



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

DAYARA NORMANDO MARQUES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILME BACTERIANO DE UMA LECTINA PRESENTE NA ESPONJA
MARINHA *Chondrilla caribensis*.**

FORTALEZA

2017

DAYARA NORMANDO MARQUES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILME BACTERIANO DE UMA LECTINA PRESENTE NA ESPONJA MARINHA
Chondrilla caribensis.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Orientador: Dr. Alexandre Holanda Sampaio

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M316p Marques, Dayara Normando.

Purificação, caracterização bioquímica e efeito na inibição de biofilme bacteriano de uma lectina presente na esponja marinha *Chodrilla caribensis* / Dayara Normando Marques. – 2017.

54 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

1. Lectina. 2. Esponja Marinha . 3. Biofilme. I. Título.

CDD 639.2

DAYARA NORMANDO MARQUES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E EFEITO NA INIBIÇÃO DE
BIOFILME BACTERIANO DE UMA LECTINA PRESENTE NA ESPONJA MARINHA
Chondrilla caribensis.

Dissertação de mestrado submetida à
coordenação do Curso de Pós Graduação em
Engenharia de Pesca da Universidade Federal
do Ceará como requisito para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dr. Mayron Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que me sustentou até aqui.
Aos meus amados pais Saraiva e
Lucimar.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu amor e bênçãos sobre a minha vida, foi Ele que me deu força e sabedoria para alcançar os meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Alexandre Holanda Sampaio pela confiança, ensinamentos e apoio e por sempre acreditar que eu seria capaz de realizar esse trabalho, todas as vezes que precisei sempre me ajudou. Muito obrigada.

Ao professor Dr. Celso Shiniti Nagano, por disponibilizar o seu tempo para me auxiliar na realização desse trabalho. Sendo mais que um co-orientador, é um grande amigo que levarei por toda a minha vida. Obrigada por todo ensinamento. Você um excelente profissional e pesquisador.

Ao professor MSc. Rômulo Farias, por me auxiliar na elaboração dessa pesquisa. Não tenho palavras para agradecer por toda dedicação em me ensinar todos os processos necessários para que esse trabalho fosse realizado. Você foi fundamental. Muito obrigada por tudo.

À minha família, por tudo que fizeram por mim, sempre me dando força e auxílio para a realização dos meus sonhos. Obrigada pela paciência e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

Ao meu amor, Thiago Mendonça, por todo amor e carinho. Sempre que precisei esteve ao meu lado me dando apoio e deixando os meus dias mais felizes. Você faz parte desta minha conquista. Amo você.

As minhas companheiras de mestrado Alexandra Sampaio de Almeida e Karolina Costa, por todo o companheirismo. Com vocês meus dias foram melhores. Obrigada por toda ajuda, vocês foram fundamentais nesse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante a realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório – BIOMAR: em especial aos amigos que me ajudaram muito, na construção desse projeto: Suzete Roberta, Winne Melo, Jerffeson Saboya, Andre, Renato e Túlio. Muito obrigada por todos os conselhos e ajudas.

“Melhor é adquirir sabedoria que ouro precioso; e adquirir inteligência vale mais que a prata”

Provérbios 16; 16.

Bíblia Sagrada

RESUMO

As esponjas estão incluídas no filo Porífera, são animais sésseis, filtradores e multicelulares. Elas possuem um grande potencial biotecnológico e farmacológico. Vários compostos têm sido descobertos nesses animais, tais como metabolitos com atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana, atividade antitumoral, atividade anti-incrustante, atividade citotóxica e lectinas. As lectinas podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente aos carboidratos e são capazes de aglutinar eritrócitos e outros tipos de células e/ou precipitar polissacarídeos. As esponjas marinhas são consideradas uma rica fonte de lectinas, com grande potencial biotecnológico. Dessa forma, objetivo do presente trabalho foi purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o efeito na inibição do biofilme bacteriano de uma lectina isolada na esponja marinha *Chodrilla caribensis* do litoral do Ceará. CCL (*Chodrilla caribensis lectin*) foi purificada a partir da combinação de cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. A nova lectina é uma glicoproteína, com um teor de 5,2% de carboidratos e com um tamanho de aproximadamente 15 kDa. CCL apresentou afinidade por lactose, sua atividade foi melhor em pH na faixa neutro-alkalina e a perdeu sua atividade completamente quando aquecida a 100°C. A estrutura teórica secundária de CCL consistiu em 10,4% de α hélice, 73,4% de estrutura β e 16,2 % de região desestruturada. Além disso, a CCL foi cristalizada, através do ensaio preliminar de cristalização. A proteína foi altamente tóxica contra náuplios de *Artemia* sp., apresentando um $LC_{50} = 6,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi eficaz na inibição da formação de biofilme das bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em relação ao número de células viáveis, CCL foi eficaz no tratamento com *S. epidermidis*, em todas as concentrações.

Palavras-Chave: Lectina. Esponja marinha. Biofilme.

ABSTRACT

The sponges are included in the phylum Porifera, are sessile, filtering and multicellular animals. They have great biotechnological and pharmacological potential. Several compounds have been discovered in these animals, such as metabolites with anti-inflammatory activity, antimicrobial activity, antitumor activity, antifouling activity, cytotoxic activity and lectin. Lectins can be defined as proteins or glycoproteins that bind reversibly to carbohydrates and are capable of binding erythrocytes and other cell types and / or precipitating polysaccharides. Marine sponges are considered a rich source of lectins, with great biotechnological potential. Thus, the objective of the present work was to purify, characterize biochemically and evaluate the effect on bacterial biofilm inhibition of an isolated lectin in the marine sponge *Chodrilla caribensis* from the coast of Ceará. CCL (*Chodrilla caribensis* lectin) was purified from the combination of ion exchange chromatography and affinity chromatography. The new lectin is a glycoprotein, with a content of 5.2% carbohydrate and a size of approximately 15 kDa. CCL showed affinity for lactose, its activity was better at pH in the neutral-alkaline range and the protein only lost its activity completely when heated to 100 ° C. The theoretical secondary structure of CCL consisted of 10.4% of α -helix, 73.4% of β -structure and 16.2% of unstructured region. In addition, the CCL was crystallized through the preliminary crystallization test. The protein was highly toxic against *Artemia* sp. Nauplii, presenting an LC 50 = 6.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and was effective in inhibiting the biofilm formation of Gram-positive bacteria, *S. aureus* and *S. epidermidis*. Regarding the number of viable cells, CCL was effective only in treatment with *S. epidermidis*, at all concentrations.

Keywords: Lectin. Sponge. Biofilm.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 -	<i>Chondrilla caribensis</i>	13
Figura 2 -	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.....	29
Figura 3 -	Cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar.....	30
Figura 4 -	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante.....	33
Figura 5 -	Efeito do pH na atividade hemaglutinante da CCL.....	33
Figura 6 -	SDS-PAGE em condições reduzido e não reduzido.....	34
Figura 7 -	Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular	35
Figura 8 -	Espectro de massas ESI-MS deconvoluido de CCL.....	35
Figura 9 -	Espectros de Dicroísmo circular - UV de CCL em diferentes temperaturas.....	37
Figura 10 -	Espectros de Dicroísmo circular - UV de CCL em diferentes pH....	38
Figura 11 -	Cristal da CCL.....	38
Figura 12 -	Formação de biofilme de <i>S.epidermidis</i> na presença da CCL.....	40
Figura 13 -	Formação de biofilme de <i>E. coli</i> na presença da CCL.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sumário de purificação da CCL.....	30
Tabela 2 -	Atividade hemaglutinante da CCL frente a diferentes eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas (U.H./mL).....	31
Tabela 3 -	Inibição da atividade hemaglutinante da CCL por açúcares e glicoproteínas.....	32
Tabela 4 -	Sequência de aminoácidos dos peptídeos de CCL determinados por MS/M.....	36
Tabela 5 -	Ensaio de letalidade sobre nauplios de <i>Artêmia</i> sp.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Esponjas.....	13
1.2	Lectinas.....	14
1.2.1	<i>Lectinas de Animais</i>	15
1.2.2	<i>Lectinas de Invertebrados</i>	16
1.2.3	<i>Lectinas de Esponjas</i>	17
1.3	Lectina do gênero <i>Chondrilla</i>	18
2	OBJETIVOS.....	19
3	METODOLOGIA.....	20
3.1	Coleta dos animais.....	20
3.2	Extração da proteína	20
3.3	Preparação dos eritrócitos e atividade hemaglutinante / hemolítica.....	20
3.4	Inibição da Atividade Hemaglutinante	21
3.6	Purificação da proteína	21
3.7	Caracterização físico química.....	22
3.8	Eletroforese e estimativa da massa molecular	23
3.9	Estimativa da massa molecular nativa.....	23
3.10	Determinação da massa molecular por espectrometria de massas	23
3.11	Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial	24
3.12	Dicroísmo circular	25
3.13	Teste de pré-cristalização da lectina.....	26
3.14	Ensaio de letalidade sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp	26
3.15	Inibição da formação de biofilme.....	26
4	RESULTADOS	29

4.1	Purificação da lectina.....	29
4.2	Atividade hemaglutinante.....	31
4.3	Inibição da atividade hemaglutinante	31
4.4	Caracterização físico química.....	32
4.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular	34
4.6	Estimativa da massa molecular nativa	34
4.7	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa.....	35
4.8	Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial	36
4.9	Dicroísmo circular	36
4.10	Cristalização da CCL.....	38
4.11	Ensaio de letalidade sobre náuplios de Artemia sp	39
4.12	Inibição da formação de biofilme	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

No filo Porífera estão incluídas as esponjas, que são animais sésseis, filtradores e multicelulares. Elas utilizam células flageladas para circular água por um sistema de canais exclusivo desse grupo, chamadas de conócitos. O filo Porífera é dividido em três classes: Calcarea, Hexactinellida e Demospongiae (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

A classe Demospongiae contém 90% das espécies descritas. As espécies pertencentes a essa classe possuem esqueletos de espícula silicosas ou espongina. São encontradas espécies marinhas e de água doce. Essa classe possui três subclasses: homoscleromorpha, tetractinomorpha e ceractinomorpha (RUPPERT; BARNES, 2005).

Na subclasse tetractinomorpha está incluída a família Chondrillidae. Essa família é caracterizada por apresentar esponjas sem estruturas globulares e possui quatro gêneros válidos *Chondrosia*, *Chondrilla*, *Thymosia* e *Thymosiopsis* (GRAY, 1872; IMMANUEL *et al.*, 2015).

O gênero *Chondrilla* é caracterizado por apresentar esponjas com consistência de borracha e coloração variada, podendo apresentar ou não espículas (GRAY, 1872).

A *Chondrilla caribensis* (Figura 1) é uma esponja em forma amorfa, possui a superfície lisa e pode apresentar uma coloração marron escuro ou amarelo esverdeado. Ela é distribuída no atlântico ocidental tropical e subtropical, podendo ser encontrada em manguezais e recife de corais (RUTZLER; DURAN; PIANTONI, 2007).

Figura 1 - *Chondrilla caribensis*.



Fonte: RUTZLER; DURAN; PIANTONI, 2007

Atualmente, as esponjas tem se tornado um grande potencial biotecnológico e farmacológico (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Vários compostos farmacológicos têm sido descobertos nesses animais, tais como metabolitos com atividade anti-inflamatória (KEYZERS; DAVIES-COLEMAN, 2005), atividade antimicrobiana (LAPORT; SANTOS; MURICY, 2009), atividade antitumoral (DEMBITSKY; GLORIOZOVA; POROIKOV, 2005), atividade anti-incrustante (LIMNA MOL; RAVEENDRAN; PARAMESWARAN, 2009), atividade citotóxica (SINGH; ALAGUMUTHU, 2013) e lectinas (DRESCH *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2010).

