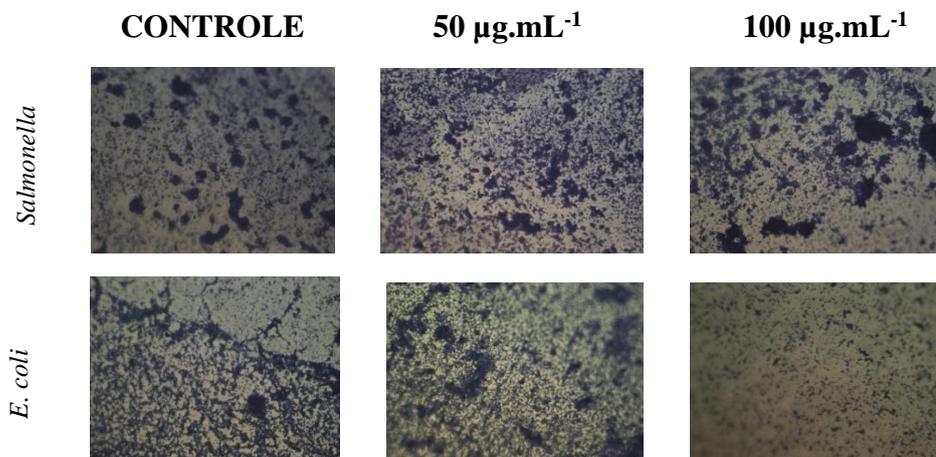
Tabela 10 – Resultado do teste de atividade antibiofilme bacteriano de lectinas extraídas de organismos marinhos nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

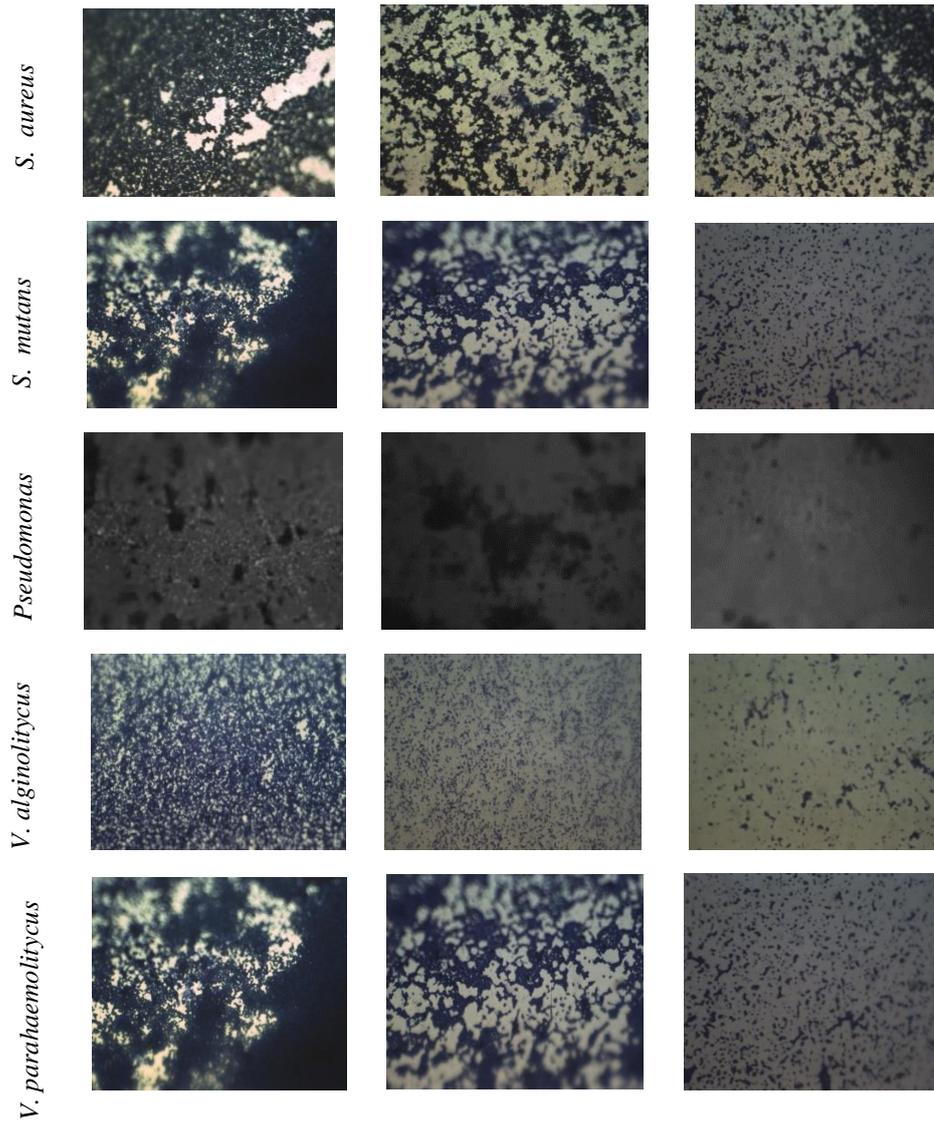
	AML	BTL	BSL	SFL	ALL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>S. mutans</i> INCQS	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+
<i>Samonella</i> ser. Brandeirup Lamap 18	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+
<i>Pseudomonas</i> 246B	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-
<i>V. parahaemolyticus</i> 53	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+
<i>V. alginolyticus</i> 39	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+

Fonte: Autora, 2023.

Figura 8 – Imagens dos resultados do teste de atividade antibiofilme das lectinas de organismos marinhos.

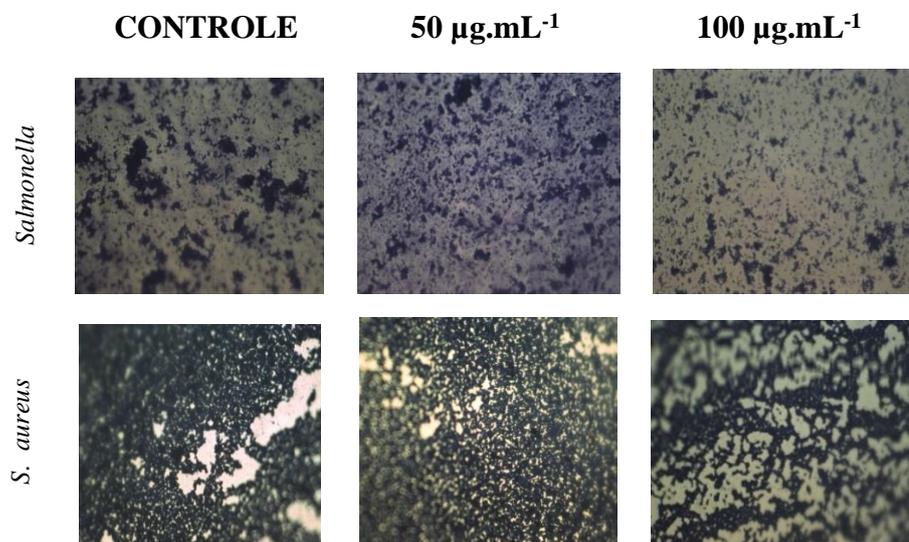
a) AML

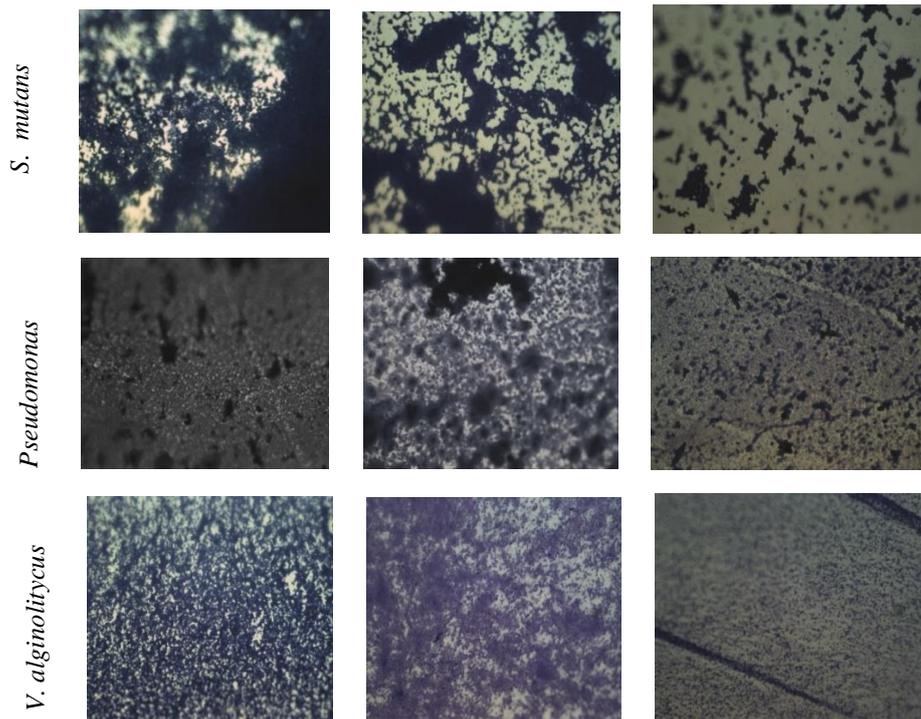




Fonte: Autora, 2022. Imagens obtidas a partir do aumento em 40x de um microscópio óptico.

