



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

**FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE**

**CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS ESTRUTURAIS E POTENCIAL**  
**ANTIBACTERIANO DE LECTINAS ISOLADAS DAS ESPONJAS MARINHAS**  
*Haliclona (Reniera) implexiformis* E *Aplysina fistularis*

**FORTALEZA**

**2022**

FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS ESTRUTURAIS E POTENCIAL ANTIBACTERIANO  
DE LECTINAS ISOLADAS DAS ESPONJAS MARINHAS

*Haliclona (Reniera) implexiformis* E *Aplysina fistularis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro

FORTALEZA

2022

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)

---

A567c Andrade, Francisco Regivanio Nascimento Andrade.  
Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis* / Francisco Regivanio Nascimento Andrade Andrade. – 2022.  
76 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Poríferos. 2. Proteína. 3. Purificação. 4. Estrutura. 5. Antibacteriano. I. Título.

CDD 660.6

---

FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS ESTRUTURAIS E POTENCIAL ANTIBACTERIANO  
DE LECTINAS ISOLADAS DAS ESPONJAS MARINHAS  
*Haliclona (Reniera) implexiformis* E *Aplysina fistularis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 18 / 02 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

A Deus.

Ao meu pai Messias e minha mãe Eulene, os  
maiores exemplos de vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de minhas forças e conquistas e a São Miguel Arcanjo que guia, guarda e ilumina-me todos os dias.

Agradeço a minha família pelo amor, simplicidade e confiança que deram durante toda a vida. Minhas maiores conquistas foram graças a eles.

Ao meu professor e orientador Alexandre Holanda Sampaio, pela oportunidade que me deu de conhecer e trabalhar com essas moléculas formidáveis. Por sua inspiração como pessoa e profissional durante toda minha vida acadêmica, desde a graduação ao doutorado.

Ao meu coorientador, Rômulo Farias Carneiro, pela oportunidade, apoio, confiança e sua paciência. Tantas vezes me socorreu, incentivou e mostrou que daria tudo certo. Sou grato também pelas conversas, descontrações e gargalhadas nas horas vagas.

Ao meu professor, Celso Shiniti Nagano, por compartilhar seu vasto conhecimento, sua experiência de vida e mostrar que para ser um bom profissional temos que dar nosso melhor e fazer tudo com muita dedicação. Sou grato também pelos momentos de descontrações, principalmente nas idas para o RU.

À Renata Pinheiro Chaves, por ter me apoiado quando cheguei ao grupo e por ter ajudado quando precisei. Por suas contribuições em meus trabalhos. Pelas comemorações de anos de vida, pelo seu zelo e sua preocupação com todos do grupo.

Ao parceiro e amigo, Renato, pelas discussões de experimentos e também discussões de vida pessoal, pelos momentos de piada, descontração e treino.

Ao meu amigo Philippe, pela ajuda na bancada, pelas brincadeiras, treino, por compartilhar bons momentos da vida acadêmica e pessoal.

Às amigas e companheiras Juliana, Andressa e Jéssica. Obrigado pelo incentivo de vocês, pelas conversas pessoais e risadas. São amigas que levarei para o resto da vida. Obrigado Andressa pela ajuda primordial quando precisei.

Aos ICs Pedro Arthur e Levi Oton, pelo auxílio durante os experimentos e por sua dedicação. Pelos momentos de risadas e descontração nas horas vagas.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar-Lab.

A todos amigos e irmãos Vinícius Alves, Victor Neves, Átila Teixeira, Elder Lima, Wellington Gomes, Hilário Sousa, Karolina Costa e João Eudes.

Ao Prof. Mayron Alves e Me. Alexandre Lopes que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e parceria com nosso grupo de pesquisa. Por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Prof<sup>a</sup> Francisca Gleire Rodrigues de Menezes pela disponibilidade de participar dessa banca e por suas contribuições desde a qualificação.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais e ao secretário Renato pelo excelente trabalho.

Ao Restaurante Universitário que nos fornecia uma boa alimentação e nos propiciou um ambiente de alegrias e descontrações.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Capes, pelo financiamento deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