1.2 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente aos carboidratos e são capazes de aglutinar eritrócitos e outros tipos de células e/ou precipitar polissacarídeos e sua existência é conhecida desde o século XIX (KILPATRICK, 2002). Inicialmente essas proteínas eram denominadas de fitohemaglutininas ou fitoaglutininas por serem encontradas em extrato de plantas. Porém, ao longo dos anos essas proteínas foram encontradas em outros organismos, tais como, algas, fungos, animais e vírus (SHARON; LIS, 1972; SAMPAIO *et al.*, 1998). A especificidade de uma lectina é sempre determinada pelo tipo de carboidratos a qual ela se liga (MARQUES; BARRACCO, 2000).

A primeira descrição de uma hemaglutinina foi em 1888, quando Peter Hermann Stillmark em sua tese de doutorado encontrou uma fração aglutinante a partir de extratos de sementes de ricino (*Ricinus communis*) e posteriormente nomeado ricina (SHARON; LIS, 2004).

Em 1936, Sumner e Howell observaram que uma hemaglutinina do feijão-de-porco, posteriormente denominada de concanavalina A (ConA), aglutinava células, tais como eritrócitos e leveduras e também precipitava glicogênio a partir de solução. Esses autores também mostraram que a hemaglutinação induzida pela ConA foi inibida por sacarose demonstrando pela primeira vez a especificidade de lectinas por açúcares (SHARON; LIS, 2004).

Boyd e Reguera, em 1940, descobriram que as hemaglutininas tinha uma especificidade por eritrócitos humano do tipo O (SHARON; LIS, 2004). A partir daí, a descoberta da capacidade dessas proteínas de distinguir eritrócitos de diferentes tipos

sanguíneos levou Boyd e Shapleigh, em 1954, propor o termo lectinas (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) para denominar tais proteínas (BOYD; SHAPLEIGH, 1954; SHARON; LIS, 1972).

As lectinas ganharam atenção científica após a década 1960, quando ocorreram duas descobertas marcantes. A primeira descoberta foi do Peter C. Nowell que observou que a lectina do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris agglutinin* – PHA), apresentava capacidade de estimular linfócitos a entrarem em mitose, tal descoberta teve um grande impacto na imunologia, pois contrariou a idéia de que os linfócitos são células incapazes de se dividir ou de se diferenciar (NOWELL, 1960). A segunda descoberta foi feita por Joseph Aub, que percebeu que a lectina do gérmen do trigo (*wheat germ agglutinin* – WGA) mostrou uma capacidade de aglutinar células malignas (AUB *et al.*, 1965).

Em 1965, foi introduzida a cromatografia de afinidade, uma técnica que facilitava o isolamento das lectinas. Essa metodologia conduziu a um rápido aumento no número destas proteínas purificadas (SHARON, 2008).

A partir daí, essas proteínas vem sendo alvo de estudos como modelo nos estudos de interação proteína-carboidrato e/ou ferramentas bioquímicas.

1.2.1 Lectinas de Animais

Weir Mitchell foi o primeiro pesquisador a observar atividade lectinica em animais em 1860, através de um estudo realizado com veneno de cobra (KILPATRICK, 2002). Porém, a primeira lectina isolada de um animal ocorreu em 1952, quando Watkins e Morgan isolaram uma lectina de uma enguia e que era especifica a L-fucose. Nos anos posteriores, foi isolado a lectina do caranguejo-ferradura (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968) e do caracol (HAMMARSTROM; KABAT, 1969).

Os estudos em lectinas de animais aumentou após a constatação de que essas lectinas agem como mediadores de reconhecimento celular em sistemas biológicos (VASTA; AHMED, 2008). Em geral, essas lectinas apresentam diversas funções, tais como encaminhamento intracelular de glicoproteínas, chaperonas moleculares durante a síntese de glicoproteínas, dentre outras (KILPATRICK, 2002). Segundo esse mesmo autor, a função principal das lectinas de animais é atuar como moléculas de reconhecimento dentro do sistema imunológico, e este papel podem ser subdivididos em quatro categorias; a defesa

direta, reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico, regulação imune, e prevenção da auto-imunidade. (KILPATRICK, 2002).

1.2.2 Lectinas de Invertebrados

O primeiro relato de uma aglutinina em invertebrados foi realizado por Noguchi (1903), que encontrou uma aglutinina em uma caraguejo-ferradura *Limulus polyphemus* (GARTE; RISSELL, 1976). No entanto, o isolamento e a caracterização da lectina do caraguejo-ferradura, só ocorreu em 1968 pelos autores Marchalonis e Edelman. A partir deste trabalho, novas hemaglutininas de invertebrados foram isoladas e caracterizadas. Um ano depois, Hammarstromt e Kabat (1969) purificaram e caracterizaram uma hemaglutinina do caracol *Helix pomatia*.

Atualmente, diversos pesquisadores vêm isolando e caracterizando lectinas de invertebrados e descrevendo o potencial biotecnológico dessas proteínas. Xiong *et al.*, (2005), encontraram uma lectina na esponja *Craniella australiensis*, que possui atividade mitogênica. Em 2006, Moura e colaboradores estudando a esponja *Cliona varians* encontraram uma lectina que apresentou toxicidade contra bactérias e promastigota de *Leishmania*. Já Queiroz *et al.*, (2008), evidenciou atividade pró-inflamatória na lectina extraída dessa mesma esponja.

As lectinas também são encontradas em vermes marinhos e possuem um grande potencial farmacológico. Porém, existem poucos dados sobre essas proteínas oriundas dos vermes marinhos. Garte e Rissell (1976), isolaram, purificaram e caracterizaram uma hemaglutinina de um poliqueta, *Amphitrite ornata*. A primeira lectina de um poliqueta. Molchanova *et al.*, (2007), isolaram uma lectina de um poliqueta marinho, *Vermicularis serpula*, que possui atividade anti-HIV, na qual essa lectina pode inibir o efeito citopático induzida pelo vírus HIV-1 e a replicação do vírus nas células hospedeiras. As lectinas podem estar relacionadas com os mecanismos de defesa dos invertebrados, como a atividade fagocitária e aglutinação de células. A capacidade dessas proteínas de se ligarem a carboidratos, faz delas participantes na resposta imune por indução de aglutinação bacteriana, ou como opsoninas, realçando as taxas de fagocitose de microrganismos por hemócitos (ALPUCHE *et al.*, 2005). Em algumas espécies de crustáceos, após um desafio infeccioso, as lectinas armazenadas nos hemócitos são liberadas para o espaço extracelular (ALPUCHE *et al.*, 2005).

1.2.3 Lectinas de Esponjas

As esponjas possuem uma grande capacidade de sintetizar moléculas que participam na defesa, comunicação ou adaptação ao ambiente. Essa característica faz delas um grande potencial farmacológico e biotecnológico (GARDÈRES *et al.*, 2015). As proteínas estão bastante envolvidas nesses mecanismos nas esponjas, entre elas estão as lectinas. As esponjas marinhas são consideradas uma rica fonte de lectinas, com grande potencial biotecnológico. Atualmente, já foram isoladas 41 lectinas de esponjas (GARDÈRES *et al.*, 2015; GARDERES *et al.*, 2016; CARNEIRO *et al.*, 2017).

Os estudos sobre lectinas de esponjas começaram quando Dodd *et al.* (1968) descreveram a presença de lectinas nas espécies *Cliona celata* e *Axinella* sp.

No entanto, somente em 1976 foi quando Bretting e Kabat isolaram e purificaram a primeira lectina a partir da esponja *Axinella polypoides* (BRETTEING; KABAT, 1976). As lectinas de esponjas geralmente estão incluídas nas famílias galectinas (lectinas do tipo S), lectinas do tipo C, lectinas do tipo F ou Tachylectinas (GARDÈRES *et al.*, 2015)

A família das lectinas do tipo S possui uma seletividade aos resíduos de galactosídeos. Elas estão restritas ao reino animal. De acordo com a sua estrutura, essa família é classificada em 3 grupos: prototipo, quimera e tipo tandem (HIRABAYASHI *et al.*, 2002; GARDÈRES *et al.*, 2015). As galectinas apresentam papéis importante contra o câncer, elas contribuem para a transformação neoplásica, sobrevivência de células tumorais, angiogênese e metástases tumorais, e podem modular as respostas imunes e inflamatórias (FU-TONG; RABINOVICH, 2005).

A superfamília de proteínas contendo domínios lectínico do tipo C (CTLDs) está difundida em bactérias, plantas e animais. Segundo Zelensky e Gready 2005, a estrutura do CTLD tem um loop duplo característico, estabilizado por duas pontes de sulfeto altamente conservadas localizadas nas bases dos loops, bem como um conjunto de interações hidrofóbicas e polares conservadas. A atividade de ligação de carboidrato dessas lectinas era medida por uma região chamada de "domínio de reconhecimento de carboidratos" (CRD) - que estava presente em todos os Ca^{2+} dependentes, mas não em outros tipos de lectinas animais. Com aumento dos estudos relacionados ao sequenciamento protéico ficou claro que nem todas as proteínas que contêm os resíduos chaves e o padrão estrutural conservado de lectinas do tipo C são capazes de ligar-se a Ca^{2+} (ZELENSKY; GREARY 2005).

As Tachylectinas são proteínas com seis domínios repetidos. Essas proteínas geralmente apresentam atividade antimicrobiana contra procariontes, isso ocorre devido a sua habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos (KILPATRICK, 2002; SCHRÖDER *et al.*, 2003).

As lectinas do tipo F são uma família recente e são encontradas em vertebrados ectotérmicos, protocordadas e invertebradas. Essa família é caracterizada por possuir um domínio de reconhecimento a carboidratos e são ligantes a fucose. O Ca^{2+} desempenha uma função na estabilização da proteína (VASTA, 2012).

Entre as atividades biológicas das lectinas purificadas de esponjas marinhas podemos citar o efeito quimiotático de neutrófilos em ratos *in vitro* da lectina ACL-I de *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008) o efeito mitogênico e citotóxico da lectina ACL-II de *A. corrugata* (DRESCH *et al.*, 2012). Outra atividade biológica de destaque é a anticâncer, como a apresentada pela lectina de *Haliclona cratera* contra células HeLa (estirpe de laboratório-cultivadas de um câncer do colo do útero humano) e células FemX (estirpe de laboratório de cultura de um melanoma humano) utilizando o MTT. Segundo os autores, uma concentração de lectina da *Haliclona cratera* de $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células HeLa e FemX, respectivamente, levou a uma diminuição de 50% (IC_{50}) na sobrevivência de células (PAJIC *et al.*, 2002). O efeito sobre nauplios de *Artemia* sp. da lectina H-1 purificada da esponja marinha *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013). Recentemente um estudo descreveu sobre uma lectina, ALL, isolada da esponja marinha *Aplysina lactuca*, que foi capaz de reduziu significativamente a biomassa dos biofilmes bacterianos e também afetou o número de células viáveis das bactérias *S. aureus* e *E.coli* em todas as concentrações testadas (CARNEIRO *et al.*, 2017b).

1.3 Lectina do gênero Chondrilla

Há apenas um único relato de uma lectina isolada do gênero *Chondrilla*. Em 1990, Schröder e colaboradores relataram a presença de uma lectina na esponja *Chondrilla nucula*, coletada em Kotor, Montenegro. Os autores isolaram e caracterizaram a lectina CN, e descreveram o efeito mitogênico apresentado pela lectina. Outra característica relevante dessa lectina é a capacidade de provocar um retardamento da liberação do vírus HIV (SCHRÖDER *et al.*, 1990).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar atividade biológica de uma nova lectina de *Chondrilla caribensis*

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Isolar uma nova lectina presente no extrato aquoso de *C. caribensis* do litoral do Ceará.