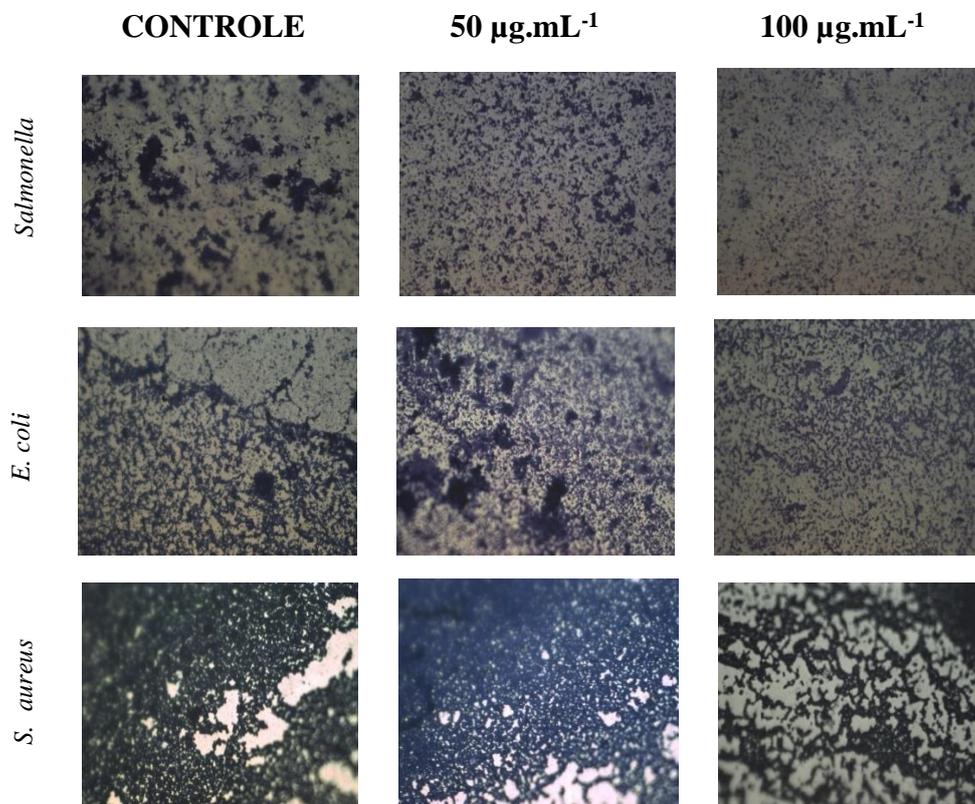
b) SFL

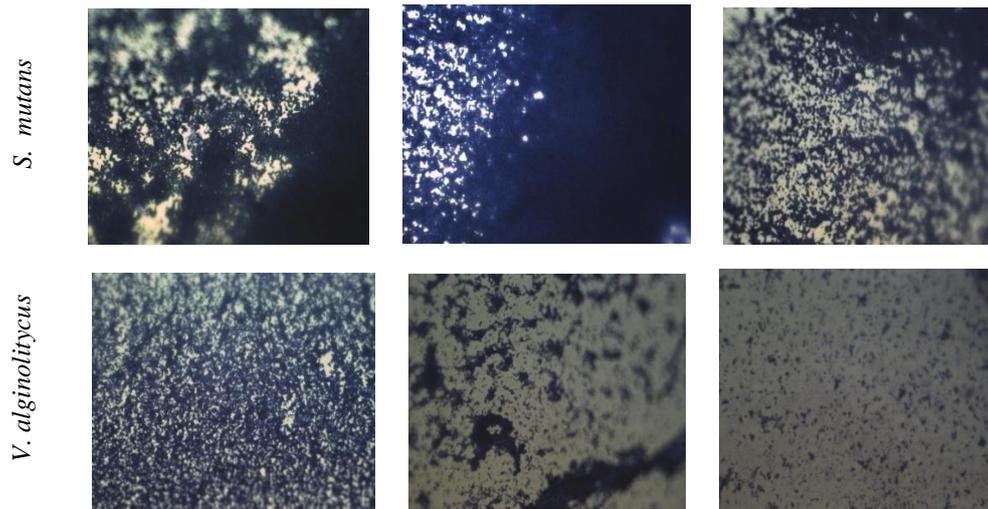




Fonte: Autora, 2022. Imagens obtidas a partir do aumento em 40x de um microscópio óptico.

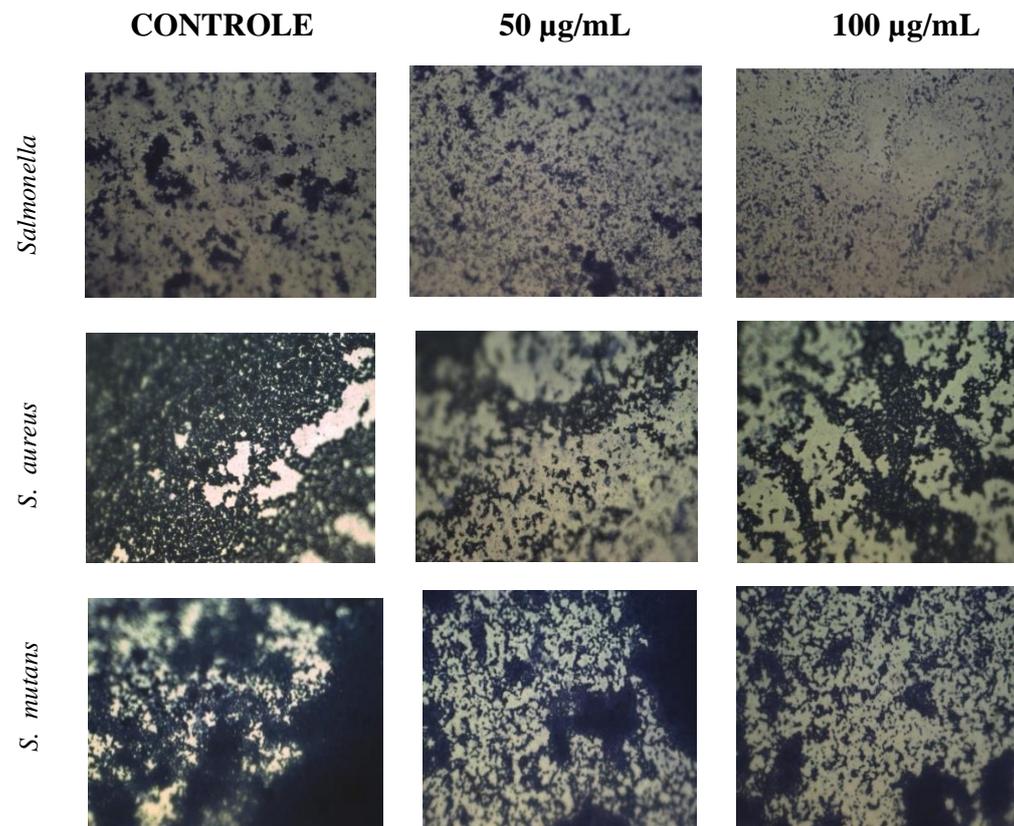
c) BSL





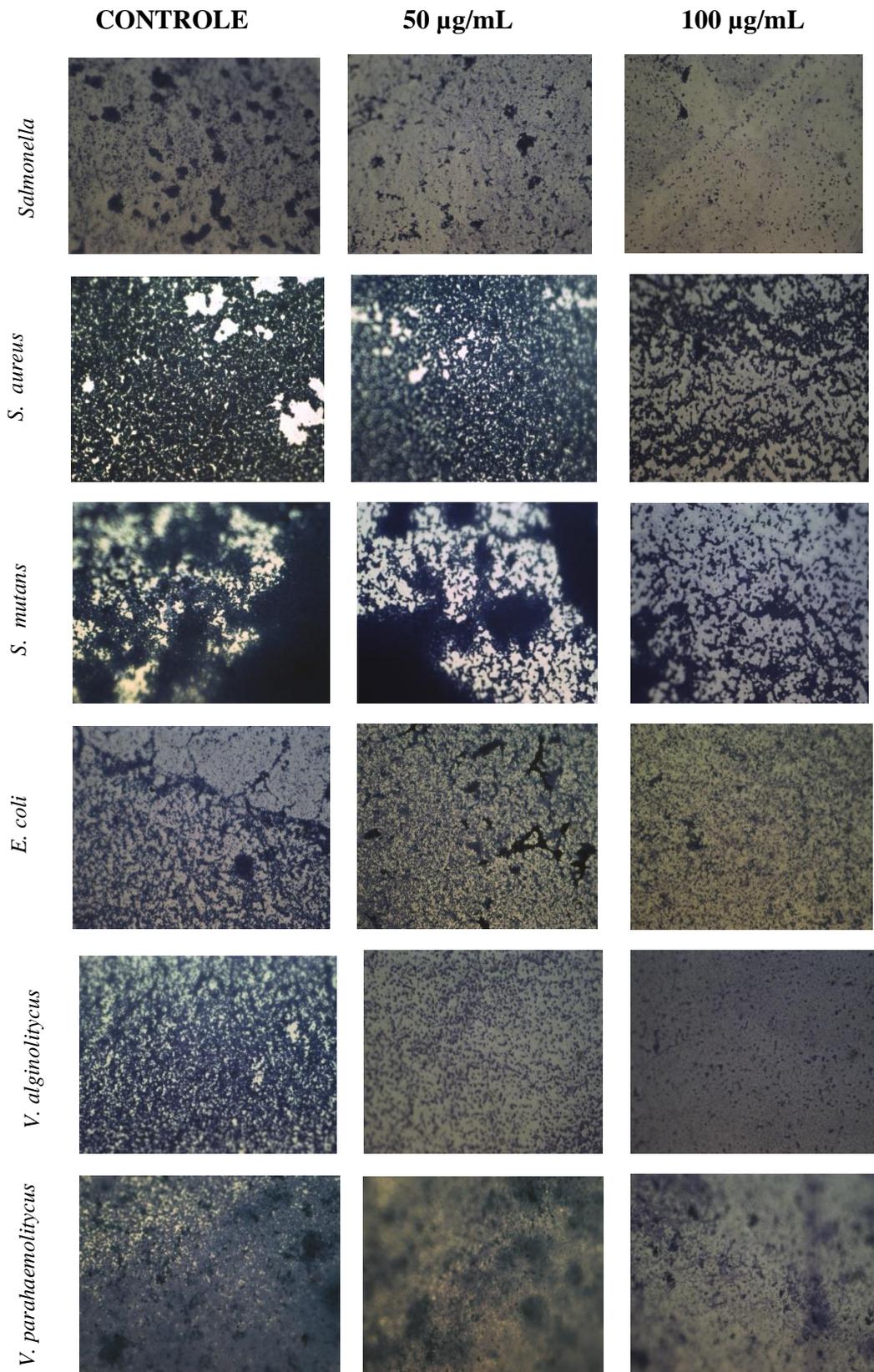
Fonte: Autora, 2022. Imagens obtidas a partir do aumento em 40x de um microscópio óptico.

d) BTL



Fonte: Autora, 2022. Imagens obtidas a partir do aumento em 40x de um microscópio óptico.

e) ALL



Fonte: Autora, 2022. Imagens obtidas a partir do aumento em 40x de um microscópio óptico.

4. DISCUSSÃO

As cepas bacterianas usadas no presente trabalho foram submetidas a diversos testes como mencionado nos resultados, a fim de descobrir se possuíam características satisfatórias para aplicação nos ensaios, principalmente em relação à produção de biofilme.