As esponjas são os animais aquáticos mais primitivos do planeta e nas últimas décadas têm se destacado na área biotecnológica por produzirem uma variedade de moléculas com características estruturais únicas e apresentarem potencial para fornecer futuros medicamentos contra doenças humanas, dentre as moléculas produzidas estão as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune capazes de ligar-se reversivelmente a carboidratos sem alterar sua estrutura. O objetivo desse trabalho foi purificar, caracterizar bioquimicamente e estruturalmente lectinas presentes em duas esponjas encontradas no litoral cearense, *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis*, e a partir do isolamento avaliar seu potencial antibacteriano contra cepas patogênicas. Ambas lectinas foram purificadas em matriz de Sepharose™ e denominadas HiL (*Haliclona implexiformis lectin*) e AfiL (*Aplysina fistulares lectin*). HiL apresentou atividade hemaglutinante e foi inibida principalmente por galactosídeos e PSM (mucina de estômago suíno), sendo mais ativa em pH alcalino com resistência em pH ácido e não sofreu total desnaturação em temperaturas de até 60°C. Os resultados predizem que a lectina é um dímero ligado por ligações dissulfeto com massa molecular média de  $35.876 \pm 2$ Da e com predominância de conformação  $\beta$ . A estrutura primária de HiL foi parcialmente determinada e não apresentou semelhança com qualquer proteína. HiL mostrou redução significativa no número de células viáveis de biofilmes de *Staphylococcus* e foi capaz de causar aglutinação de *S. aureus*. Já em relação a AfiL, houve inibição da atividade hemaglutinante por derivados de galactose com ligação do tipo Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 e PSM. A lectina mostrou-se ativa em pH alcalino, resistente a temperaturas de até 80°C, massa estimada de 224 kDa na conformação nativa, e apresentou estrutura secundária predominante de conformação  $\beta$  e estruturas desordenadas. A estrutura primária de AfiL foi parcialmente determinada, não apresentou semelhança com nenhum membro das famílias de lectina animal, no entanto, mostrou 33,33% de identidade e 69,26% de similaridade com uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha *Amphimedon queenslandica*. AfiL inibiu a formação do biofilme de cepas de bactérias gram-negativas e gram-positivas, causou também efeito bacteriostático em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina e tetraciclina. Assim, duas novas lectinas de esponjas marinhas foram descobertas, caracterizadas e constatado seu potencial antibacteriano, fazendo-se importante para o avanço biotecnológico dos recursos naturais marinhos com potencial biomédico.

**Palavras-chave:** poríferos; proteína; purificação; estrutura; antibacteriano.

## ABSTRACT

Sponges are the most primitive aquatic animals on the planet and in recent decades they have stood out in the biotechnological area for producing a variety of molecules with unique structural characteristics and presenting the potential to provide future medicines against human diseases, among the molecules produced are lectins, which are proteins or glycoproteins of non-immune origin capable of reversibly binding carbohydrates without altering their structure. The objective of this work was to purify, biochemically and structurally characterize lectins present in two sponges found in the coast of Ceará, *Haliclona (Reniera) implexiformis* and *Aplysina fistularis*, and from the isolation evaluate their antibacterial potential against pathogenic strains. Both lectins were purified on a Sepharose™ matrix and named HiL (*Haliclona implexiformis* lectin) and AfiL (*Aplysina fistularis* lectin). HiL showed hemagglutinating activity and was inhibited mainly by galactosides and PSM (porcine stomach mucin), being more active at alkaline pH with resistance at acidic pH and did not undergo total denaturation at temperatures up to 60°C. The results predict that the lectin is a disulfide-linked dimer with an average molecular mass of  $35,876 \pm 2$ Da and with a predominance of  $\beta$  conformation. The primary structure of HiL was partially determined and showed no similarity to any protein. HiL showed a significant reduction in the number of viable *Staphylococcus* biofilm cells and was able to cause *S. aureus* agglutination. In relation to AfiL, there was inhibition of the hemagglutinating activity by galactose derivatives with Gal $\beta$ 1→4 and PSM binding. The lectin was active at alkaline pH, resistant to temperatures up to 80°C, estimated mass of 224 kDa in the native conformation, and presented a predominant secondary structure of  $\beta$  conformation and disordered structures. The primary structure of AfiL was partially determined, it showed no similarity with any member of the animal lectin families, however, it showed 33.33% identity and 69.26% similarity with a putative protein encoded in the genome of the marine sponge *Amphimedon queenslandica*. AfiL inhibited the biofilm formation of strains of gram-negative and gram-positive bacteria, and also caused a bacteriostatic effect on methicillin- and tetracycline-resistant *S. aureus* strains. Thus, two new lectins from marine sponges were discovered, characterized and verified their antibacterial potential, making it important for the biotechnological advance of marine natural resources with biomedical potential.