2.2.2 Caracterizar físico quimicamente a lectina isolada.

2.2.3 Caracterizar a estrutura secundária da lectina isolada da esponja *Chondrilla caribensis*.

2.2.4 Avaliar o efeito citotóxico da lectina sobre náuplios de *Artemia* sp.

2.2.5 Analisar o efeito inibitório da lectina sobre biofilmes bacterianos.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

Espécimes de *Chondrilla caribensis* foram coletados em zonas de recifes de arenito na praia de Paracurú, município de Paracurú, Ceará, a aproximadamente 80 km de Fortaleza. Os animais foram colocados em recipientes contendo água do mar a 4°C para o transporte até o laboratório. O material coletado foi lavado com água corrente e congelado a -20 °C, liofilizados e macerados até a obtenção de um fino pó.

3.2 Extração da proteína

Para a extração, o pó de *C. caribensis* foi homogeneizada em tampão Tris -HCl 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM (TBS), na proporção de 1:20 (p/v). O extrato foi agitado em um agitador magnético por 2 h. Em seguida, foi centrifugado a 9000 x g por 20 min a 4°C, e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi armazenado a -20°C.

3.3 Preparação dos eritrócitos e atividade hemaglutinante / hemolítica

Os eritrócitos humanos (A, B e O) foram obtidos do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce), e os eritrócitos de coelho foram obtidos de animais adultos, mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

A partir dos diversos tipos de sangue foram preparadas suspensões de eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína). Primeiramente os eritrócitos foram suspenso em solução salina (NaCl 0,5) e lavados 6 vezes por centrifugação a 5000 x g a 4 min., em seguida foram preparadas suspensões a 3% (v/v) em NaCl 0,15 M. Para a preparação dos eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas, as hemácias foram incubadas separadamente com tripsina e papaína (10 µg.mL⁻¹) por 1 hora, a 37 °C, lavadas 6 vezes com NaCl 150 mM e finalmente, resuspensas de modo a obter uma concentração final de eritrócitos a 3% (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de microtitulação de fundo V, na qual foi usando o método de dupla diluição seriada. Inicialmente foi adicionada

50 μL de TBS, 50 μL da lectina, onde foi diluído serialmente e finalmente, foi adicionado 50 μL de eritrócitos a 3% em cada poço. As placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente. Passado esse tempo de incubação, a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente. Os resultados foram expressos em Unidades de Hemaglutinação por mL ($\text{UH}\cdot\text{mL}^{-1}$) que é o inverso da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação visível.

A atividade hemolítica foi examinada por exame visual da lise dos eritrócitos em condições semelhantes às do ensaio de hemaglutinação.

3.4 Inibição da Atividade Hemaglutinante

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi conduzido segundo o método estabelecido por Sampaio e colaboradores (1998). Para tal, foram usados os seguintes carboidratos e glicoproteínas: 4-Nitrofenil- β -galactosídeo, 4-Nitrofenil- α -galactosídeo, α -Nitrofenil- β -galactosídeo, β -metil-D-galactopiranosídeo, α -metil-galactosídeo, α -metil-galactopiranosídeo, α -lactose, β -lactose, L-fucose, L- raminose, L- arabinose, lactose, galactose, ácido galacturônico, manose, glucosamina, β -metil tiogalactose, galactosamina, glicose, raffinose, frutose, D-galactose, N-Acetil-D-glicosamina (GlcNAc), N-Acetil-D-galactosamina (GalNAc), ribose, mucina de estomago de porco (PSM), maltose, sacarose, melibiose.

Os testes foram realizados em placas de microtitulação de fundo V, onde 25 μL de lectina contendo 4 UH foram adicionados a 25 μL da solução de inibidores diluídos serialmente, sendo então incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 50 μL de eritrócitos a 3% a cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como a concentração mínima de carboidratos ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina.

3.6 Purificação da proteína

Para a purificação da lectina, o extrato bruto foi descongelado e centrifugado. Em seguida, o extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio, em frações 0-60 e 60-90, essas frações foram mantidas em repouso por quatro horas em temperatura ambiente. Após esse período, foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em TBS. A fração que

apresentou maior atividade hemaglutinante foi dializada e utilizada posteriormente para a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.

A fração oriunda da precipitação com sulfato de amônia foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel previamente equilibrada com Tris 20mM pH 8. A cromatografia foi conduzida a fluxo de de 1 mL.min⁻¹ e frações de 2,5 mL foram coletadas. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. As frações retida na coluna foram eluidas com NaCl 0,5 M e posteriormente submetidas a uma cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar.

Como passo final de purificação, o material coletado na cromatografia de troca iônica foi carregado em matriz cromatográfica goma de guar previamente equilibrada com TBS. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e frações de 2,5 mL foram coleadas. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lava com tampão de equilíbrio ate que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. O material retido na coluna foi eluido com lactose 0,2 M. As frações coletadas foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para posterior uso.

Todas as frações foram quantificadas quanto a concentração de proteínas totais solúveis segundo o método de Bradford (Bradford, 1976).

3.7 Caracterização físico química

O efeito de íons metálicos na atividade hemaglutinante foi avaliado através da solubilização da lectina em NaCl 0,15 M (1 mg.mL⁻¹) e serialmente diluída no tampão Tris 50 mM, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M e EDTA 100 mM (TBS/EDTA). Após 1 h de incubação, a atividade hemaglutinante foi determinada.

Para observar o efeito da temperatura sobre a lectina, a solução da lectina, solubilizada em TBS, foi aquecida a diversas temperaturas (25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C) pelo período de 1 hora e posteriormente, a atividade hemaglutinante foi testada.

Para avaliar o efeito do pH, a lectina foi solubilizada em NaCl 150 mM, centrifugada e o sobrenadante foi serialmente diluído em diferentes tampões variando o pH (acetato de sódio 100mM, pH 4,0-5,0, citrato de sódio 100mM, pH 6,0, tris-HCl 100mM, pH

7,0-8,0 e glicina 100 mM, pH 9,0-10,0). Após incubação por 1 h, a atividade hemaglutinante foi determinada.

O teor de carboidratos da lectina foi quantificado segundo o método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), lactose foi utilizada como padrão.

3.8 Eletroforese e estimativa da massa molecular

A massa molecular aparente foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado com azul de Coomassie Blue Brillant R-250 segundo descrito por Laemmli (1970), na presença e na ausência β -mercaptoetanol. O gel utilizado (12%) foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1 h.

A massa molecular aparente da lectina (denominada CCL) foi estimada mediante comparação da migração da lectina com os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97.000 Da), BSA (66.000 Da), ovalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da), ovomucóide (21.000 Da) e ribonuclease (13.700 Da).

3.9 Estimativa da massa molecular nativa

A massa molecular nativa foi estimada por cromatografia de gel filtração em coluna Biosuite™ 250 HR SEC (0,78 x 30cm, tamanho de partícula 5 μ m) acoplada a um sistema Acquity UPLC™ (Waters Corp.), a um fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi equilibrada com TBS/Ca pH 7,6, e o tempo de eluição da lectina foi determinado de acordo com a comparação com os seguintes padrões: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e lisozima (14,3 kDa).

3.10 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas

A massa molecular da lectina foi determinada através de espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa híbrido (Synapt HDMS, Waters Corp.). A solução lectínica foi solubilizada a uma concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ em solução de ácido fórmico (AF) 0,1% e acetonitrila (ACN) 5% onde foi infundida no sistema com um fluxo de 1 μ L.min⁻¹ e os dados foram adquiridos com o auxílio do software Mass Lynx 4.1.

O espectrômetro operou a uma voltagem de capilar de 3 kV e 40 V de voltagem no cone. A temperatura da fonte foi mantida em 373 K e o gás de dessolvatação utilizado foi o nitrogênio (fluxo de 150 L.h⁻¹). A aquisição dos dados foram realizada na faixa de 500 a 3500 m/z a 2 scan.s⁻¹, com o auxílio do programa Mass Lynx 4.1.

O equipamento foi calibrado com os fragmentos do íon de [Glu1] fibrinopeptídeo B. Os espectros de massas deconvoluídos foram obtidos por maximização da entropia usando a ferramenta Max Ent1.

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

Primeiramente, foi realizada uma eletroforese (SDS-PAGE) conforme descrito no item 3.8. As bandas de CCL excisadas do gel com o auxílio de uma ponteira e transferidas separadamente para tubos de centrifugação do tipo eppendorf. As bandas protéicas foram descoradas com 25 mM de bicarbonato de amônio/ACN (1:1 vol/vol). As amostras foram mantidas sob agitação por 30 minutos, então foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido até que o gel perdesse a coloração completamente.

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

As bandas foram reidratadas com solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo tripsina na proporção de 1:50 m/m (enzima: substrato). A digestão foi mantida por

16 horas a 37 °C e interrompida pela adição de 2 µL de ácido fórmico 2% (AF). Para a extração dos peptídeos da digestão enzimática utilizou-se uma solução contendo AF 5% com ACN 50%. A mistura foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugada e o sobrenadante coletado. Esse procedimento foi repetido quatro vezes e os sobrenadantes coletados foram secos em um concentrador a vácuo. Após secagem, os peptídeos foram solubilizados em 20 µL de AF 0,1% e centrifugado a 5000 xg por 2 minutos.

Dois microlitros da solução de peptídeos foram aplicados em uma nano coluna de C-18 (0,075 x 100 mm) acoplada a um sistema de nanoACQUITY (Waters Corp). A coluna foi equilibrada com 0,1% de AF e eluída com um gradiente de ACN 10% a 85% em 0,1% de AF. Os eluatos da cromatografia foram infundidos em uma fonte nano eletrospray de um espectrômetro de massas híbrido (Synapt HDMS system-Waters Corp). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 373 K, sob voltagem capilar de 3,0 kV e calibrado com o padrão de fragmentação do [Glu1]-fibrinopeptídeo B. A coleta de dados foi realizada de acordo com o método de aquisição dependente de dados (*Data dependent analysis* - DDA). A referência utilizada durante a coleta de dados foi o íon de m/z 785,84 de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. Os íons selecionados foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*), utilizando argônio como gás de fragmentação. Todos os espectros CID foram interpretados manualmente e pesquisas para similaridade foram realizadas *on-line* utilizando BLAST no site do NCBI.

3.12 Dicroísmo circular

A medição espectroscópica de dicroísmo circular foi realizada num espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) ligado a um peltier com temperatura controlada. A lectina (0,2 mg / mL em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0; contendo NaCl 150 mM) foi colocada numa cubeta de quartzo retangular com um comprimento de percurso de 0,5 mm. Os espectros foram adquiridos a uma velocidade de varrimento de 50 nm / min com uma largura de banda de 1 nm. As aquisições foram realizadas a 190-250 nm (longe-UV), com temperaturas diferentes (20-95 ° C) com oito acumulações por temperatura e pH diferente (2-12). A análise dos dados estruturais foi realizada pelo servidor web DICHROWEB (WHITMORE; WALLACE 2008).

3.13 Teste de pré-cristalização da lectina

Foi realizado um ensaio preliminar de cristalização da proteína utilizando o kit de cristalização PCT Pre-Crystallization Test, para avaliar previamente a concentração de proteína ideal para a realização da triagem das condições de cristalização através de matriz esparsa (JANKARIK; KIM 1991)

3.14 Ensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia* sp

O efeito da lectina isolada sobre os náuplios de *Artemia* foram avaliados de acordo com Carneiro *et al.*, 2013. Os cistos foram eclodidos em água do mar artificial sob iluminação e aeração constante e foram incubados em um tubo cilíndrico cônico de polietileno a uma concentração de 1 g.L⁻¹. Após 24h a aeração foi suspensa e a luz foi direcionada para o fundo do tubo para que os náuplios migrassem na direção da luz e se acumulassem no fundo. Os cistos que não eclodiram ficaram na superfície. Já os náuplios saudáveis, que se aglomeram na direção da luz, foram coletados.