Inicialmente realizou-se uma triagem e em seguida foram selecionadas 7 cepas bacterianas. Todas apresentaram capacidade de produção de biofilme, com destaque para *Pseudomonas* que apresentou os melhores resultados nos testes de vermelho congo e de aderência em tubos e microplacas. As bactérias pertencentes a este gênero são em sua maioria patógenos oportunistas, sendo consideradas uma ameaça, pois se adaptam a vários ambientes (LEE; YOON, 2017). Com frequência são encontradas na indústria alimentícia, onde contaminam materiais utilizados no processamento dos alimentos, ocasionando a chamada contaminação cruzada (CUNAULT *et al.*, 2018; ROSSI *et al.*, 2018). Algumas cepas de origem ambiental podem ser induzidas a produzir antibióticos quando são desafiadas a coexistir com potenciais linhagens concorrentes, provocando assim uma resposta antagônica (BURGESS *et al.*, 1999). *Pseudomonas* são notadamente conhecidas por serem excelentes produtoras de biofilme e de maneira geral diversos fatores estão relacionados com essa produção (LEE; YOON, 2017).

A outra cepa que apresentou bons resultados nos testes de produção de biofilme foi o *Vibrio parahaemolyticus*, que é uma das bactérias mais presente no cultivo de camarão e sua presença em biofilme proporciona maior resistência ao estresse, contribuindo para a persistência dos patógenos no meio, o que pode ameaçar a indústria de pescado (WANG *et al.*, 2022). Alguns estudos demonstraram que *V. parahaemolyticus* pode formar biofilme na superfície de camarões e em superfícies abióticas como aço inoxidável, poliestireno, chapas de fibra, caixas de polipropileno, vidro, podendo ainda estar presente nas superfícies internas dos tubos das redes de distribuição de água o que vem a ser um risco para os cultivos (HAN *et al.*, 2016; ASHRAFUDOULLA *et al.*, 2019).

V. parahaemolyticus forma biofilme usando flagelos polares e laterais, *pili* e secreção de adesinas, respectivamente. A motilidade facilita a interação celular com a superfície, bem como a infecção virulenta das células hospedeiras (ROSSI *et al.*, 2018). A patogenicidade de uma cepa e sua capacidade de formar biofilmes são propriedades relacionadas. Song e colaboradores (2017) descobriram que *V. parahaemolyticus* patogênico acumula mais matriz de biofilme do que cepas não patogênicas, assim essa bactéria em biofilme apresenta mais riscos podendo prejudicar tanto os animais nos cultivos aquícolas como a

indústria de pescados, afetando também o mercado consumidor. Por isso, que a descoberta de novos compostos que combatam a formação de biofilmes dessas bactérias presentes nos ambientes aquícolas é um assunto tão atual e tão relevante, já que se faz necessário a busca por soluções.

No presente estudo foram selecionadas 6 lectinas, 4 pertencentes a algas marinhas vermelhas (AML, BSL, BTL e SFL) e 2 pertencentes a esponjas marinhas (AFL e ALL). Na literatura é possível encontrar várias lectinas de organismos marinhos que apresentaram diversas atividades biológicas, por isso essas lectinas foram escolhidas. Nos ensaios de biofilme não foi utilizada a lectina AFL devido à dificuldade de se encontrar a matéria-prima (esponja marinha *Aplysina fulva*) para isolar a proteína.

4.1 Atividade antibacteriana

5.1.1 Mínima Concentração Inibitória - MIC

As lectinas de algas marinhas não exibiram atividade antibacteriana, embora esse fato não seja isolado, visto que outras lectinas apresentaram resultado similar, como é o caso da MEL, lectina isolada da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*, que não mostrou atividade antibacteriana quando testada com as mesmas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* ser. Brandeirup Lamap 18 (CHAVES *et al.*, 2018). Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com Chaves (2018), onde foi observado que a lectina SFL não apresentou atividade antibacteriana contra algumas cepas, inclusive iguais às do trabalho em questão (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Samonella* ser. Brandeirup Lamap 18). É interessante mencionar que algumas lectinas de algas marinhas obtiveram êxito contra o crescimento bacteriano, constatando que podem apresentar atividade antibacteriana, como é o caso da lectina (EDA) isolada da alga marinha vermelha *Eucheuma denticulatum* que inibiu o crescimento da bactéria *Vibrio alginolyticus* (HUNG *et al.*, 2015).

Já AFL e ALL apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas, similar a outras lectinas de esponjas como a CvL, isolada da *Cliona varians*, que também apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas, inibindo em 90% as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA *et al.*, 2006). Um outro exemplo de lectina de invertebrado marinho com potencial antibacteriano é a rAjGal-1, originada do pepino do mar *Apostichopus japonicus*, que exibiu atividade antibacteriana contra

as bactérias Gram negativas *Vibrio splendidus* e *Escherichia coli*, sendo verificado que a rAjGal-1 participa do sistema imunológico do *A. japonicus* eliminando patógenos invasores (ZHANG *et al.*, 2020). As atividades antimicrobianas dos fatores humorais são mecanismos importantes e eficazes para o hospedeiro eliminar patógenos (ZHANG *et al.*, 2020).

A Pp-Lec lectina, purificada da hemolinfa do caranguejo azul *Portunus pelagicus*, apresentou atividade antibacteriana contra diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas, inclusive contra *Pseudomonas* e *V. parahaemolyticus*, espécies também testadas no presente trabalho, entretanto nem AFL e nem ALL apresentaram potencial antibacteriano contra esses microrganismos (JAYANTHI *et al.*, 2017).

Ao que tudo indica as lectinas provavelmente estão envolvidas na imobilização de bactérias, ligação e destruição das paredes celulares das bactérias, resultando na inibição ou terminação do crescimento do microrganismo (TUNKIJJANUKIJ; OLAFSEN, 1998; JAYANTHI *et al.*, 2017).

Acredita-se que lectinas que possuem atividade antibacteriana estejam envolvidas na resposta imune do organismo, além disso, podem ter aplicações biotecnológicas. Há casos de lectinas de invertebrados marinhos que não apresentaram ação antibacteriana e mesmo assim foram capazes de reduzir a biomassa de biofilme de algumas bactérias, é o caso da CCL lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (MARQUES *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais as lectinas exercem sua atividade não são bem descritos, mas acredita-se que sua atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorra por meio de interações das lectinas com componentes da parede celular bacteriana, incluindo ácidos teicóico e teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (VASCONCELOS *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2010). Algumas lectinas, mesmo apresentando a mesma especificidade para determinado açúcar, podem expressar diferentes atividades contra o crescimento dos microrganismos, que pode ser explicado por suas características intrínsecas (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

5.1.2 Aglutinação de células bacterianas

A aglutinação de bactérias é outra atividade antibacteriana que pode ser desempenhada por lectinas de organismos marinhos. Chaves (2018) usando a lectina SFL encontrou resultado positivo (células bacterianas agregadas) para *E. coli* e *S. aureus*, semelhante ao que foi observado no presente trabalho (CHAVES, 2018). Outro exemplo é a MEL, lectina isolada da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*, que aglutinou as cepas

de *Salmonella* multirresistente, fato também observado na presente tese com a AML e BTL. MEL ainda foi capaz de aglutinar a cepa patogênica de *Vibrio alginolyticus*, mas no trabalho em questão apenas a lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL) apresentou resultado similar (CHAVES *et al.*, 2018).

Todas as lectinas testadas foram capazes de aglutinar *E. coli*, entretanto algumas tiveram uma aglutinação mais pronunciada (AML, SFL e AFL), isso pode ser devido ao reconhecimento mais específico dos carboidratos presentes na superfície celular da *E. coli*. Como mencionado anteriormente, as lectinas têm como principal característica a capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos de forma bastante específica, assim podem se ligar aos polissacarídeos e lipopolissacarídeos presentes na superfície das células bacterianas causando a aglutinação, mas qualquer variação de polissacarídeos vai afetar esse reconhecimento e consequentemente a aglutinação (WILSON; CHEN; RATCLIFFE, 1999).

A lectina ALL já havia sido testada quanto a aglutinação por Carneiro e colaboradores (2017) e aglutinou *E. coli* e *S. aureus* ambas ATCC, no presente trabalho foram encontrados os mesmos resultados. Entretanto, o ensaio foi realizado com mais cepas, dessa forma ALL aglutinou também estirpes de *Salmonella* multirresistente e *Streptococcus mutans*. É interessante mencionar que no teste de MIC, ALL foi capaz de inibir o crescimento das cepas *S. aureus* e *S. mutans*, apesar de que muitas vezes uma lectina pode ter atividade aglutinante e não apresentar atividade antibacteriana, já que os mecanismos envolvidos são diferentes. Resultados similares foram encontrados para a lectina rAjGal-1 do pepino do mar *Apostichopus japonicus*, que aglutinou e inibiu o crescimento de *Vibrio splendidus* e *Escherichia coli* e na lectina CgLec-4E da ostra *Crassostrea gigas* que aglutinou e inibiu o crescimento de *Vibrio alginolyticus* (ZHANG *et al.*, 2020; CHE *et al.*, 2021).

Chikalovets *et al.* (2016) relataram que a lectina MTL, obtida a partir do mexilhão *Mytilus trossulus*, foi capaz de aglutinar fortemente *Vibrio proteolyticus* e, quando foi pré-incubada com D-galactose, seu açúcar inibidor específico, a atividade aglutinante foi completamente abolida, confirmando que a aglutinação ocorre a partir do reconhecimento da lectina a galactose presente na superfície das células de *V. proteolyticus*. HGA-2 e ELEL, que são específicas a galactosídeos, também apresentaram aglutinação de bactérias (CHIKALOVETS *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2015), das lectinas testadas no trabalho em questão apenas ALL é inibida por galactosídeos. As interações galectina-glicano são essenciais para diversos processos imunológicos, incluindo reconhecimento de padrões, imunomodulação e respostas imunes (RABINOVICH; TOSCANO, 2009). A capacidade das lectinas da esponja de se ligar a carboidratos específicos

em células bacterianas poderia ser usada para desenvolver novos agentes antimicrobianos (GARDERES *et al.*, 2015).

Para tentar explicar o mecanismo da aglutinação alguns estudos afirmam que várias estruturas glicosiladas presentes na superfície celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser reconhecidas pelas lectinas, incluindo peptidoglicano, polissacarídeos capsulares, ácido teicóico além dos polissacarídeos e lipopolissacarídeos (CARNEIRO *et al.*, 2017; PREETHAN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

A aglutinação pode desempenhar um papel crucial na eliminação de possíveis patógenos em invertebrados marinhos, assim as lectinas presentes nesses organismos podem estar envolvidas no sistema imune (CHIKALOVETS *et al.*, 2016).