**Keywords:** porifera; protein; purification; structure; anti-bacterial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Publicação de trabalhos acadêmicos e patentes sobre a descoberta de compostos derivados de esponjas marinhas.....	15
Figura 2 – Lectinas envolvidas na interação célula-célula e na interação molécula durante o processo de espiculogênese.....	17
Figura 3 – Classificação de galectinas.....	19
Figura 4 – Formação do Biofilme bacteriano.....	21
Figura 5 – Cromatografia de afinidade de HiL.....	34
Figura 6 – Propriedades da atividade hemaglutinante de HiL.....	36
Figura 7 – Eletroforese SDS-PAGE e cromatografia de exclusão por tamanho de HiL.	37
Figura 8 – Determinação da massa molecular de HiL por ESI –MS.....	38
Figura 9 – Estrutura primária de HiL parcialmente obtida por sobreposição de peptídeos.....	39
Figura 10 – Espectro de dicroísmo circular de HiL.....	40
Figura 11 – Determinação da T <sub>m</sub> de HiL a partir de mudanças em DC em função da temperatura.....	40
Figura 12 – Atividade de HiL contra a formação de biofilme de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	41
Figura 13 – Enumeração de células viáveis aprisionadas ao biofilme.....	42
Figura 14 – Aglutinação de <i>S. aureus</i> por HiL.....	42
Figura 15 – Cromatografia de afinidade e SDS-PAGE de AfiL.....	55
Figura 16 – Cromatografia de exclusão por tamanho de AfiL.....	56
Figura 17 – Propriedades da atividade hemaglutinante de AfiL.....	57
Figura 18 – Estrutura primária de AfiL parcialmente obtida por sobreposição de peptídeos.....	59
Figura 19 – Alinhamento da estrutura de AfiL, parcialmente obtida por MS/MS, com	

uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha <i>Amphimedon queenslandica</i> .....	58
Figura 20 – Espectro de dicroísmo circular de AfiL.....	60
Figura 21 – Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas <i>S. aureus</i> .....	61
Figura 22 – Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas <i>S. epidermidis</i> .....	62
Figura 23 – Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas <i>E. coli</i> .....	63
Figura 24 – Aglutinação de <i>S. aureus</i> por AfiL.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha <i>H. implexiformis</i> .....	34
Tabela 2 – Inibição da atividade hemaglutinate de HiL.....	35
Tabela 3 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de HiL.....	39
Tabela 4 – Tabela de purificação de AfiL.....	55
Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinate de AfiL.....	56
Tabela 6 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de AfiL.....	58

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Poríferos: características gerais</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Produtos naturais de esponjas marinhas</b> .....	15
<b>1.3</b>	<b>Aspectos gerais de lectinas de esponjas marinhas</b> .....	17
<b>1.4</b>	<b>Biofilmes e potencial antibacteriano de lectinas de esponjas</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Objetivo específico</b> .....	24
<b>3</b>	<b>NOVA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA TROPICAL <i>Haliclona</i> (<i>Reniera</i>) <i>implexiformis</i> (HECHTEL, 1965) COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO</b> .....	25
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	25
<b>3.2</b>	<b>Metodologia experimental</b> .....	25
<b>3.2.1</b>	<b><i>Material biológico</i></b> .....	25
<b>3.2.2</b>	<b><i>Extração e purificação da lectina</i></b> .....	26
<b>3.2.3</b>	<b><i>Atividade hemaglutinante e teste de inibição da atividade</i></b> .....	26
<b>3.2.4</b>	<b><i>Efeito do pH, temperatura, EDTA e íon Ca<sup>2+</sup></i></b> .....	27
<b>3.2.5</b>	<b><i>Estimativa e determinação da massa molecular</i></b> .....	28
<b>3.2.6</b>	<b><i>Quantificação de grupos sulfidrilas</i></b> .....	29
<b>3.2.7</b>	<b><i>Determinação da estrutura primária</i></b> .....	29
<b>3.2.7.1</b>	<b><i>Determinação da extremidade N-terminal</i></b> .....	29
<b>3.2.7.2</b>	<b><i>Determinação de sequências internas por espectrometria de massas (MS/MS)</i></b> .....	30
<b>3.2.8</b>	<b><i>Análise de dicroísmo circular (DC)</i></b> .....	31
<b>3.2.9</b>	<b><i>Aglutinação de bactérias e atividade antibacteriana</i></b> .....	31
<b>3.2.9.1</b>	<b><i>Cepas e condições de cultura</i></b> .....	31
<b>3.2.9.2</b>	<b><i>Aglutinação bacteriana</i></b> .....	32
<b>3.2.9.3</b>	<b><i>Efeito da lectina no crescimento celular planctônico</i></b> .....	32
<b>3.2.9.4</b>	<b><i>Efeito da lectina na formação de biofilme</i></b> .....	32
<b>3.2.9.5</b>	<b><i>Ensaio de biofilme: quantificação de biomassa e quantificação de células viáveis aprisionadas</i></b> .....	33