Após a obtenção dos náuplios de *Artemia*, a lectina foi dissolvida na água do mar a uma concentração de 200 µg.mL⁻¹. Para realização do ensaio foram utilizadas placas Limbro™ de 24 poços. Em cada poço foi adicionado 10 náuplios, a solução de lectina a concentrações finais de 12,5; 25; 50 e 100 µg.mL⁻¹ e água do mar do mar resultando um volume de 2 mL. Após 24 h os náuplios mortos foram contados e usando estes dados foi calculado o percentual de morte para cada concentração. O valor de LC₅₀ foi determinado usando uma análise de Probit, conforme descrito por Finney (1972).

3.15 Inibição da formação de biofilme

3.15.1 *Micro-organismos e condições de cultivos*

Na inibição da formação de biofilme, foram usadas bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25175 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12225, e uma bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Essas bactérias foram obtidas da coleção American Type Culture Collection (ATCC). As bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após o crescimento pelo menos 5 colônias isoladas

foram removidas e inoculada em 5 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB) e incubada durante 18 h a 37 ° C sob agitação constante. Posteriormente ao crescimento, a suspensão de bactérias foi ajustada para 2×10^6 células.MI⁻¹, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

3.15.2 Atividade das lectinas sobre o crescimento planctônico

O efeito da lectina sobre o crescimento planctônico foi realizado segundo o teste de microdiluição em placa de poliestireno de 96 poços. Inicialmente a lectina foi diluída em NaCl 150 mM em diferentes concentrações. Em seguida, foi adicionada em cada poço da microplaca 100 µL das diferentes concentrações da lectina, e 100 µL de células obtendo um volume final de 200 µL. Por fim as placas foram incubadas a 37 ° C, durante 24 horas em agitação constante e posteriormente a densidade óptica de cada poço foi registrada a 620 nm utilizando um leitor de microplacas automático (SpectraMax® I3) para avaliar o crescimento bacteriano.

3.15.3 Ação das lectinas sobre a formação dos biofilmes

Para avaliar a ação das lectinas sob a formação dos biofilmes, foi utilizada a metodologia baseada no teste em placas de microtitulação desenvolvido por Stepanovic e colaboradores (2000), com algumas modificações. Todas as placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h em agitação constante para o desenvolvimento dos biofilmes. Após o crescimento do biofilme, na presença e ausência de lectinas, o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL/poço de água estéril com o objetivo de remover células fracamente aderidas. O procedimento foi realizado em duas placas de microtitulação distintas, uma para a avaliação da biomassa total, e a outra para a análise do número de células viável presentes nos biofilmes.

3.15.4 Quantificação da Biomassa

A biomassa do biofilme foi quantificada por coloração utilizando cristal de violeta. Para a fixação do biofilme, 200 μ L de metanol a 99% foram adicionados a cada poço por 5 minutos, passado este tempo o metanol foi removido e as placas foram deixadas secar à temperatura ambiente. Em seguida, 200 μ L de cristal de violeta 1% foram adicionados aos poços e após 5 min o excesso do corante foi removido. Finalmente, 200 μ L de ácido acético (33%, v/v) foram adicionados aos poços para dissolver o cristal de violeta e a densidade óptica foi medida a 590 nm.

3.15.5 Enumeração de células viáveis

Para a enumeração de células, foi adicionado aos biofilmes bacterianos 200 μ L de água estéril em cada poço e as placas foram colocadas em banho ultrassônico operando a 50 kHz, durante 8 minutos. As suspensões obtidas foram alíquotadas em eppendorfs e então foram realizadas diluições seriadas de maneiras decimais. As diluições da suspensão bacteriana foram então inoculadas em TSA. As placas contendo TSA foram incubadas durante 24 h a 37 ° C, e o número total de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi enumerada.

3.15.6 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

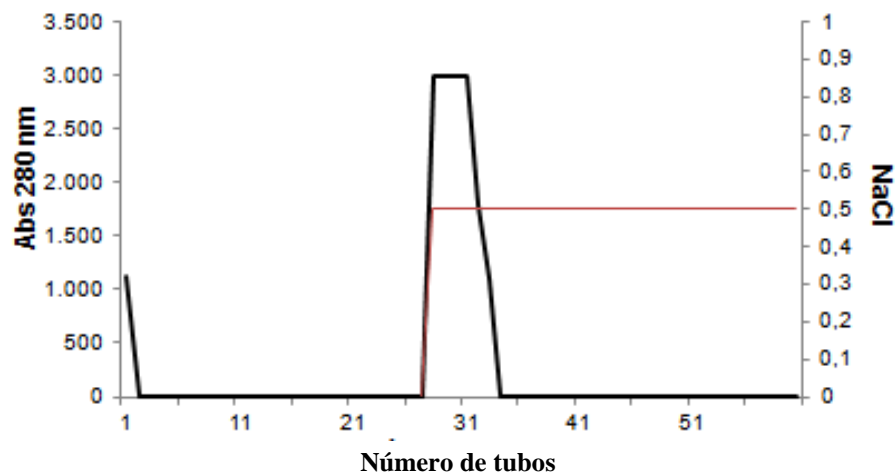
4.1 Purificação da lectina

Uma lectina presente na esponja marinha *Chondrilla caribensis*, denominada de CCL (*Chondrilla caribensis lectin*), foi isolada a partir da combinação de cromatografia de troca iônica, seguido de cromatografia de afinidade.

O extrato bruto da esponja *Chondrilla caribensis* apresentou atividade hemaglutinante e hemolítica contra sangue de coelho e todos os tipos sanguíneos humanos. No entanto, a separação da fração hemaglutinante e da fração hemolítica, presente o extrato bruto, foi alcançada a partir da combinação de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel, seguido de cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar.

O extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônia, em frações 0-60 e 60-90. A fração 0-60 apresentou maior atividade hemaglutinante e atividade hemolítica. Essa fração foi aplicada na matriz DEAE-Sephacel e eluída com adição de NaCl 0,5 M (Figura 2). A fração hemaglutinante foi coletada e utilizada para a próxima etapa da purificação.

Figura 2 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

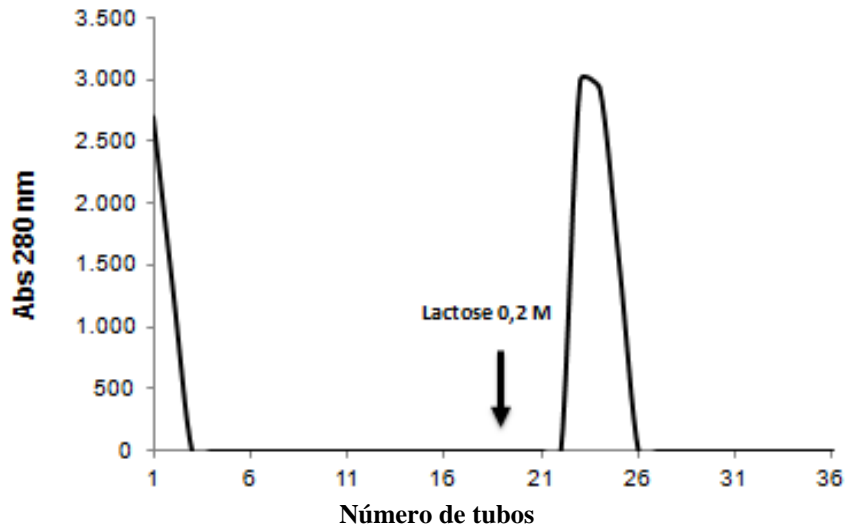


Fonte: Autor. Coluna equilibrada com tris 20mM pH 8, com fluxo de 1 ml.min⁻¹, volume coletado de 2,5 mL. Eluído da coluna com NaCl 0,5 M

A segunda fase cromatográfica foi realizada através de uma cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar (Figura 3). As frações hemaglutinate provenientes da

cromatografia de troca iônica foram aplicadas na coluna. O material retido na coluna foi eluído com lactose 0,2 M.

Figura 3 - Cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar



Fonte: Autor. Coluna equilibrada com tris 20mM NaCl 0,15 pH 7,6, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume coletado de 2,5 mL. Eluída da coluna com lactose 0,2M

A CCL corresponde a 1,12% das proteínas totais solúveis de *Chondrilla caribensis*, tendo sido purificada 12,49 vezes, representando 14% da atividade hemaglutinante total presente no extrato bruto (Tabela 1). A lectina foi ainda capaz de aglutinar eritrócitos na concentração de 0,095 µg.mL⁻¹.

Tabela 1 – Sumário de purificação da CCL

Fração	Concentração de proteínas (MG /mL)	Volume (mL)	Atividade hemaglutinante (U.H/mL)	Total de proteína (mg)	Atividade total (U.H.)	Atividade específica (U.H.)	Purificação	Rendimento em U.H. (%)	Rendimento em t. proteína(%)	CMA* (µg/mL)
Extrato	0,6092	400	512	243,6	204800	840,44	1	100	100	1,19
Fração 0/60	0,992	172	1024	170,6	176128	1032,2	1,228	86	70	0,96
Pico DEAE	0,8985	30	1024	26,9	30720	1139,6	1.104	15	11	0,877
Pico goma de gua (CCL)	0,0975	28	1024	2,73	28672	10502,5	9,215	14	1,12	0,095

CMA*: concentração mínima capaz de causar aglutinação de uma solução de eritrócitos a 3% Fonte: autor

4.2 Atividade hemaglutinante

A CCL foi capaz de aglutinar eritrócitos humano e de coelho, ambos na forma nativa e tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina), havendo uma preferência por eritrócitos tratados com papaína e tripsina (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade hemaglutinante da CCL frente a diferentes eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas (U.H./mL).

Eritrócitos	Nativo	Papaína	Tripsina
Coelho	256	1024	1024
Humano			
A	256	512	512
B	256	512	512
O	256	512	512

Fonte: autor

4.3 Inibição da atividade hemaglutinante

Atividade hemaglutinante da CCL foi inibida apenas por lactose e lactulose, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 100 mM (tabela 3).

Tabela 3 - Inibição da atividade hemaglutinante da CCL por açúcares e glicoproteínas

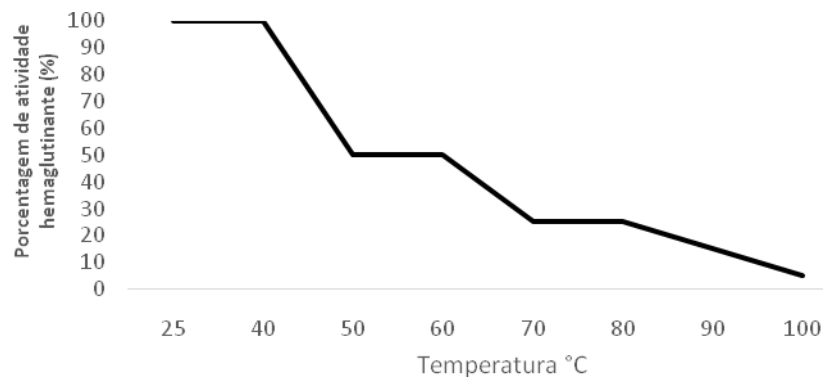
Açúcar	CIM
4-Nitrofenil- β -galactosídeo	-
4-Nitrofenil- α -galactosídeo	-
α -Nitrofenil- β -galactosídeo	-
β -metil-D-galactopiranosídeo	-
α -metil-galactosídeo	-
α -metil-galactopiranosídeo	-
lactose	100 mM
lactuose	100 Mm
galactose	-
ácido galacturônico	-
D-galactose	-
Glicoproteínas	
PSM tipo III	-
PSM tipo II	-

Fonte: autor

4.4 Caracterização físico química

A atividade hemaglutinante da CCL foi diminuindo com o aumento da temperatura de incubação. Na temperatura de 50°C resultou na perda de 50% da atividade, seguido por uma significativa diminuição a partir de 70 °C, até uma perda total na atividade quando aquecida a 100 °C durante 1h. (Figura 4).