Antigamente os testes de aglutinação eram usados para diferenciar e identificar cepas bacterianas, depois de alguns anos a identificação de bactérias pode ser realizada através de técnicas mais modernas e precisas, entretanto uma aplicação biotecnológica interessante para lectinas que aglutinam bactérias seria no intuito de ajudar a combater infecções, onde ajudariam a direcionar de forma mais precisa e eficiente o uso de antibióticos, já que as células bacterianas vão estar unidas devido a aglutinação, aumentando assim a eficiência do medicamento dando respostas mais rápidas ao tratamento (SLIFKIN; DOYLE, 1990; HASSAN *et al.*, 2020).

4.2 Atividade antifúngica

No presente trabalho tanto as lectinas de algas marinhas vermelhas (AML, BTL, BSL e SFL) quanto as de esponjas (ALL e AFL) apresentaram atividade antifúngica, mas somente frente ao fungo filamentosos *Aspergillus niger* inibindo seu crescimento. *A. niger* é um fungo onipresente de distribuição mundial e vida saprófita, sendo uma das espécies mais isoladas do gênero *Aspergillus* em infecções oportunistas que ocorrem em humanos, onde causam doenças primárias e secundárias na pele, além de doenças pulmonares e também é conhecido por ser um contaminante de alimentos (REYES *et al.*, 2013). O *A. niger* produz melanina que é um pigmento biológico envolvido na patogenicidade do fungo além disso, conferem aos microrganismos fúngicos a capacidade de tolerar ambientes extremos e hostis já que desempenham múltiplas funções biológicas como fotoproteção, termorregulação, ligação a radicais livres e metais, proteção contra desidratação, estressores químicos e mecânicos (CORDERO; CASADEVALL *et al.*, 2017). A produção de melanina aumenta significativamente a virulência de muitos fungos patogênicos humanos importantes

(NOSANCHUK *et al.*, 2015), por isso a descoberta de compostos que inibam o crescimento desses microrganismos é importante.

Os fungos são um problema de saúde pública extremamente negligenciado e com poucas opções de tratamento, tal fato foi confirmado com os diversos casos de aspergiloses que acometeram pacientes internados por conta da COVID-19 fungos (DOURADO *et al.*, 2021). Pesquisadores temem que as drogas disponíveis no mercado não sejam capazes de controlar novos surtos fúngicos, o que se faz necessário mais ferramentas de tratamento, o que torna ser de extrema importância encontrar substâncias capazes de atuar no combate desses fungos (DOURADO *et al.*, 2021), aumentando assim o interesse nas lectinas com potencial antifúngico.

Diversas lectinas obtidas a partir de organismos marinhos podem apresentar atividade antifúngica podendo inibir o crescimento ou causar aglutinação. Como exemplos temos a MTL isolada do bivalve marinho *Mytilus trossulus* e a GCL isolada do mexilhão *Crenomytilus grayanus*, que inibiram o desenvolvimento de diversos fungos dentre eles o gênero *Aspergillus* (CHIKALOVETS *et al.*, 2016; CHIKALOVETS *et al.*, 2015). A HOL-30 uma das lectinas isolada da esponja marinha *Halichondria okadai* foi capaz de inibir o crescimento do *A. niger* similar aos resultados encontrados no presente trabalho (KAWSAR *et al.*, 2010), a Hp-Lec lectina do bivalve *Hemifusus pugilinus* inibiu o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* incluindo o *A. niger* (SIVAKAMAVALLI *et al.*, 2021).

A inibição do crescimento de fungos pode ocorrer através da ligação da lectina às hifas, pois pode resultar em uma baixa absorção de nutrientes pelo fungo e a lectina pode também prejudicar o processo de germinação de esporos (CHIKALOVETS *et al.*, 2016). É importante ressaltar, que a atividade antifúngica desempenhada por lectinas pode estar associada a resposta imune do organismo frente a infecção por patógenos, onde executa um reconhecimento específico (CHIKALOVETS *et al.*, 2016).

Além de atuarem na imunidade dos organismos, as lectinas podem ter aplicações terapêuticas no tratamento de doenças em humanos e aplicações na indústria de alimentos como por exemplo no revestimento de filmes que tem por objetivo aumentar o tempo de prateleira dos alimentos (CHIKALOVETS *et al.*, 2016).

4.3 Letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

O ensaio de letalidade em *Artemia* é útil como um teste preliminar da toxicidade de possíveis moléculas biologicamente ativas, sendo relevante a sua utilização quando se está

selecionando novos compostos. Ao exibir efeito tóxico, a lectina poderia ser então testada contra células cancerígenas, visando a causar letalidade nas células cancerígenas, potencializando sua utilização como uma importante ferramenta biotecnológica de combate ao câncer (CARNEIRO *et al.*, 2012). Dessa forma, como objetivo do trabalho visa à aplicação na aquicultura é possível que as lectinas que apresentaram toxicidade não possam ser usadas já que sua utilização poderia implicar no efeito tóxico contra peixes e camarões cultivados. Além disso, artemia salina é um microcrustáceo, que seria um modelo ideal de toxicidade para crustáceos (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

De todas as lectinas testadas apenas SFL exibiu toxicidade, semelhante ao observado com a lectina H-1, uma das lectinas isoladas da esponja marinha *Haliclona caerulea*, que foi capaz de matar 97% dos náuplios na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já a HGA-2, isolada do pepino do mar *Holothuria grisea*, foi capaz de matar 100% dos náuplios na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MELO *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2012). Ambos os resultados observados evidenciaram que, tanto H-1 como HGA-2 exibiram baixos valores de LC50, mostrando que em baixas concentrações essas lectinas possuem uma alta letalidade. Dessa forma, podemos concluir que possivelmente o uso de SFL poderia ocasionar problemas aos animais cultivados.

5.4 Atividade Antibiofilme

Na literatura podemos encontrar diversas lectinas isoladas de organismos marinhos que apresentaram atividade antibiofilme (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; PREETHAN *et al.*, 2019) e no presente trabalho todas as lectinas testadas foram capazes de reduzir o biofilme das cepas utilizadas. Algumas lectinas conseguiram inibir o biofilme de um número maior de cepas do que outras, com destaque para AML que reduziu o biofilme de todas as cepas testadas. ALL reduziu o biofilme das bactérias Gram-positivas e esses resultados corroboraram com os testes de MIC, aglutinação e atividade antifúngica, mostrando que de todas as lectinas testadas no presente trabalho, ALL foi a que apresentou os melhores resultados.

A lectina AML e ALL foram as únicas capazes de inibir o biofilme do patógeno aquático *V. parahaemolyticus*, resultado também observado na lectina isolada do camarão marinho *Penaeus semisulcatus* e na MmLec, isolada do camarão marinho *Metapenaeus monoceros* (PREETHAM *et al.*, 2020; PREETHAM *et al.*, 2019). Outra lectina de organismo marinho que também apresentou atividade antibiofilme contra *V. alginolyticus* foi a LvCT13, isolada do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (LI *et al.*, 2014). *V. parahaemolyticus* é um

dos patógenos oportunistas que mais afeta o cultivo de camarões, e quando em biofilme, esse risco é mais elevado (YILDIZ; VISICK 2009). Dessa forma, compostos que inibam esse microrganismo se torna de extrema relevância na aquicultura. É interessante mencionar que a cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada no presente trabalho foi isolada do canal de drenagem de uma fazenda de carcinicultura localizada no Piauí, o que torna os resultados de AML e ALL ainda mais promissores visando uma futura aplicação biotecnológica dessas moléculas na carcinicultura.

As lectinas AML, BSL, SFL e ALL reduziram o biofilme de *V. alginolyticus*. Esse resultado é significativo, visto que *V. alginolyticus*, assim como o *V. parahaemolyticus*, estão associados a quadros de infecção em organismos aquáticos, como patógeno oportunista causador de vibriose em peixes, crustáceos e moluscos (ARUNKUMAR *et al.*, 2020). Conseqüentemente, compostos que inibam a formação de biofilme dessa bactéria podem ter importantes aplicações nos ambientes aquícolas.

Na literatura podemos encontrar algumas lectinas de esponjas marinhas que foram capazes de inibir o biofilme de várias cepas bacterianas assim como ALL, como foram os resultados encontrados com AFL, uma lectina da *Aplysina fulva*, HOL-18, uma das lectinas da *Halicondria okadai* e da CCL, lectina de *Chondrilla caribensis* (CARNEIRO *et al.*, 2018; HASAN; OSEKI, 2019; MARQUES *et al.*, 2018). Carneiro e colaboradores (2017) já haviam testado ALL frente a formação de biofilme das cepas *E. coli* e *S. aureus*, semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, mesmo utilizando uma outra metodologia (Stepanovic *et al.*, 2000), utilizando-se um número maior de cepas, incluindo bactérias de origem ambiental e cepas comerciais. Os resultados obtidos mostraram que ALL reduziu a formação do biofilme também da *Salmonella* multirresistente, *Streptococcus mutans*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus* demonstrando um excelente potencial antibiofilme. Diante dos resultados evidenciados nos testes antibiofilme, antibacteriano e antifúngico podemos especular que ALL possa estar envolvida na defesa imunológica da esponja *Aplysina fulva*.

A atividade antibiofilme de lectinas de algas BSL e HML já foi previamente testada por Vasconcelos e colaboradores (2014) onde reduziram o biofilme das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* todas ATCC. Entretanto, embora tenha sido observado no presente trabalho, que BSL foi capaz de reduzir o biofilme da *S. aureus* e *P. aeruginosa* testadas por Vasconcelos *et al.* (2014), não foi evidenciada a redução do biofilme bacteriano produzido pela *Pseudomonas* testada, já que se trata de uma cepa de origem possui características de variabilidade genética e mecanismos enzimáticos distintos e específicos.

Teixeira e colaboradores (2014) testaram BTL e BSL contra o biofilme de algumas cepas clínicas do gênero *Streptococcus*, pesquisando a prevenção da adesão inicial dessas bactérias causadoras de cáries pelas lectinas dessas algas. BSL inibiu mais de 75% da adesão de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. sobrinus* e *S. mutans*, chegando a 92% para este último. A BTL obteve resultados estatisticamente significativos apenas em *S. mitis* e *S. sobrinus*, cuja adesão foi reduzida em 32,5% e 54,4%, respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, 2014). No presente trabalho, BTL e BSL foram testadas frente a uma cepa de origem ambiental de *S. mutans*, apresentando resultados bastante satisfatórios, principalmente na maior concentração testada ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a mesma usada por Teixeira *et al.* (2007). Assim, podemos comprovar o potencial antibiofilme dessas duas lectinas de algas marinhas vermelhas, como ferramentas biotecnológicas.

Quando comparamos os resultados da inibição do crescimento bacteriano e os resultados do teste antibiofilme, podemos observar que as lectinas, mesmo não inibindo o crescimento das bactérias em concentrações de até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção da AFL e ALL, foram capazes de reduzir o biofilme das cepas em concentrações de 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Alguns autores sugeriram que a formação de grandes agregados, causa uma diminuição no número de bactérias aderentes, o que pode explicar porque algumas lectinas podem inibir a formação de biofilme em vez de reduzir o crescimento bacteriano (VASCONCELOS *et al.*, 2014), resultados similares encontrados em diversos estudos (VASCONCELOS *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2017).

Além disso, indicaram que a formação de biofilme está diretamente relacionada ao tipo de lipopolissacarídeo produzido pela bactéria e as habilidades de algumas lectinas em inibir a formação de biofilme pode resultar de interações entre a lectina e o lipopolissacarídeo, afetando a aderência dessas bactérias e, assim, influenciando a formação do biofilme (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

As lectinas de organismos marinhos possuem potencial como importantes ferramentas biotecnológicas para aplicações nas ciências biomédicas como também na aquicultura, sendo, portanto, de grande interesse os estudos que busquem descobrir possíveis atividades biológicas desempenhadas por essas proteínas, incluindo atividade antimicrobiana e antibiofilme.

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que as lectinas de organismos marinhos AML, SFL, BSL e BTL isoladas de algas marinhas vermelhas, e ALL e AFL de esponjas marinhas possuem atividades antimicrobianas e antibiofilme. Algumas exibiram um maior potencial que as outras, como a ALL, que tem ação antibiótica restrita contra bactérias Gram-positivas, atividade antibiofilme de amplo espectro, especificamente contra espécies de *Vibrio* de interesse clínico humano e zootécnico na aquicultura, além disso apresentou atividade antifúngica contra o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. AML foi a única lectina, capaz de reduzir o biofilme bacteriano de todas as cepas testadas, é um resultado bastante relevante visto que as cepas Gram positivas e Gram negativas possuem paredes celulares diferentes e portanto, suas características estruturais divergem e mesmo nessas condições AML possui mecanismos capazes de inibir o biofilme de ambas estruturas, mostrando um potencial biotecnológico relevante. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem fortemente que as lectinas de organismos marinhos podem ser importantes ferramentas biotecnológicas, com uma vasta aplicação em diversas áreas inclusive na aquicultura.

REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KOVACS, A.T.; KUIPERS, O.P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in gram-positive bacteria. **Current Opinion Biotechnology**, [s.l], v. 22, p. 172-179, 2011.
- ABREU, T.M.; SILVA, L.M.C.M.; VANDERLEI, E.S.O.; MELO, C.M.L.; PEREIRA, V.R.A.; BENEVIDES, N.M.B. Cytokine Production Induced by Marine Algae Lectins in BALB/c Mice Splenocytes. **Protein and Peptide Letters**, [s.l], v. 19, p. 975-981, 2012.
- AHMED, M.K.; BHOWMIK, S.; GITERU, S.G.; ZILANI, M.N.H.; ADADI, P.; ISLAM, S.S.; KANWUGU, O.N.; HAQ, M.; AHMED, F.; NG, C.C.W.; CHAN, Y.S.; ASADUJJAMAN, Md.; CHAN, G.H.H.; NAUDE, BEKHIT, NG, T.B.; WONG, J.H. An Update of Lectins from Marine Organisms: Characterization, Extraction Methodology, and Potential Biofunctional Applications. **Marine Drugs**, [s.l], v. 20, p. 430, 2022.
- ALMATROUDI, A.; GOSBELL, I.B.; HU, H.; JENSEN, S.O.; ESPEDIDO, B.A.; TAHIR, S.; GLASBERY, T.; LEGGE, P.; WHITELEY, G.; DEVA, A. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, [s.l], v. 93, p. 263-270, 2016.
- ALMEIDA, A.S. Purificação, caracterização bioquímica e efeito na inibição de biofilmes bacterianos de uma lectina isolada da esponja marinha *Aaptos* sp. 2017. 62p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- ALVES, M. F. A.; BARRETO, F. K. A.; VASCONCELOS, M. A.; NASCIMENTO NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; 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**, [s.l], v. 158, p. 773-780, 2020.
- ARUNKUMAR, M.; LEWIS OSCAR, F.; THAJUDDIN, N.; PUGAZHENDHI, A.; NITHYA, C. In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: a significant threat in aquaculture. **Process Biochemistry**, [s.l], v. 94, p. 213-223, 2020.
- ASHRAFUDOULLA, M.; MIZAN, M.F.R.; PARK, H.; BYUN, K.H.; LEE, N.; PARK, S.H.; HA, S.D. Genetic relationship, virulence factors, drug resistance profile and biofilm formation ability of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussel. **Frontiers in Microbiology**, [s.l], v. 10, p. 513, 2019.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s.l], v. 6, p. 71-79, 2016.
- BARTON, C.; KOUOKAM, J.C.; LASNIK, A.B.; FOREMAN, O.; CAMBON, A.; BROCK, G.; MONTEFIORI, D.C.; VOIDANI, F.; MCCORMICK.; O'KEEFE, B.R.; PALMER, K.E. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad-spectrum antiviral lectin

griffithsin in two laboratory rodent models. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l], v. 58, p. 120-127, 2014.

BARRE, A.; SIMPLICIEN, M.; BENOIST, H.; VAN DAMME, E. J.M.; ROUGÉ, P. Mannose-Specific Lectins from Marine Algae: diverse structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. **Marine Drugs**, [s.l], v. 17, p. 440, 2019.

BENEVIDES, N. M. B. LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s.l], v. 8, p. 117-122, 1996.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l], v. 72, p. 2809-2810, 1950.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, [s.l], v. 32, p. 116-211, 2015.

BI, J.; NING, M.; XIE, X.; FAN, W.; HUANG, Y.; GU, W.; WANG, W.; WANG, L.; MENG, Q. A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunology**, [s.l], v. 103, p. 293-301, 2020.

BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l], v. 21, p. 5-11, 2015.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, [s.l], v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CAI, W.; ARIAS, C. R. Biofilm Formation on Aquaculture Substrates by Selected Bacterial Fish Pathogens. **Journal Of Aquatic Animal Health**, [s.l], v. 29, p. 95-104, 2017.

CAI, Y.; XU, W.; GU, C.; CAI, X.; QU, D.; LU, L.; XIE, Y.; JIANG, S. Griffithsin with A Broad-Spectrum Antiviral Activity by Binding Glycans in Viral Glycoprotein Exhibits Strong Synergistic Effect in Combination with A Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting SARS-CoV-2 Spike S2 Subunit. **Virologica Sinica**, [s.l], v. 35, p. 857-860, 2020.

CAMMARATA, Matteo; PARISI, Maria G.; VASTA, Gerardo R. Evolution and Immune Function of Fish Lectins. In: BALLARIN, Lorian; CAMMARATA, Matteo. **Lessons in Immunity**: from single-cell organisms to mammals. Cambridge: Academic Press, 2016. Cap. 18. p. 239-245.

CARNEIRO, R.F.; DE MELO, A.A.; NASCIMENTO, F.E.; SIMPLICIO, C.A.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R.M.; MOTA, S.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l], v. 26, p. 51-58, 2012.

CARNEIRO, R.F.; TEIXEIRA, C.S.; MELO, A. A.; ALMEIDA, A. S.; CAVADA, B.S.; SOUSA, O. V.; ROCHA, B.A.M.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. L -rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: amino acid sequence and molecular modeling. : Amino acid sequence and molecular modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 78, p. 180-188, 2015.

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

CARNEIRO, R.F.; LIMA-JUNIOR, P.H.P.; CHAVES, R.P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A.L.; VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 19, p. 213-222, 2017b.

CARNEIRO, R.F.; VIANA, J.T.; TORRES, R.C.F.; SILVA, L.T.; ANDRADE, A.L.; VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l], v. 662, p. 169-171, 2019.

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. New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l], v. 32, p. 4263-4276, 2020.

CARROLL, A.R.; COPP, B.R.; DAVIS, R.A.; KEYZERS, R.A.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, [s.l], v. 38, p. 362-413, 2021.

CARROLL, A.R.; COPP, B.R.; DAVIS, R.A.; KEYZERS, R.A.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, [s.l], v. 39, p. 1122-1171, 2022.

CHA, G.H.; LIU, Y.; PENG, T.; HUANG, M.Z.; XIE, C.Y.; XIAO, Y.C.; WANG, W.N. Molecular cloning, expression of a galectin gene in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the antibacterial activity of its recombinant protein. **Molecular Immunology**, [s.l], v. 67, p. 325-340, 2015.

CHAMBERS, J. R.; SAUER, K. Small rnas and their role in biofilm formation. **Trends in Microbiology**, [s.l], v. 21, p. 39-49, 2013.

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**, [s.l], v. 30, p. 2629-2638, 2018.

CHAVES, R.P. Caracterização estrutural e potencial biotecnológico de duas lectinas pertencentes a família de lectinas homologas a *Oscillatoria agardhii* agglutinin (OAAH). 2018. 116p. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHEN, H.; CAI, X.; QIU, H.; FANG, J.; WU, X. A novel C-type lectin from *Crassostrea gigas* involved in the innate defense against *Vibrio alginolyticus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l], v. 566, p. 155-163, 2021.

CHEUNG, R.C.F.; WONG, J.H.; PAN, W.; CHAN, Y.S.; YIN, C.; DAN, X.; NG, T.B. Marine lectins and their medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v. 99, p. 3755-3773, 2015.

CHIKALOVETS, I. V.; CHERNIKOV, O. V.; PIVKIN, M. V.; MOLCHANOVA, V.I.; LITOVCHENKO, A. P.; LI, W; LUKYANOV, P. A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 42, n. 2, p. 503-507, 2015.

CHIKALOVETS, I. V.; KOVALCHUK, S. N.; LITOVCHENKO, A. P.; MOLCHANOVA, V. I.; PIVKIN, M.V.; CHERNIKOV, O. V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity. : Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 50, p. 27-33, 2016.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l], v. 22, p. 996-1006, 1985.

CHOLEWIŃSKA, P.; MONIUSZKO, H.; WOJNAROWSKI, K.; POKORNY, P.; SZELIGOWSKA, N.; DOBICKI, W.; POLECHOŃSKI, R.; GÓRNIAK, W. The Occurrence of Microplastics and the Formation of Biofilms by Pathogenic and Opportunistic Bacteria as Threats in Aquaculture. **International Journal of Environmental Research And Public Health**, [s.l], v. 19, p. 8137, 2022.