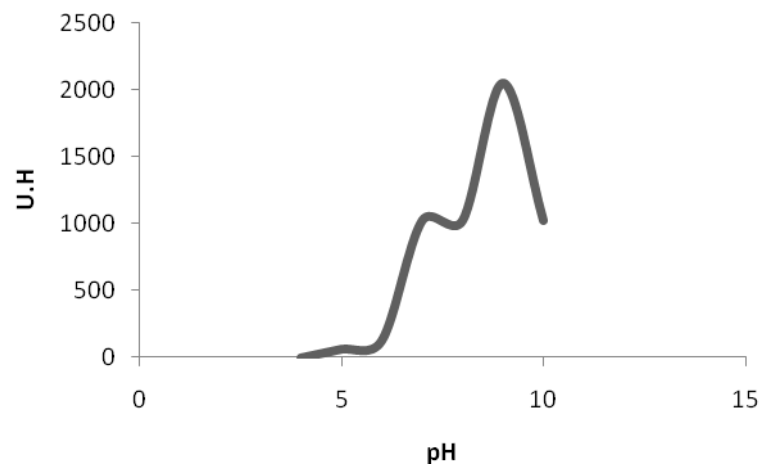
Figura 4 - Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante



Fonte: Autor

A atividade da CCL apresentou um ótimo de pH na faixa neutro-alcalina, exibindo maior atividade hemaglutinante em pH 9,0 (Figura 5).

Figura 5 - Efeito do pH na atividade hemaglutinante da CCL



Fonte: Autor

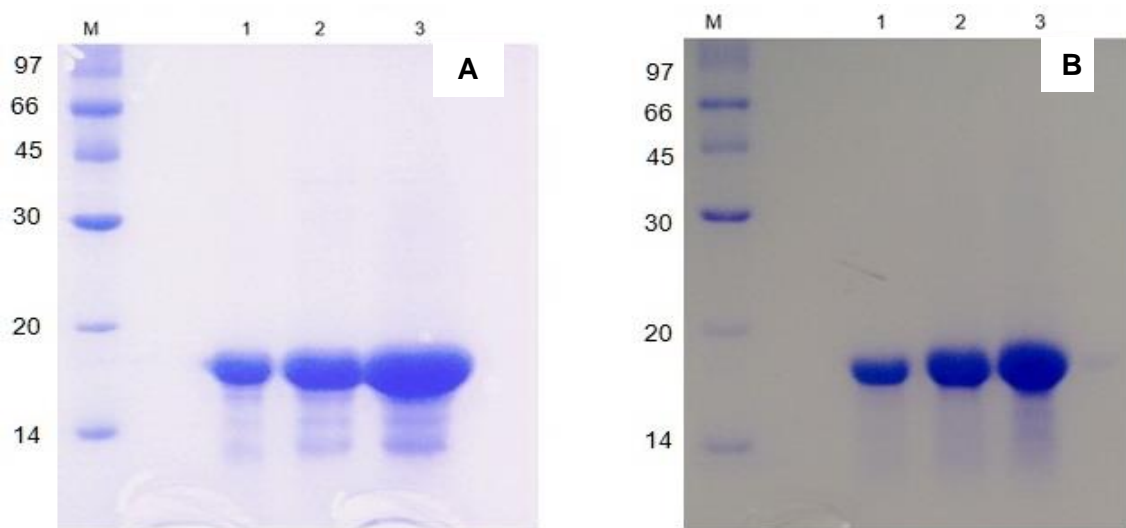
A atividade hemaglutinante da CCL não foi afetada pela presença de EDTA, sugerindo que a lectina não depende de íons divalentes para efetivar sua atividade.

O método fenol-ácido sulfúrico mostrou que a CCL é uma glicoproteína, revelando um teor de 5,2% de carboidratos neutros na lectina.

4.5 Eletroforese e estimativa da massa molecular

Em SDS-PAGE, a CCL apresenta-se como uma única banda de aproximadamente 15 kDa, em condições redutoras e não redutoras (Figura 6).

Figura 6 - SDS-PAGE em condições reduzido e não reduzido

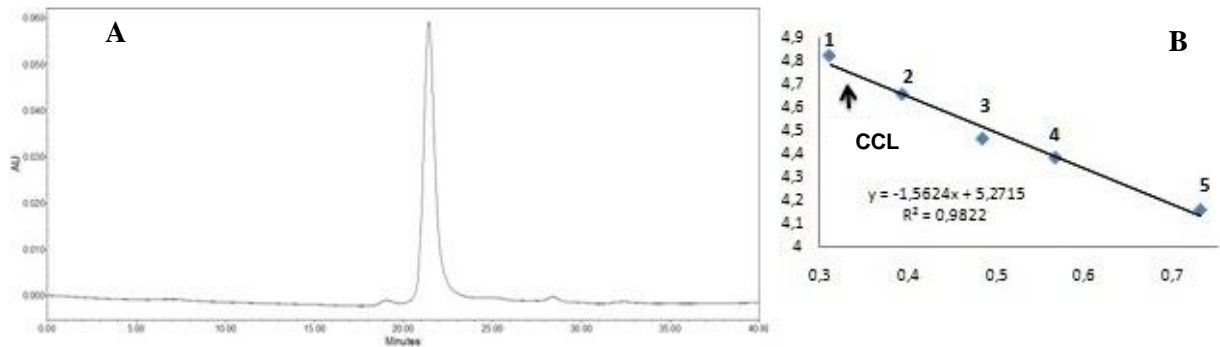


Fonte: Autor. . Marcador molecular (M), 20 µg de CCL (1), 40 µg (2) e 80 µg (3). A - SDS-PAGE reduzido. B - SDS-PAGE não reduzido.

4.6 Estimativa da massa molecular nativa

Através de cromatografia de exclusão molecular em coluna Biosuite™ 250 HR SEC (0,78 x 30 cm, tamanho de partícula 5µm), CCL apresentou um único pico simétrico com massa molecular aparente de 54 kDa (Figura 7).

Figura 7 - Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular

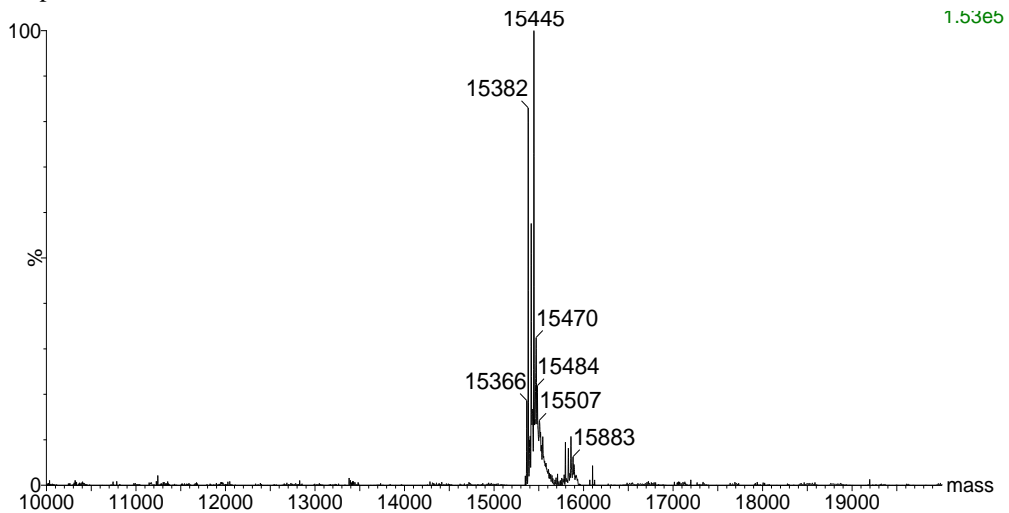


Fonte: autor. **A**) perfil cromatográfico em gel filtração em coluna BioSuite 250 HR SEC (0,78 x 30 cm, tamanho de partícula 5 μm), equilibrada com tampão TBS/Ca pH 7,6. Foi aplicado 100 μL de CCL purificada. **B**) Curva de calibração: (1) BSA, 66 kDa; (2) ovalbumina, 45 kDa; (3) anidrase carbônica, 29 kDa; (4) ribonuclease A, 14 kDa e (5) aprotinina, 7 kDa.

4.7 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A massa molecular da CCL determinada por MS exibiu uma massa molecular de 15445 Da (Figura 8).

Figura 8 - Espectro de massas ESI-MS deconvolvido de CCL.



Fonte: Autor. CCL foi solubilizada a uma concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução de ácido fórmico (AF) 0,1% e acetonitrila (ACN) 5% onde foi infundida no sistema com um fluxo de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

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

Os peptídeos sequenciados de CCL oriundos da digestão com tripsina não mostraram semelhança com proteínas conhecidas. A tabela 3 apresenta as sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos a partir de MS/MS.

Tabela 4 - Sequência de aminoácidos dos peptídeos de CCL determinados por MS/MS

Peptídeo	Sequência	Massa (Da)		Delta (Da)
		Observada	Calculada	
T-1	XPVNSVQR	911,47	911,52	0,05
T-2	PVNSVQR	798,38	798,43	0,05
T-3	XPVNSVK	755,34	755,45	0,11
T-4	GVGQSATAVYTAPGDGR	1605,74	1605,77	0,03
T-5	SXDGHFAXXADGXQVATYDHR	2298,05	2298,13	0,13
T-6	VATVSXPR	841,46	841,50	0,04
T-7	TDXNXXDADGGYVXHEDYR	2196,00	2196,04	0,04

Fonte: Autor. X representa os resíduos de Leucina ou Isoleucina, que não foram distinguidos por massas.

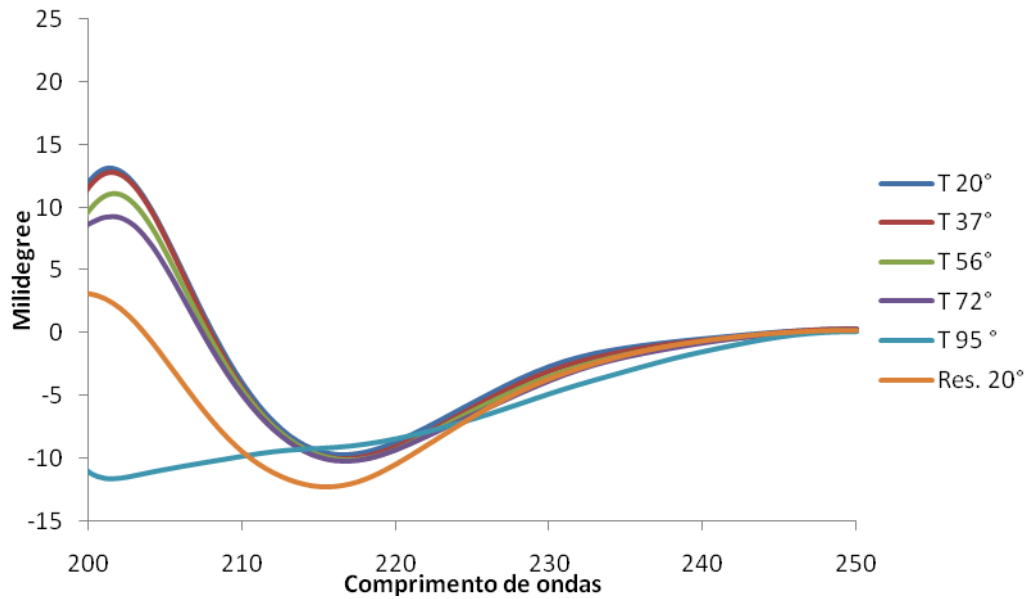
4.9 Dicroísmo circular

De acordo com o método de previsão CONTIN (Van Stokkum et al., 1990), disponível online como parte do servidor DICROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>), a estrutura teórica secundária de CCL consistiu em 10,4% de α hélice, 73,4% de estrutura β e 16,2% de região desestruturada.