COELHO, L.C.B.; SILVA, P.M.S.; OLIVEIRA, W.F.; MOURA, M.C.; PONTUAL, E.V.; GOMES, F.S.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins as antimicrobial agentes. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l], v. 125, p. 1238-1252.

CORDERO, R.J.B.; CASADEVALL, Ar. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, [s.l], v. 31, p. 99-112, 2017.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, [s.l], v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COSTA, F.H.F.; SAMPAIO, A.H.; NEVES, S.A.; BENEVIDES, N.; FREITAS, A.L. Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s.l], v. 5, p. 53-61, 1999.

DANG, Y.; NIE, L.; CHEN, J. Molecular and functional characterisation of a mannose-binding lectin-like gene from Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l], v. 104, p. 103558, 2020.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, [s.l], v. 2, p. 303-336, 2012.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l], v. 15, p. 167-193, 2002.

DOIRON, K.; BEAULIEU, L.; ST-LOUIS, R.; LEMARCHAD, K. Reduction of bacterial biofilm formation using marine natural antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l], v. 167, p. 524-530, 2018.

ELUMALAI, P.; RUBEENA, A.S.; AROCKIARAJ, J.; WONGPANYA, R.; CAMMARATA, M.; RINGO, E.; VASEEHARAN, B. The role of lectins in finfish: A review. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, [s.l], v. 27, p. 152-169, 2019.

FERNÁNDEZ-ALONSO, M.C.; DÍAZ, D.; BERBIS, M.Á.; MARCELO, F.; CAÑADA, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design. **Current Protein and Peptide Science**, [s.l], v. 13, p. 816-830, 2013.

FERREIRA, H.J.; ALMEIDA, E.M.; SILVA, W.M.B.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO NETO, L.G. Molecular Mechanisms Involved in the Antitumor Activity of Isolated Lectins from Marine Organisms: A Systematic Review. **Current Drug Targets**, [s.l], v. 20, 2019.

FINNEY, D.J. Probit analysis. Edição 3. **Cambridge University**: London, 1971.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FONSECA, V. J. A.; BRAGA, A.J.; RIBEIRO-FILHO, J.; TEIXEIRA, C.S.; HORA, G.C.A.; MORAIS-BRAGA, M.F.B. A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 195, p. 163-178, 2022.

FUX, C.A.; CONSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends In Microbiology**, [s.l], v. 13, p.34-40, 2005.

GALASSO, C.; CORINA, C.; SANSONE, C. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. **Antioxidants**, [s.l], v. 6, p. 1-33, 2017.

GARCIA, P.A.; HERNÁNDEZ, A.P.; FELICIANO, A.S.; CASTRO, M.A. Bioactive Prenyl- and Terpenyl-Quinones/Hydroquinones of Marine Origin. **Marine Drugs**, [s.l], v. 16, p. 1-52, 2018.

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

GEBREYOHANNES, G.; NYERERE, A.; BII, C.; SBHATU, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, [s.l], v. 5, 2019.

GODWA, N.G.; GOSWAMI, U.; KHAN, M.L. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 24, p. 450-458, 2008.

GUZMÁN-SOTO, I.; MCTIERNAN, C.; GONZALEZ-GOMEZ, M.; ROSS, A.; GUPTA, K.; SUURONEN, E.J.; MAH, T.F.; GRIFFITH, M.; ALARCON, E. I. Mimicking biofilm formation and development: recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. **Iscience**, [s.l], v. 24, p. 102443, 2021.

HAN, N.; MIZAN, M. F. R.; JAHID, I. K.; HA, Sang-Do. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. **Food Control**, [s.l], v. 70, p. 161-166, 2016.

HASAN, I.; OZEKI, Y. Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in *Halichondria okadai* (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 124, p. 819-827, 2019.

HASSAN, S-UI.; DONIA, A.; SIAL, U.; ZHANG, X.; BOKHARI, H. Glycoprotein- and Lectin-Based Approaches for Detection of Pathogens. **Pathogens**, [s.l], v. 9, p. 694, 2020.

HOLANDA, M.L.; MELO, V.M.; SILVA, L.M.; AMORIM, R.C.; PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l], v. 38, p. 1769-1773, 2005.

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**, [s.l], v. 27, p. 1657-1669, 2015.

HUANG, Y.; SHI, Y.; HU, S.; WU, T.; ZHAO, Z. Characterization and Functional Analysis of Two Transmembrane C-Type Lectins in Obscure Puffer (*Takifugu obscurus*). **Frontiers in Immunology**, [s.l], v. 11, p. 436, 2020.

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

IYAMA, C.; YONEDA, F.; TSUTSUMI, M.; TSUTSUI, S.; NAKAMURA, O. Mannose-binding C-type lectins as defense molecules on the body surface of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l], v. 116, p. 103915, 2021.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s.l], v. 81, p. 7-11, 2018.

JASPERS, M.; PASCALE, D.; ANDERSEN, J.H.; REYES, F.; CRAWFORD, A.D.; IANORA, A. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. **Journal of the Marine Association of the United Kingdom**, [s.l], v. 96, p. 151-158, 2016.

JAYANTHI, S.; ISHWARYA, R.; ANJUGAM, M.; ISWARYA, A.; KARTHIKEYAN, S.; VASEEHARAN, B. Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l], v. 62, p. 227-237, 2017.

KAWSAR, S.M.; MAMUN, S.M.A.; RAHMAN, M.S.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Effects of a 30 kDa D-Galactoside-Specific Lectin from the Demosponge, *Halichondria okadai*. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, [s.l], v. 37, p. 1097-1103, 2010.

KARUNASAGAR, I.; SHIVU, M.M.; GIRISHA, S.K.; KROHNE, G.; KARUNASAGAR, I. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. **Aquaculture**, [s.l], v. 268, p. 288-292, 2007.

KEYAERTS, E.; VIJGEN, L.; PANNECOUQUE, C.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, P.; EGBERINK, H.; BALZARINI, J.; VAN RANST, M. "Plant Lectins Are Potent Inhibitors of Coronaviruses by Interfering with Two Targets in the Viral Replication Cycle." **Antiviral Research**, [s.l], v. 75, p. 179–87, 2007.

KING, R.K.; FLICK JR, G.J.; PIERSON, M.D.; SMITH, S.A.; BOARDMAN, COALE JR. Identification of Bacterial Pathogens in Biofilms of Recirculating Aquaculture Systems. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [s.l], v. 13, p. 125-133, 2004.

KONG, P.; WANG, L.; ZHANG, H.; SONG, X.; ZHOU, Z.; YANG, J.; QIU, L.; WANG, L.; SONG, L. A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 30, p. 836-844, 2011.

KONOZY, E.H.E.; OSMAN, M El-Fadil M.; DIRAR, A. I.; GHARTEY-KWANSAH, G. Plant lectins: a new antimicrobial frontier. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s.l], v. 155, p. 113735, 2022.

KOVALCHUK, S.N.; CHIKALOVETS, I.V.; CHERNIKOV, O.V.; MOLCHANOVA, V.I.; LI, W; RASSKAZOV, V.A.; LUKYANOV, P.A. CDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 35, p. 1320-1324, 2013.

KROTMAN, Y.; YERGALIYEV, T.M.; ALEXANDER S. R.; AVRAHAMI, Y.; SZITENBERG. Dissecting the factors shaping fish skin microbiomes in a heterogeneous inland water system. **Microbiome**, [s.l], v. 8, p. 9, 2020.

KUNTTU, H.; SUNDBERG, L.R.; PULKKINEN, K.; VALTONEN, E.T. Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. **Environmental Microbiology Reports**, [s.l], v. 4, p. 398-402, 2012.

LEE, K.; YOON, S. S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal Of Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v. 27, p. 1053-1064, 2017.

LEE, C. Griffithsin, a Highly Potent Broad-Spectrum Antiviral Lectin from Red Algae: from discovery to clinical application. **Marine Drugs**, [s.l], v. 17, p. 567, 2019.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v. 16, p. 158-163, 2006.

LI, X.H.; LEE, J.H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**, [s.l], v. 55, p. 753-766, 2017.

LI, M.; LI, C.; MA, C.; LI, H.; ZUO, H.; WENG, S.; CHEN, X.; ZENG, D.; HE, J.; XU, X. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l], v. 46, p. 231-240, 2014.

LI, G.; CHENG, J.; MEI, S.; WU, T.; YE, T. *Tachypleus tridentatus* Lectin Enhances Oncolytic Vaccinia Virus Replication to Suppress In Vivo Hepatocellular Carcinoma Growth. **Marine Drugs**, [s.l], v. 16, p. 200, 2018.

LICKER, M.; MOLDOVAN, R.; HOGEA, E.; MUNTEAN, D.; HORHAT, F.; BADITOIU, L.; ROGOBETE, A.F.; TIRZIU, E.; ZAMBORI, C. Microbial biofilm in human health - an updated theoretical and practical insight. **Revista Română de Medicină de Laborator**, [s.l], v. 25, p. 9-26, 2017.

LIU, X.; XUEMEI, L.; MEITING, P.; XUANGANG, W.; XINXIN, D.; LIHUI, M.; JIEMING, Z.; JINXIANG, L.; HAIYANG, Y.; QUANQI, Z. A novel C-type lectin from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus* possesses antibacterial and anti-inflammatory activity. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l], v. 92, p. 11–20, 2019.

LIU, Y.; SU, Y.; ZHANG, A.; CUI, Z. A C-type lectin highly expressed in *Portunus trituberculatus* intestine functions in amp regulation and prophenoloxidase activation. **Antibiotics**, [s.l], v. 10, p. 541, 2021.

LU, Z.; REN, Z.; MU, C.; LI, R.; YE, Y.; SONG, W.; SHI, C.; LIU, L.; WANG, C. Characterization and functional analysis of an L-type lectin from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. **Gene**, [s.l], v. 664, p. 27–36, 2018.

LUSVARGHI, S.; BEWLEY, C.A. Griffithsin: an antiviral lectin with outstanding therapeutic potential. **Viruses**, [s.l], v. 8, p. 296, 2016.

MADUSANKA, R.K.; PRIYATHILAKA, T.T.; JANSON, N.D.; KASTHURIARACHCHI, T.D.W.; JUNG, S.; THARUKA, M.D.N.; LEE, J. Molecular, transcriptional and functional delineation of Galectin-8 from black rockfish (*Sebastes schlegelii*) and its potential immunological role. **Fish Shellfish Immunology**, [s.l], v. 93, p. 449-462, 2019.