As variações na estrutura secundária da CCL foram examinadas através do monitoramento das modificações nos espectros de Dicroísmo Circular em função da temperatura e do pH.

Em relação à temperatura, entre 20 e 75 °C não foram observadas alterações significativas na estrutura secundária, mas após aquecimento a 95°C, algumas modificações ocorreram em absorções máximas e mínimas, indicando perda de estrutura secundária. Porém, quando a proteína que foi aquecida a 95°C e resfriada em seguida a 20 °C, foi evidenciada a recuperação parcial da sua estrutura secundária (Figura 9).

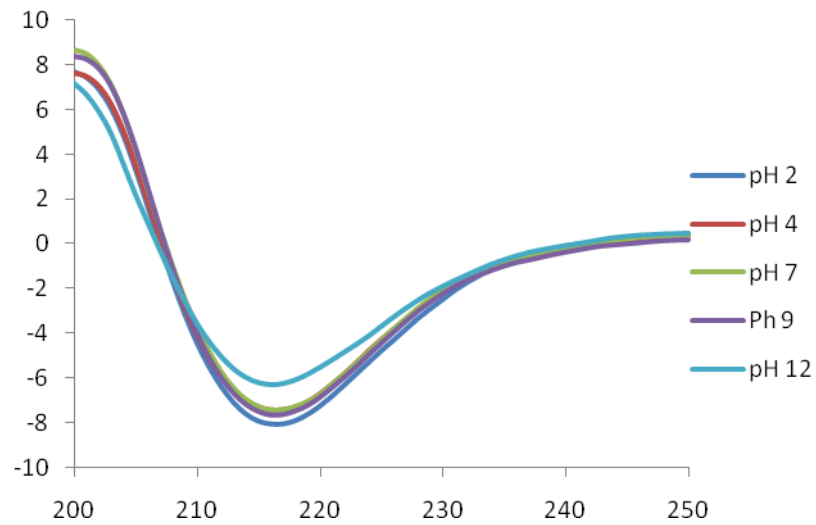
Figura 9 - Espectros de Dicroísmo circular - UV de CCL em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor

Já em relação ao pH, CCL apresentou apenas uma pequena variação na estrutura em pH 12 (Figura 10).

Figura 10 - Espectros de Dicroísmo circular - UV de CCL em diferentes pH.

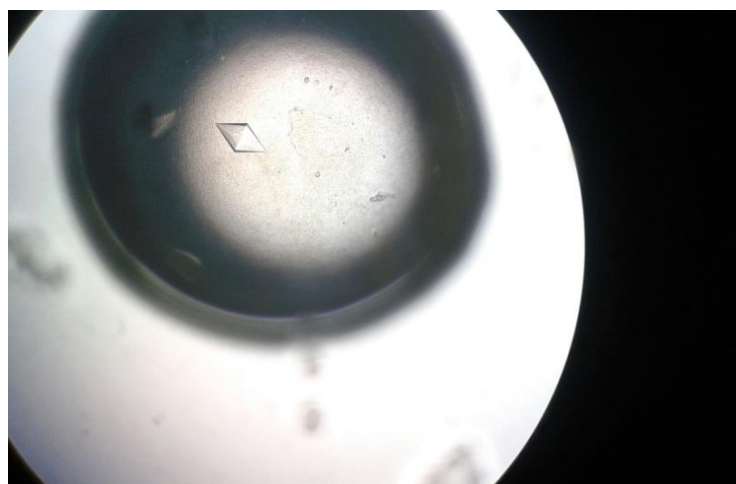


Fonte: Autor

4.10 Cristalização da CCL

Os estudos de cristalização da CCL, através do uso do kit de cristalização PCT da Hampton Research, possibilitaram a observação da formação de um cristal, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Cristal da CCL.



Fonte: Autor. Condição de cristalização, solução PCT 01: composta por 0,1 M Tris pH 8,5; 2,0 M Sulfato de amônio. Amostra a 15 mg.mL⁻¹

4.11 Ensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia* sp

No ensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia* sp. CCL apresentou uma elevada taxa de mortalidade acima de 90% para todas as concentrações testadas, com LC₅₀ de 6,4 µg.mL⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 5 - Ensaio de letalidade sobre nauplios de *Artêmia* sp.

[CCL] (µg.mL ⁻¹)	Náuplios mortos (%)
12,5	90,32
25	96,67
50	93,1
100	93,33

Fonte: Autor

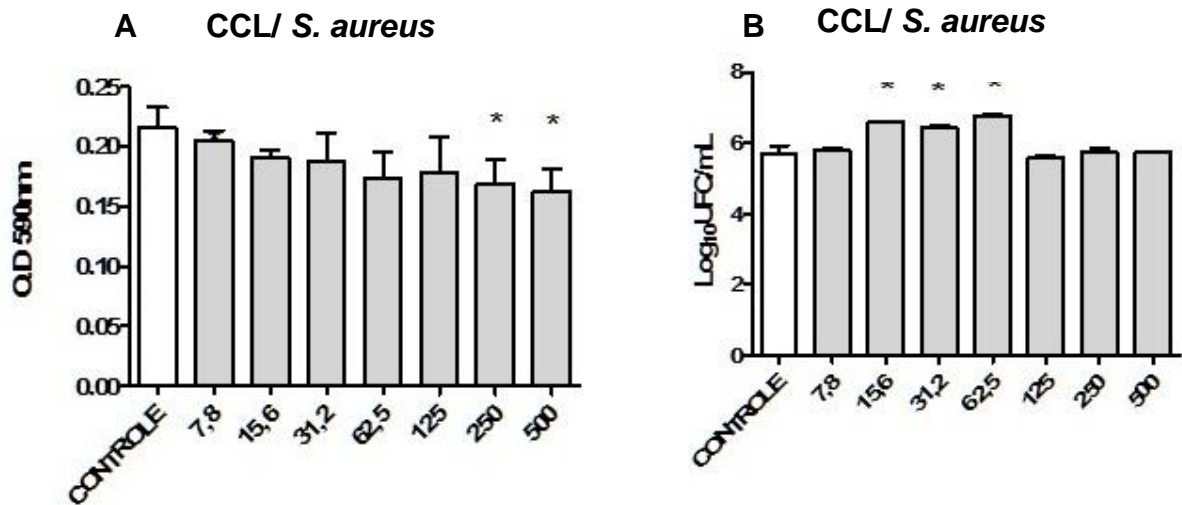
4.12 Inibição da formação de biofilme

O efeito da CCL na prevenção da formação de biofilmes foi avaliado por dois ensaios diferentes, a determinação da massa de biofilme e enumeração de células viáveis de biofilmes. Foi observado também o efeito da CCL sobre o crescimento planctônico.

A CCL não foi capaz de reduzir o crescimento planctônico das bactérias utilizadas.

O tratamento de biofilme de *Staphylococcus aureus* com CCL reduziu a biomassa somente nas concentrações elevadas de 250 e 500 µg.mL⁻¹ (Figura 12 a). Em relação ao número de células viáveis de biofilme, CCL não reduziu a viabilidade de *S. aureus* (Figura 12 b).

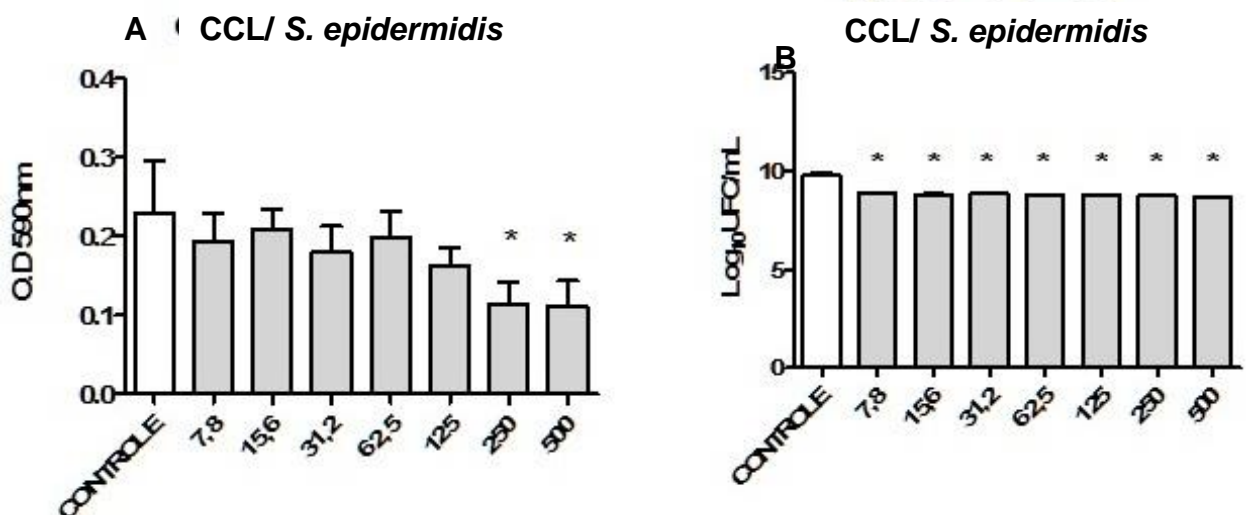
Figura 12 - Formação de biofilme de *S. aureus* na presença da CCL.



Fonte: Autor. **A** – biomassa do biofilme e **B** - número de células viáveis presentes nos biofilmes. * P <0,05 comparado com o controle.

O tratamento de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* com CCL também reduziu a biomassa somente em concentrações de 250 e 500 µg.mL⁻¹ (Figura 13 a). Em relação ao número de células viáveis de biofilme, CCL reduziu a viabilidade de *S. epidermidis* em todas as concentrações (Figura 13 b).

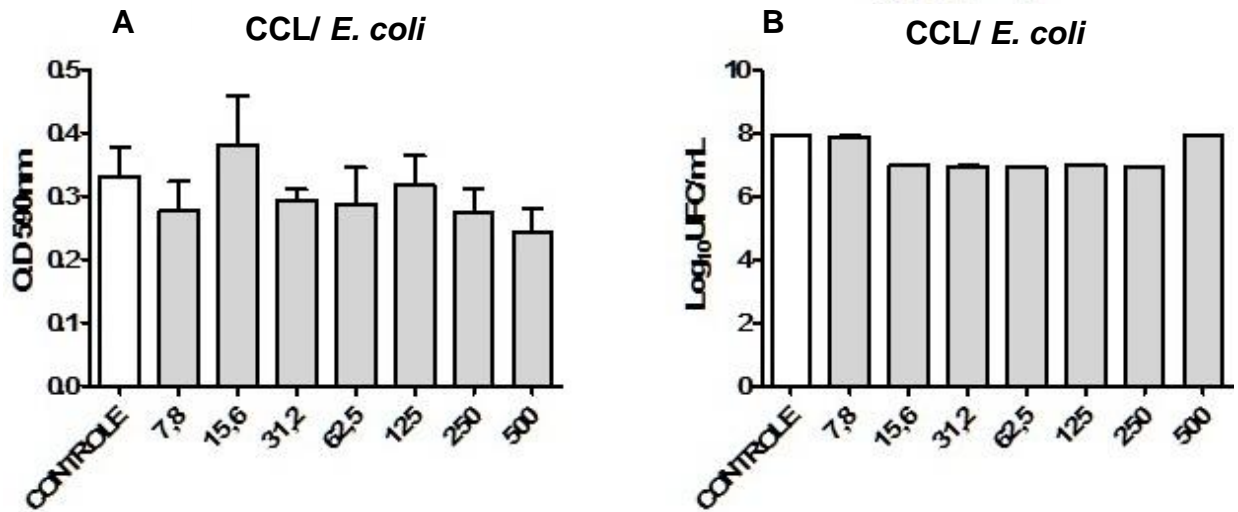
Figura 12 - Formação de biofilme de *S.epidermidis* na presença da CCL.



Fonte: Autor. **A** – biomassa do biofilme e **B** - número de células viáveis presentes nos biofilmes. * P <0,05 comparado com o controle.

O tratamento de biofilme de *Escherichia coli* com CCL mostrou que não houve redução na biomassa nem no número de células viáveis de biofilme (Figura 11).

Figura 13 - Formação de biofilme de *E. coli* na presença da CCL.



Fonte: Autor. **A** – biomassa do biofilme e **B** - número de células viáveis presentes nos biofilmes. * P <0,05 comparado com o controle.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho trata do isolamento, caracterização, efeito citotóxico da sobre náuplios de *Artemia*. e efeito inibitório sobre biofilmes bacterianos de uma nova lectina presente no extrato aquoso da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (CCL) coletados em zonas de recifes de arenito na praia de Paracuru, município de Paracuru, Ceará.

A CCL foi purificada através da combinação de cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade é uma técnica muito utilizada para isolar lectinas. Dentre as esponjas marinhas, cromatografia de afinidade é um importante passo para a purificação dessas proteínas (ENGEL *et al.*, 1992; MOURA *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2010).

A lectina H-2 presente na esponja marinha *Haliclona caerulea* foi purificada pela combinação de cromatografia de afinidade em coluna de stroma-Sephadex e cromatografia de troca-iônica (CARNEIRO *et al.*, 2013). A lectina MBL-AJ do pepino-do-mar *Apostichopus japonicus* foi isolada pela combinação de cromatografia de troca-iônica em DEAE-TSK 650M e cromatografia de afinidade em coluna de manana-Sepharose CL-4B (BULGAKOV *et al.*, 2007).

O extrato bruto da esponja marinha *Chondrilla caribensis* apresentou também atividade hemolítica contra eritrócitos humanos e de coelho, porém, através da cromatografia de troca iônica foi possível separar a hemolisina, possibilitando a purificação da lectina.

A presença de hemólise é comum em invertebrados marinhos, como por exemplo, extratos da esponja marinha *Amphimedon viridis*, do molusco *Ischinachiton pectinatus* e dos echinodermata *Holothurea arenicola* e *Holothurea grisea* (MOURA *et al.*, 2015).

Abordagem semelhante foi utilizada para a purificação da lectina presente no pepino do mar *Holothurea grisea*, onde o extrato total apresentava uma forte atividade hemolítica. Nesse trabalho os autores isolaram a lectina, denominada de HGA-2, utilizando apenas cromatografia de afinidade em matriz de goma de Guar (MELO *et al.*, 2014).

A CCL representa 1,12% das proteínas totais solúveis de *C. caribensis*, sendo este valor considerado elevado quando comparado com outras lectinas de esponjas marinhas. A lectina ACL –II isolada da esponja marinha *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2012) representa apenas 0,056 % das proteínas solúveis, enquanto que a CvL, lectina isolada da

esponja marinha *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), correspondeu a 1,03% das proteínas encontradas no extrato, semelhante ao encontrado na CCL.

CCL mostrou ser capaz de aglutinar todos os eritrócitos testados, humanos e coelho. A lectina mostrou um incremento na atividade hemaglutinante quando os eritrócitos foram previamente tratados com enzimas proteolíticas, papaína e tripsina. Esse aumento na atividade poder estar relacionado com a diminuição do impedimento estérico pela remoção dos polipeptídios e exposição de carboidratos e glicoconjugados não expostos na superfície dos eritrócitos (SAMPAIO, 1997).

Outras lectinas de esponjas marinhas apresentaram uma melhor atividade hemaglutinante quando os eritrócitos foram tratados com enzimas proteolíticas, por exemplo, a CvL isolada da esponja *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), a lectina Cal da esponja *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2010) e a lectina H-1 da esponja *Haliclona caerulea* que apresentou uma preferência por eritrócitos de coelho tratado com tripsina (CARNEIRO *et al.*, 2011).

A atividade hemaglutinante da CCL foi inibida fracamente por lactose e lactulose na concentração mínima de 100 mM. Concentrações dessa magnitude não caracterizam efetivamente poder inibitório, visto que, nos protocolos de inibição utilizados, essa é a concentração das soluções estoques, iniciando-se os ensaios de inibição com 50 mM. Poucas lectinas de esponjas marinhas têm apresentado afinidade por lactose, tais como, *Haliclona* sp., *Cinachyrella tenuifolia* (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985); a lectina isolada da esponja *Cinachyrella apion* (MOURA *et al.*, 2010) e a purificada da esponja marinha *Aplysina lactuca* (CARNEIRO *et al.*, 2017).

O potencial da atividade hemaglutinante de CCL foi diminuindo com o aumento da temperatura, porém só perdeu sua atividade por completo quando aquecida a 100°C por 1h. Essa lectina se comporta de forma semelhante a outras lectinas de esponjas. A lectina isolada da esponja marinha *Craniella australienses*, CAL (XIONG *et al.*, 2006), mostrou atividade residual quando foi exposta a temperatura de 95 °C por 1h, enquanto a lectina H-2, presente na esponja marinha *Haliclona caerulea*, difere da CCL, pois se manteve estável mesmo aquecida a 80 °C por 1h. A resistência da atividade das lectinas a elevadas temperaturas pode estar relacionada com a presença de pontes dissulfeto intracadeias, conferido maior resistência a proteína frente ao calor.

Quando submetida a diferentes pH, a atividade da CCL foi mais efetiva em pH alcalino (9,0). A grande maioria das lectinas isoladas de esponja apresentam atividade ótima em pH neutro ou alcalino (MOURA *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2015). Esse resultado pode ser explicado pelo o ambiente natural da *C. carbensis*, que vive em ambiente que possui um poderoso sistema tamponante.

A CCL é independente de íons divalentes, pois a adição de EDTA não inibiu a capacidade de aglutinar eritrócitos. Outras lectinas de esponjas independentes de íons divalentes foram já isoladas, como da esponja *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2008), *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2012) e *H. manglaris* (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O método fenol-ácido sulfúrico mostrou que a CCL é uma glicoproteína, com um teor de 5,2% de carboidratos. A lectina HMA isolada da *H. manglaris* apresentou um teor de 7% de carboidratos neutros e as lectinas H-1 e H-3 presentes em *H. caerulea* apresentaram teor de carboidratos de 8,2% e 2,3%, respectivamente.

A massa molecular da CCL foi estimada por SDS-PAGE e exclusão molecular e determinada por espectrometria de massa. Por SDS-PAGE, a CCL é uma proteína de aproximadamente 15 kDa, em condições redutoras e não redutoras. A massa molecular da CCL foi de 15,445 kDa através de MS, estando em concordância com a massa molecular da CCL estimada por eletroforese. Já na exclusão molecular a CCL mostrou resultado diferente, apresentando uma massa molecular de 54kDa, revelando que a lectina é um tetrâmero.

Diferenças entre a massa molecular estimada por SDS-PAGE e gel filtração já foi observada em outra lectina isolada de esponja marinham, H-1 presentes em *H. caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Os peptídeos sequenciados de CCL oriundos da digestão com tripsina não mostraram semelhança com proteínas conhecidas, ou seja, ela não se enquadra nas famílias de lectinas já descritas. A lectina HMA, isolada da *H. manglaris* também se enquadrou em nenhuma família de lectnas (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O Dicroísmo Circular é uma técnica usada para fornecer informações valiosas sobre a estrutura secundária e o dobramento funcional de proteínas, que mede a diferença de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por cromóforos. Essa técnica também é utilizada para verificar alterações na estrutura secundária em diferentes condições como temperatura, pH, presença de solutos entre outros (KELLY; PRICE, 2000; KESSENBROCK; GROTH, 2017).

Através do Dicroísmo Circular, a CCL apresentou uma estrutura teórica secundária constituída de 10,4% de α hélice, 73,4% de estrutura β . Essa proteína apresentou apenas 16,2% de região desestruturada, revelando que CCL é uma proteína bastante estável. Esse valor da região desestruturada é baixo quando comparada com outra lectina, como por exemplo, a ADEL, isolada dos ovos de um molusco marinho *Aplysia dactylomela*, que apresentou 40% (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Foi possível verificar, ainda mais, essa estabilidade da proteína quando foi realizado a monitorização de modificações nos espectros de Dicroísmo Circular em condições desnaturantes, como temperatura e pH. Em relação à temperatura, a estrutura secundária da CCL só apresentou modificações significativas quando aquecida a 95 °C, indicando perda da estrutura secundária. Porém, quando a proteína que foi aquecida a 95°C e em seguida resfriada a 20 °C ela recuperou sua estrutura secundária. A lectina ADEL perdeu sua estrutura quando aquecida a 80 °C (CARNEIRO *et al.*, 2017). Já em relação ao pH, CCL só apresentou uma pequena variação na estrutura em pH 12, evidenciando ainda mais a sua estabilidade.

Além de todos os resultados discutidos até aqui, obtemos um cristal da lectina CCL através do ensaio preliminar de cristalização, utilizando o kit de cristalização da Hampton Research. Esse resultado é uma base para realização de novos experimentos sobre a estrutura tridimensional da CCL.

Poucas lectinas de esponjas foram cristalizadas até o presente momento. Em 2012, Freyman e colaboradores cristalizaram a lectina de *Cinachyrella* sp., ChcG, em três condições diferentes. Já em 2013, outra lectina de esponja, H-3 foi cristalizada em condições nativa e complexada com GalNAc (CARNEIRO *et al.*, 2013 b).

CCL foi altamente tóxica para os náuplios de *Artemia* sp., apresentando um $LC_{50} = 6,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este resultado sugere que a CCL pode desempenhar um papel de defesa no animal. O ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* é muito útil como um teste preliminar da toxicidade do potencial de moléculas biologicamente ativas.

Poucas lectinas de esponjas marinhas foram avaliadas quanto à toxicidade sobre náuplios de *Artemia*. CvL-1 também mostrou um alto nível de toxicidade contra os náuplios de *Artemia* (dados não publicado). Ela também foi capaz de inibir o crescimento de células de leucemia humana da linhagem K562 (Queiroz *et al.*, 2008) além disso, essa lectina apresentar atividade pró-inflamatório (QUEIROZ *et al.*, 2009). CCL é altamente tóxico contra náuplios

de *Artemia* e pode, como CvL-1, ser uma ferramenta poderosa da biotecnologia na pesquisa de células tumorais.

A lectina AcL – 1, isolada da esponja *Axinella corrugatae* apresentou alta letalidade, com $LC_{50} = 0,951 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (DRESCH *et al.*, 2012). As lectinas de *Haliclona caerulea*, H-1, H-2 e H-3 apresentaram toxicidade para náuplios de *Artemia* apresentando $LC_{50} = 6,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $142,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $414,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (CARNEIRO *et al.*, 2013). A lectina HMA de *H. manglaris* não mostrou efeito tóxico (CARNEIRO *et al.*, 2015).