MARQUES, D. N.; ALMEIDA, A. S.; SOUSA, A. R. O.; PEREIRA, R.; ANDRADE, A. L.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; PINHEIRO, U.; VIDEIRA, P. A.; TEIXEIRA, E.H.; NAGAO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 109, p. 1292-1301, 2018.

MATSUMOTO, R.; FUJII, Y.; KAWSAR, S.M.A.; KANALY, R.A.; YASUMITSU, H.; KOIDE, Y.; HASAN, I.; IWAHARA, C.; OGAWA, Y.; IM, C.H.; SUGAWARA, S.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; OZEKI, Y. Cytotoxicity and Glycan-Binding Properties of an 18 kDa Lectin Isolated from the Marine Sponge *Halichondria okadae*. **Toxins**, [s.l], v. 4, p. 323-338, 2012.

MAXIMO, P.; LOURENÇO, A. Marine Sesterterpenes: An Overview. **Current Organic Chemistry**, [s.l], v. 22, p. 2381-2393, 2018.

MCKENZIE, Valerie J.; KUENEMAN, Jordan G.; HARRIS, Reid N.. Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: insights from food production and medicine. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l], v. 1429, p. 18-30, 2018.

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

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

MENIS, J.; TWELVES, C. Eribulin (Halaven): a new, effective treatment for women with heavily pretreated metastatic breast cancer. **Breast Cancer: Targets Therapy**, v. 3, p. 101-111, 2011.

MILLER, H. C.; WYLIE, J.; DEJEAN, G.; KAKSONEN, A. H.; SUTTON, D.; BRAUN, K.; PUZON, G. J. Reduced Efficiency of Chlorine Disinfection of *Naegleria fowleri* in a Drinking Water Distribution Biofilm. **Environmental Science & Technology**, [s.l], v. 49, p. 11125-11131, 2015.

MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l], v. 56, p. 491-509, 2004.

MIZAN, Md. F.; JAHID, I. K; HA, S. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. **Food Microbiology**, [s.l], v. 49, p. 41-55, 2015.

MISHRA, R.; MIGLANI, R.; KUMAR, K.; PANDA, A. K.; MANDAL, S.; RANA, M.; BISHT, S. S. Current status of microbial lectins in biomedical research. **Recent Advances And Future Perspectives Of Microbial Metabolites**, [s.l], p. 59-79, 2023.

MORA, C. TITTENSOR, D.P.; ADL, S.; SIMPSON, A.G.B., WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **Plos Biology**, [s.l], v. 9, p. 1-8, 2011.

MORI, T.; O'KEEF, B.R.; SOWDER II, R.C.; BRINGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; TURPIN, J.A.; BUCKHEIT JR, R.W.; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R. Isolation and Characterization of Griffithsin, a Novel HIV-inactivating Protein, from the Red Alga *Griffithsia* sp. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l], v. 280, p. 9345-9353, 2004.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M.S.L.L.; DIAS, A. S.F.; MONTEIRO, N. K.V.; RIBEIRO, J. K.C.; MOURA, G. E.D.D.; MACEDO, L. L.P.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l], v. 145, p. 517-523, 2006.

MURAMOTO, K. Lectins as Bioactive Proteins in Foods and Feeds. **Food Science and Technology Research**, [s.l], v. 23, p. 487-494, 2017.

NABETA, H.W.; KOUOKAM, J.C.; LASNIK, A.B.; FUQUA, J.L.; PALMER, K.E. Novel Antifungal Activity of Q-Griffithsin, a Broad-Spectrum Antiviral Lectin. **Journal ASM, Microbiology Spectrum**, [s.l], v. 9, p. 1-20, 2021.

NASCIMENTO-NETO, L.G.; CABRAL, M.G.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, Z.; ARRUDA, F.V.S.; NAGANO, C.S.; FERNANDES, A.R.; SAMPAIO, A.H.; TEIXEIRA, E.H.; VIDEIRA, P.A. Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 18, p. 521-528, 2018.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mannose-specific tetrameric lectin with mitogenic and antibacterial activities from the ovary of a teleost, the cobia (*Rachycentron canadum*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v. 74, p. 433-438, 2007.

NOSANCHUK, J.D.; STARK R.E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Frontiers in Microbiology**, [s.l], v. 6, p. 327-345, 2015.

OGAWA, T.; WATANABE, M.; NAGANUMA, T.; MURAMOTO, K. Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources. **Journal of Amino Acids**, v. 2011, [s.l], p. 1-20, 2011.

O'KEEFE, B.R.; SHENOY, S.R.; XIE, D.; ZHANG, W.; MUSCHIK, J.M.; CURRENS, M.J.; CHAIKEN, I.; BOYD, M.R. Analysis of the interaction between the HIV-inactivating protein cyanovirin-N and soluble forms of the envelope glycoproteins gp120 and gp41. **Molecular Pharmacology**, [s.l], v. 58, p. 982-992, 2000.

ONO, K.; SUZUKI, T. A.; TOYOSHIMA, Y.; SUZUKI, T.; TSUTSUI, S.; ODAKA, T.; MIYADAI, T.; NAKAMURA, O. SJL-1, a C-type lectin, acts as a surface defense molecule in Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Molecular Immunology**, [s.l], v. 97, p. 63-70, 2018.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, [s.l], v. 54, p. 49-79, 2000.

PALUCH, E.; REWAK-SOROCZYŃSKA, J.; JęDRUSIK, I.; MAZURKIEWICZ, E.; JERMAKOW, K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l], v. 104, p. 1871-1881, 2020

PANDEY, P.K.; BHARTI, V.; KUMAR, K. Biofilm in aquaculture production. **African Journal of Microbiology Research**, [s.l], v. 8, p. 1434-1443, 2014.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; ROMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, [s.l], v. 56, p. 264-72, 2013.

PAPENFORT, K. BASSLER, B.L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l], v. 14, p. 576-588, 2016.

PEPI, M; FOCARDI, Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l], v. 18. p. 5723, 2021.

PICHL, C.M.; DUNKL, B.; BRAUNER, B.; GABOR, F.; WIRTH, M.; NEUTSCH, L. Biomimicry of UPEC cytoinvasion: a novel concept for improved drug delivery in UTI. **Pathogens**, [s.l], v. 5, p. 16, 2016.

PREETHAM, E.; RUBEENA, A. S.; VASEEHARAN, B.; CHAURASIA, M. K.; AROCKIARAJ, J.; OLSEN, R. E. Anti-biofilm properties and immunological response of an immune molecule lectin isolated from shrimp *Metapenaeus monoceros*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l], v. 94, p. 896-906, 2019.

PREETHAM, E.; LAKSHMI, S.; WONGPANYA, R.; VASEEHARAN, B.; AROCKIARAJ, J.; OLSEN, R.E. Antibiofilm and immunological properties of lectin purified from shrimp *Penaeus semisulcatus*. **Fish Shellfish Immunology**, [s.l], v. 106, p. 776-782, 2020.

PROCÓPIO, Thamara F.; MOURA, Maiara C.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; GOMES, Francis S.; SANTOS, Nataly D.L.; COELHO, Luana C.B.B.; PONTUAL, Emmanuel V.; PAIVA, Patrícia M.G.; NAPOLEÃO, Thiago H. Antibacterial Lectins: Action Mechanisms, Defensive Roles and Biotechnological Potential. In: COLLINS, Erika. **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. New York: Nova Science Publishers, 2017. Cap. 3, p. 69-89.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. **Applied Microbiology Biotechnology**, Germany, v. 59, 125-134, 2002.

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

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s.l], v. 9, p. 338-352, 2009.

RAMASUBRAMANIAN, V.; PRIYADARISINI, V. B. Aquatic Lectins: biological recognition molecules. **Aquatic Lectins**, [s.l], p. 23-43, 2022.

RATHEESH, S.; REAUF, A.A. Screening of antifungal activity of a lectin isolated from marine sponge *Axinella donnani*. **Trends in Biosciences**, [s.l], v. 11, p. 1174-1176, 2018.

REEN, F.J.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J.A.; PARAGES, M.L.; O'GARA, F. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v. 102, p. 2063-2013, 2018.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G.B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M.M.; TICCHI, A.J.; DIZ, M.S.; CARVALHO, A.O.; DE LA CANAL, L.; GOMES, V.M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**, v. 69, [s.l], p. 88-95, 2014.

REYES, O.I.; GONZÁLEZ, B.; LÓPEZ, I. Uma análise do metabolismo de *Aspergillus niger* crescendo em um substrato sólido. **Revista mexicana de ingeniería química**, [s.l], v. 12, p. 41-56, 2013.

ROMANO, G.; CONSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C.; RUOCCO, N.; IANORA, A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, [s.l], v. 128, p. 58-69, 2017.

ROSSI, E.; PARONI, M.; LANDINI, P. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l], v. 125, p. 1587-1602, 2018.

RUAS, L.P.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy, **Frontiers Microbiology**, [s.l], v. 3, p. 1-6, 2012.

RUBEENA, A.S.; PREETHAM, E. Antimicrobial properties and phenoloxidase activation of the lectin isolated from kadal shrimp (*Metapenaeus dobsoni*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 90, p. 118-125, 2019.

RUOCCO, N.; COSTANTINI, S.; GUARINIELLO, S.; CONSTANTINI, M. Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. **Molecules**, [s.l], v. 21, p. 1-16, 2016.

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

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

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

SANTOS, V. F.; ARAÚJO, A.C.J.; SILVA, A.L.F.; ALMEIDA, D.V.; FREITAS, P.R.; SANTOS, A.L.E.; ROCHA, B.A.M.; GARCIA, W.; LEME, A.M.; BONDAN, E.; BORGES, F.T.; CUTRIM, B.S.; SILVA, L.C.N.; COUTINHO, H.D.M.; TEIXEIRA, C.S. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 146, p. 841-852, 2020.

SCHWARTSMANN, G. Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. **Annals of Oncology**, [s.l], v. 11, 235-243, 2000.

SCHOFFSKI, P.; DUMEZ, H.; WOLTER, P.; STEFAN, C.; WOZNIAK, A.; JIMENO, J.; VAN OOSTEROM, A.T. Clinical impact of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced/metastatic soft tissue sarcoma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s.l], v. 9, p. 1609-1618, 2008.

SHARIFIAN, S.; HOMAELI, A.; KIM, S.K.; SATTARI, M. Production of newfound alkaline phosphatases from marine organisms with potential functions and industrial applications. **Process Biochemistry**, [s.l], v. 64, p. 103-115, 2018.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognize molecules. **Glycobiology**, [s.l], v. 14, p. 53-62, 2004.