CCL não foi capaz de reduzir o crescimento planctônico, mas foi eficaz na inibição da formação de biofilme das bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para ambas as bactérias. Em relação ao número de células viáveis, CCL foi eficaz em todas as concentrações apenas no tratamento com *S. epidermidis*, enquanto no tratamento com *E. coli*, CCL não foi capaz de inibir a formação de biofilme nem o crescimento planctônico.

São encontrados alguns trabalhos na literatura que relatem os efeitos das lectinas de invertebrados marinhos sobre biofilmes bacterianos. Em 2006, Kazanjian e Fariñas evidenciaram que o extrato aquoso da esponja *Aplysina lacunosa* foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, e *Salmonella enteritidis*. Recentemente uma lectina denominada ALL, isolada da esponja marinha *Aplysina lactuca*, foi capaz de reduzir significativamente a biomassa dos biofilmes bacterianos e também afetou o número de células viáveis das bactérias *S. aureus* e *E.coli* em todas as concentrações testadas (CARNEIRO *et al.*, 2017b). Outra lectina, ADEL, isolada dos ovos de um molusco marinho, *Aplysia dactylomela*, também inibiu a formação de biofilme de *S. aureus*, mas não inibiu o crescimento planctônico. ADEL não afetou a formação de biofilme nem o crescimento planctônico da *E.coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017a). Esses resultados da ADEL foram semelhantes ao encontrado nos tratamentos com *S. aureus* e *E.coli* do presente estudo.

Os biofilmes são descritos como comunidades complexas de microorganismos associados à superfície ou a interfaces, embebidas em uma matriz polimérica auto produzida. As células aderidas formando o biofilme são designadas de sésseis, enquanto as livres e dispersas na fase aquosa são chamadas de planctônicas. (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A matriz extracelular presente nos biofilmes é formada principalmente por polissacarídeos, mas também são encontradas proteínas, DNA extracelular, lipídeos e água.

Ela capaz de proteger os microorganismos contra dessecação, biocidas oxidantes, alguns antibióticos e cátions metálicos, radiação ultravioleta, alguns protozoários herbívoros e hospedeiros imune (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Uma vez que os biofilmes estão associados a uma matriz que os torna resistente aos principais antibióticos convencionais, CCL apresentou resultados favoráveis na inibição da formação de biofilme e no crescimento de células planctônicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Chondrilla caribensis* foi purificada pela combinação de cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. CCL é uma glicoproteína, com um teor de 5,2% de carboidratos e com um tamanho de aproximadamente 15 KDa. Ela foi tóxica contra náuplios de *Artemia* sp. e foi eficaz na inibição da formação de biofilme das bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* e em relação ao número de células viáveis, CCL foi eficaz contra *S. epidermidis*. Alguns peptídeos da CCL foram sequenciados, mas não mostraram semelhança com proteínas conhecidas. A CCL é uma proteína que apresenta a estrutura teórica secundária constituída em 10,4% de α hélice, 73,4% de estrutura β e 16,2 % de região desestruturada, revelando-se uma proteína estável.

REFERÊNCIAS

- ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; ZENTENO, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.1724, n. 1, p. 86-93, 2005.
- AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cell to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.54 p.396-399, 1965.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v.119, p.419, 1954.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRETTING, H.; KABAT, E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, v.15, p.3228-3236, 1976.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J., **Invertebrates**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2011.
- BULGAKOV, A.A.; ELISEIKINA, M.G.; PETROVA, I.Y.; NAZARENKO, E.L.; KOVALCHUK, S.N.; KOZHEMYAKO, V.B.; RASSKAZOV, V.A.. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus*. **Glycobiology**, v.17, n. 12, p. 1284-1298, 2007.
- CARNEIRO, R.F.; DE MELO, A.A.; NASCIMENTO, F.E.; SIMPLICIO, C.A.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R.M.; MOTA, S.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 1, p. 51-58, 2013a.
- CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; MOURA, R.M.; CHAVES, R.P.; SOUSA, B.L.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; LIMA, J.P.M.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 2864– 2873, 2013b.
- CARNEIRO, R. F.; ALMEIDA, A. S.; MELO, A. A.; ALENCAR, D. B.; SOUSA, O. V.; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, S. S.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A. H. A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, 72, p. 1368-1375, 2015.
- CARNEIRO, R. F.; TORRES, R. C. F.; CHAVES, R. P.; DE VASCONCELOS, M. A.; DE SOUSA, B. L.; GOVEIA, A. C. R.; ARUDA, F. V.; MATOS, M. N. C.; MATTHEWS-CASCON, H.; FREIRE, V. N.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.

Purification, Biochemical Characterization, and Amino Acid Sequence of a Novel Type of Lectin from *Aplysia dactylomela* Eggs with Antibacterial/Antibiofilm Potential. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017.

CARNEIRO, R. F.; DE LIMA JR, P. H. P.; CHAVES, R. P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A. L.; DE 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**. 2017.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEMBITSKY, V. M.; GLORIOZOVA, T. A.; POROIKOV, V. V. Novel antitumor agents: marine sponge alkaloids, their synthetic analogs and derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 3, p. 319-336, 2005.

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

DODD, R.Y.; MACLENNA, A.P.; HAWKINS, D.C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguis**, v.15, n.5, p.386, 1968.

DRESCH, R.R.; ZANETTI, G.D.; LERNER, C.B.; MOTHESES, B.; TRINDADE, V.M.; VOZÁRI-HAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.T. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicol. Pharmacol**, v. 148, p. 23–30, 2008.

DRESCH, R. R.; LERNER, C. B.; MOTHESES, B.; TRINDADE, V. M.; HENRIQUES, A. T.; VOZÁRI-HAMPE, M. M. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n.4, p. 365-370, 2012.

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

ENGEL, M.; BACHMANN, M.; SCHRÖDER, H. C.; RINKEVICH, B.; KLJAJIC, Z.; UHLENBRUCK, G.; MÜLLER, W. E. G. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, n. 6, p. 527-537, 1992.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

- FINNEY, D.J. Probit analysis. Edição 3. **Cambridge University**: London, 1971.
- FREYMANN, D. M.; NAKAMURA, Y.; FOCIA, P. J.; SAKAI, R.; SWANSON, G. T. Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp.(ball sponge). **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n 9, p. 1163-1174, 2012.
- FU-TONG, L.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, 2005.
- GARDÈRES, J.; BOURGUET-KONDRACKI, M. L.; HAMER, B.; BATEL, R.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E. Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. **Marine Drugs**, v.13, n.8, p. 5059-5101, 2015.
- GARDÈRES, J.; DOMART-COULON, I.; MARIE, A.; HAMER, B.; BATEL, R.; MÜLLER, W. E.; BOURGUET-KONDRACKI, M. L. Purification and partial characterization of a lectin protein complex, the clathrilectin, from the calcareous sponge *Clathrina clathrus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 200, p. 17-27, 2016
- GARTE, S. J.; RUSSELL, C. S. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Amphitrite ornata*, a polychaetous annelid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 439, n. 2, p. 368-379, 1976.
- GRAY, J.E. **Notes on the Classification of the Sponges**. Annals and Magazine of Natural History, v. 9, n. 54, p. 442-461, 1872
- HAMMARSTROM, S.; KABAT, E. A. Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. **Biochemistry**, v. 8, n. 7, p. 2696-2705, 1969.
- HIRABAYASHI, J.; KUNO, A.; TATENO, H. Lectin-based structural glycomics: A practical approach to complex glycans. **Electrophoresis**, v. 32, n. 10, p. 1118-1128, 2011.
- IMMANUEL, T.; KRISHNAN, P.; RAGHURAMAN, R.; VEERAPPAN, N.; DAM-ROY, S. New records of *Chondrilla australiensis* and *Chondrilla grandistellata* (demospongiae: chondrosida: chondrillidae) from havelock island, south andaman, india. **Journal of Threatened Taxa**, v. 7, n 14, 2015.
- KAZANJIAN, A.; FARIÑAS, M. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 54, p. 189-200, 2006.
- KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current protein and peptide science**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.
- KESSENBROCK, Mareike; GROTH, Georg. Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure and Protein-Protein Interactions in Ethylene Signaling. **Ethylene Signaling: Methods and Protocols**, p. 141-159, 2017
- KEYZERS, R. A.; DAVIES-COLEMAN, M. T. Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. **Chemical Society Reviews**, v.34, p. 355-365, 2005.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 2, p. 187-197, 2002.

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

LAPORT, M. S.; SANTOS, O. C. S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 86-105, 2009.

LIMNA MOL, V. P.; RAVEENDRAN, T. V.; PARAMESWARAN, P. S. Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 1, p. 67-72, 2009.

MARCHALONIS, J. J.; EDELMAN, G. M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus Polyphemus*. **Journal of molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 453-465, 1968.

MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1, p. 23-44, 2000.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H.F. Bioactive proteins from marine sponges: Screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, 23, 955–962, 1985

MEDEIROS, D. S.; MEDEIROS, T. L.; RIBEIRO, J. K.; MONTEIRO, N. K.; MIGLIOLO, L.; UCHOA, A. F.; SANTOS, E. A. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MOLCHANOVA, V; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J. H.; LUKYANOV, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-193, 2007

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; FOOK, J.M.S.L.L.; DIAS, A.S.F.; MONTEIRO, N.K.V.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenics bacteria and *Leishmanis* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.145, p.517-523, 2006.

MOURA, R. M.; MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; RODRIGUES, C. R.; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K. S. SAMPAIO, A. H. Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 973-984, 2015.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

- PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M.J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: Isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 213–221, 2002.
- QUEIROZ, F.S.A.; MOURA, R.M., RIBERIO, J.K.C.; LYRA, I.L.; CUNHA, D.C.S.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, I.2, p. 216-221, 2008a.
- QUEIROZ, A. F.; SILVA, R. A.; MOURA, R. M.; DREYFUSS, J. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SOUZA, A. C.; TERSARIOL, I. L. S; SANTOS, E. A.; NADER, H. B.; JUSTO, G. Z.; MAURÍCIO, P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63 n. 6, p. 1023-1033, 2009.
- RAMOINO, P.; GALLUS, L.; PALUZZI, S.; RAITERI, L.; DIASPRO, A.; FATO, M.; MANCONI, R. The GABAergic-like system in the marine demosponge *Chondrilla nucula*. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, n. 11, p. 944-951, 2007.
- RUPPERT, E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 205.
- RÜTZLER, K; DURAN, S; PIANTONI, C. Adaptation of reef and mangrove sponges to stress: evidence for ecological speciation exemplified by *Chondrilla caribensis* new species (Demospongiae, Chondrosida). **Marine Ecology**, v. 28, n. s1, p. 95-111, 2007.
- SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 765-769, 1998.
- SCHRODER, H.C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N.L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MULLER, I.M.; MULLER, W.E.G. Emergence and disappearance of a immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **The journal of Biological Chemistry**, v.278, n.35, p.32810-32817, 2003.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition
SHARON, N. Lectins: past, present and future1. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457, 2008.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, p. 175-179, 2000.
- SINGH, AJA Ranjit; ALAGUMUTHU, G. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 234-238, 2012.
- STILLMARK, H. Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen. Thesis, Dorpat, 1888.

SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227, 1936.

VASTA, G. R.; AHMED, H. *Animal Lectins: A Functional View*. **CRC Press**, 2008.

VASTA, G.R.; AHMED, H.; BIANCHET, M.A.; FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J.A.; AMZEL, L.M. Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: Molecular, structural, and biophysical aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, n. 1, p. E14–E26, 2012.

WHITMORE L.; WALLACE B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, p. 392–400, 2008.

XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.143, p.9–16, 2006.

ZELENSKY, A; N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **Febs Journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.