SHAW, K.S.; ROSENBERG GOLDSTEIN R.E.; HE, X.; JACOBS, J.M.; CRUMP B.C.; SAPKOTA, A.R. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. **PLoS One**, [s.l], v. 9, p. 89616, 2014.

SILVA, L.N.; ZIMMER, K.R.; MACEDO, A.J. AND TRENTIN, D.S. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical Reviews**, [s.l], v. 116, p. 9162-9236. 2016.

SILVA, R.R.S.; SILVA, C.R.; SANTOS, V.F.; BARBOSA, C.R.S.; MUNIZ, D.F.; SANTOS, A.L.E.; SANTOS, M.H.C.; ROCHA, B.A.M.; BATISTA, K.L.R.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; COUTINHO, H.D.M.; TEIXEIRA, C.S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**, [s.l], v. 135, p. 103629, 2019.

SILVA, N. R. G.; ARAÚJO, F. N. DE. Antibacterial Activity of Plant Lectins: a Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l], v. 64, 2021.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l], v. 43, p. 573-583, 2010.

SINGH, K.; KULKARNI, S. S. Small Carbohydrate Derivatives as Potent Antibiofilm Agents. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 65, p. 8525-8549, 2022.

SIVAKAMAVALLI, J.; PARK, K.; KWAK, I.S.; VASEEHARAN, B. Purification and partial characterization of carbohydrate-recognition protein C-type lectin from *Hemifusus pugilinus*. **Carbohydrate Research**, [s.l], v. 499, p. 108224, 2021.

SLIFKIN, M; DOYLE, R J. Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l], v. 3, n. 3, p. 197-218, 1990.

SONG, X.; MA, Y.; FU, J.; ZHAO, A.; GUO, Z.; MALAKAR, P. K.; PAN, Y.; ZHAO, Y. Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. **Food Control**, [s.l], v. 73, p. 485-491, 2017.

STEWART, P.; FRANKLIN, M. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l], v. 6, p. 199-210, 2008.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, [s.l], v. 56, p. 187-209, 2002.

SUN, Y.D.; FU, L.D.; JIA, Y.P.; DU, X.J.; WANG, Q.; WANG, Y.H.; ZHAO, X.F.; YU, X.Q.; WANG, J.X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular Immunology**, [s.l], v. 45, p. 348-361, 2008.

SWARNA, R. R.; ASADUZZAMAN, A. K. M.; KABIR, S. R.; ARFIN, N.; KAWSAR, S. M. A.; RAJIA, S.; FUJII, Y.; OGAWA, Y.; HIRASHIMA, K.; KOBAYASHI, N. Antiproliferative and Antimicrobial Potentials of a Lectin from *Aplysia kurodai* (Sea Hare) Eggs. **Marine Drugs**, [s.l], v. 19, p. 394, 2021.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; OLIVEIRA, T.M. de; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SOUZA, J.B.; HAVT, A.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l], v. 103, n. 4, p. 1001-1006, 2007.

THAKUR, N.L., THAKUR, A.N., MÜLLER, W.E.G. Marine natural products in drug discovery. **Natural Product Radiance**, [s.l], v. 4, p. 471-477, 2005.

THISSERA, B.; SAYED, A.M.; HASSAN, H.M.; ABDELMOHSEN, U.R.; EBEL, R.; JASPARS, M.; RATEB, M.E. The Hidden Treasure: marine microbiome as repository of bioactive compounds. **The Microbiomes Of Humans, Animals, Plants, And The Environment**, [s.l], p. 693-729, 2022.

TIWARI, V.; SHUKLAA, S.Y.; SHUKLAA, D. A sugar binding protein cyanovirin-N blocks herpes simplex virus type-1 entry and cell fusion. **Antiviral Research**, [s.l], v. 84, p. 67-75, 2009.

TOYODA, M.; YAMAZAKI-INOUE, M.; ITAKURA, Y.; KUNO, A.; OGAWA, T.; YAMADA, M.; AKUTSU, H.; TAKAHASHI, Y.; KANZAKI, S.; NARIMATSU, H.; HIRABAYASHI, J.; UMEZAWA, A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. **Genes to Cells**, [s.l], v. 16, p. 1-11, 2010.

TRA, V.N.; DUBE, D.H. Glycans in pathogenic bacteria – potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents. **Chemical Communications**, [s.l], v. 50, p. 4659-4673, 2014.

TUNKIJJANUKIJ, S.; MIKKELSEN, H.V.; OLAFSEN, J.A. A Heterogeneous Sialic Acid-Binding Lectin with Affinity for Bacterial LPS from Horse Mussel (*Modiolus modiolus*) Hemolymph. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l], v. 117, p. 273-286, 1997.

TUNKIJJANUKIJ, S.; OLAFSEN, J.A. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l], v. 22, p. 139-50, 1998.

VASCONCELOS, M.A. **Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 2013. 267p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; SILVA, H.C.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.; TEIXEIRA, E.H.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M.O. Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **BioMed Research International**, [s.l], v.2014, p.9, 2014.

VASTA, G.R.; AHMED, H.; FINK, N.E.; ELOLA, M.T.; MARSH, A.G.; SNOWDEN, A.; ODOM, E.W. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 712, p. 55–73, 1994.

VENHATESAN, J.; ANIL, S.; KIM, S.K.; SHIM, M.S. Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review. **Marine Drugs**, [s.l], v. 15, p. 1-18, 2017.

WANG, Hui; XUE, Zhuang; LIU, Zhaoqun; WANG, Weilin; WANG, Feifei; WANG, Ying; WANG, Lingling; SONG, Linsheng. A novel C-type lectin from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (AjCTL-2) with preferential binding of d-galactose. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 79, p. 218-227, 2018.

WANG, D.; FLINT, S. H.; PALMER, J. S.; GAGIC, D.; FLETCHER, G. C.; ON, S. L.W. Global expansion of *Vibrio parahaemolyticus* threatens the seafood industry: perspective on controlling its biofilm formation. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, [s.l], v. 158, p. 113182, 2022.

WEI, J.; XU, D.; ZHOU, J.; CUI, H.; YAN, Y.; OUYANG, Z.; GONG, J.; HUANG, Y.; HUANG, X.; QIN, Q. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (Ec-CTL) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 28, p. 178-186, 2010.

WESENER, D.A.; DUGAN, A.; KIESSLING, L.L. Recognition of microbial glycans by soluble human lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l], v. 44, p. 168-178, 2017.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S.P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature**, [s.l], v. 551, p. 313-320, 2017.

WIETZ, M.; HALL, M.R.; HØJ, L. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. **Systematic And Applied Microbiology**, [s.l], v. 32, p. 266-277, 2009.

WILSON, R.; CHEN, C.; RATCLIFFE, N. A.. Innate Immunity in Insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. **The Journal of Immunology**, [s.l], v. 162, p. 1590-1596, 1999.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [s.l], v. 214, p. 417-423, 2011.

WOHLSCHLAGER, T.; BUTSCHI, A.; GRASSI, P.; SUTOV, G.; GAUSS, R.; HAUCK, D.; SCHMIEDER, S.; KNOBEL, M.; TITZ, A.; DELL, A.; HASLAM, S.M.; HENGARTNER, M.O.; AEBI, M.; M. KUNZLER. Methylated glycans as conserved targets of animal and fungal innate defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l], v. 111, 2014.

WU, J.; WANG, J.; WANG, S.; RAO, P. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* Billb. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 89 p. 717-724, 2016.

XIA, J.H., LIN, G., FU, G.H.; WAN, Z.Y.; LEE, M.; WANG, L.; LIU, X.J.; YUE, G.H. The intestinal microbiome of fish under starvation. **BMC Genomics**, [s.l], v.15, p.266, 2014.

XUE, Z.; PANG, Y. LIU, X.; ZHENG, Z.; XIAO, R.; JIN, M.; HAN, Y.; SU, P.; LV, L.; WANG, J.; LI, Q. First evidence of protein G-binding protein in the most primitive vertebrate: Serum lectin from lamprey (*Lampetra japonica*). **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l], v. 41, p. 618-630, 2013.

XIN, Z; YU, D.; YANG, B.; CHEN, L.; HAYOUKA, Z.; CHEN, X.; GONG, Y.; DAI, H.; WANG, L.; ZHAO, Y. Molecular characterization, expression and immune functions of two C-type lectin from *Venerupis philippinarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 107, p. 260-268, 2020.

YAN, Q.; JIANG, Z.; YANG, S.; DENG, W.; HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l], v. 442 p. 72-81, 2005.

YILDIZ, F.H.; VISICK, K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so diferente. **Trends Microbiology**, [s.l], v. 17, p. 109-118, 2009.

YU, M.; ZHOU, S.; DING, Y.; GUO, H.; LI, Y.; HUANG, Q.; ZHENG, X.; XIU, Y. Molecular characterization and functional study of a tandem-repeat Galectin-9 from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 112, p. 23–30, 2021.

ZAPOROZHETS, S.T.; BESEDNOVA, N. Biologically active compounds from marine organisms in the strategies for combating coronaviruses. **AIMS Microbiology**, [s.l], v. 6, p. 470–494, 2020.

ZHANG, X.W.; MAN, X.; HUANG, X.; WANG, Y.; SONG, Q.S.; K.M. HUI, H.W.
ZHANG, Identification of a C-type lectin possessing both antibacterial and antiviral activities from red swamp crayfish. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 77, p. 22–30, 2018.

ZHANG, C; XUE, Z; YU, Z; WANG, H; LIU, Y; LI, H; WANG, L; LI, C; SONG, L. A tandem-repeat galectin-1 from *Apostichopus japonicus* with broad PAMP recognition pattern and antibacterial activity. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l], v. 99, p. 167-175, 2020.

ZHANG, X.W.; YANG, C.H.; ZHANG, H.Q.; PAN, X.T.; JIN, Z.Y.; ZHANG, H.W.; XIA, X.H. A C-type lectin with antibacterial activity in weather loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Journal Of Fish Diseases**, [s.l], v. 43, p. 1531-1539, 2020.

ZHAO, Q; WANG, H; WANG, W; LI, J; LIU, Y; XUE, Z; LIU, Z; WANG, L; SONG, L. A C-type lectin (AjS JL-1) containing DPN/WVD motifs in *Apostichopus japonicus* recognizes multiple microbes. **Invertebrate Survival Journal**, [s.l], v. 18, p. 86-97, 2021.