3.2.9.6	<i>Análise estatística</i> .....	35
<b>3.3</b>	<b>Resultados</b> .....	34
3.3.1	<i>Isolamento da lectina</i> .....	34
3.3.2	<i>Inibição da atividade hemaglutinante de HiL por açúcares e glicoproteínas</i> .....	35
3.3.3	<i>Efeitos do pH, temperatura e cátion divalente na atividade hemaglutinante de HiL</i> .....	36
3.3.4	<i>Massa molecular</i> .....	37
3.3.5	<i>Sequenciamento de aminoácidos</i> .....	38
3.3.6	<i>Dicroísmo circular</i> .....	40
3.3.7	<i>Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias</i> .....	41
<b>3.4</b>	<b>Discussão</b> .....	42
<b>4</b>	<b>EFEITO ANTIBACTERIANO DE UMA NOVA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA MARINHA <i>Aplysina fistulares</i></b> .....	47
4.1	<b>Introdução</b> .....	47
4.2	<b>Metodologia experimental</b> .....	48
4.2.1	<i>Coleta dos animais e preparação do extrato</i> .....	48
4.2.2	<i>Purificação da lectina</i> .....	48
4.2.3	<i>Atividade hemaglutinante e ensaio de inibição</i> .....	48
4.2.4	<i>Estimativa e determinação da massa molecular</i> .....	50
4.2.5	<i>Determinação da estrutura primária por espectrometria de massa (MS/MS)</i> .....	50
4.2.6	<i>Análise de dicroísmo circular (DC)</i> .....	51
4.2.7	<i>Aglutinação de bactérias e atividade antibacteriana</i> .....	52
4.2.7.1	<i>Cepas e condições de cultura</i> .....	52
4.2.7.2	<i>Aglutinação bacteriana</i> .....	52
4.2.7.3	<i>Efeito da lectina no crescimento celular planctônico</i> .....	53
4.2.7.4	<i>Efeito da lectina na formação de Biofilme</i> .....	53
4.2.7.5	<i>Ensaio de biofilme: quantificação de biomassa e quantificação de células viáveis aprisionadas</i> .....	53
4.2.7.6	<i>Análise estatística</i> .....	54
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b> .....	54
4.3.1	<i>Purificação e estimativa da massa de AfiL</i> .....	54

4.3.2	<i>Inibição da atividade hemaglutinante de AfiL</i> .....	56
4.3.3	<i>Efeitos do pH, temperatura e cátion divalente na atividade hemaglutinante de AfiL</i> .....	57
4.3.4	<i>Sequenciamento de aminoácidos</i> .....	57
4.3.5	<i>Dicroísmo circular</i> .....	59
4.3.6	<i>Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias</i> .....	60
4.4	<b>Discussão</b> .....	63
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Poríferos: características gerais

O filo Porifera compreende os animais invertebrados mais antigos do planeta, informalmente chamados de esponjas. Estes possuem várias cores, formas e tamanhos, variando de milímetros a metros de comprimentos e largura. Apesar de serem organismos multicelulares, apresentam pouca diferenciação tecidual e uma organização celular muito simples caracterizada por uma morfogênese contínua (MANCONI; PRONZATO, 2015; PECHENIK, 2016).

Esses organismos são encontrados em regiões tropicais, temperadas e polares, habitando quase todos os oceanos e águas continentais. A distribuição vertical varia de recifes rasos a grandes profundidades (PECHENIK, 2016).

As esponjas são animais sésseis e uma característica marcante é a capacidade de filtração. Possuem um sistema aquífero dotado de células flageladas capazes de gerar correntes de água que atravessa seus poros, carreando uma grande variedade de partículas utilizadas para sua alimentação. Além de garantir funções nutritivas, o sistema aquífero está envolvido também em outras funções fisiológicas vitais, como reprodução e excreção (HESTETUN; TOMPKINS-MACDONALD; RAPP, 2017).

As esponjas são desprovidas de cavidade digestiva e gônadas, e apesar da falta de neurônios e músculos, elas têm a capacidade de reagir a mudanças ambientais (MANCONI; PRONZATO, 2015).

Do ponto de vista ecológico, são refúgios vivos para uma grande variedade de organismos, além de realizarem simbiose com microrganismos autotróficos que atua na produtividade primária dos oceanos. Contribuem para formação de sedimentos após sua morte, por possuírem um esqueleto silicoso e limpam grandes quantidades de água interceptando matéria orgânica particulada e dissolvida. No ciclo alimentar, as esponjas têm a função de fornecer alimento para diversos tipos de peixes e tartarugas (MANCONI; PRONZATO, 2015; PECHENIK, 2016).

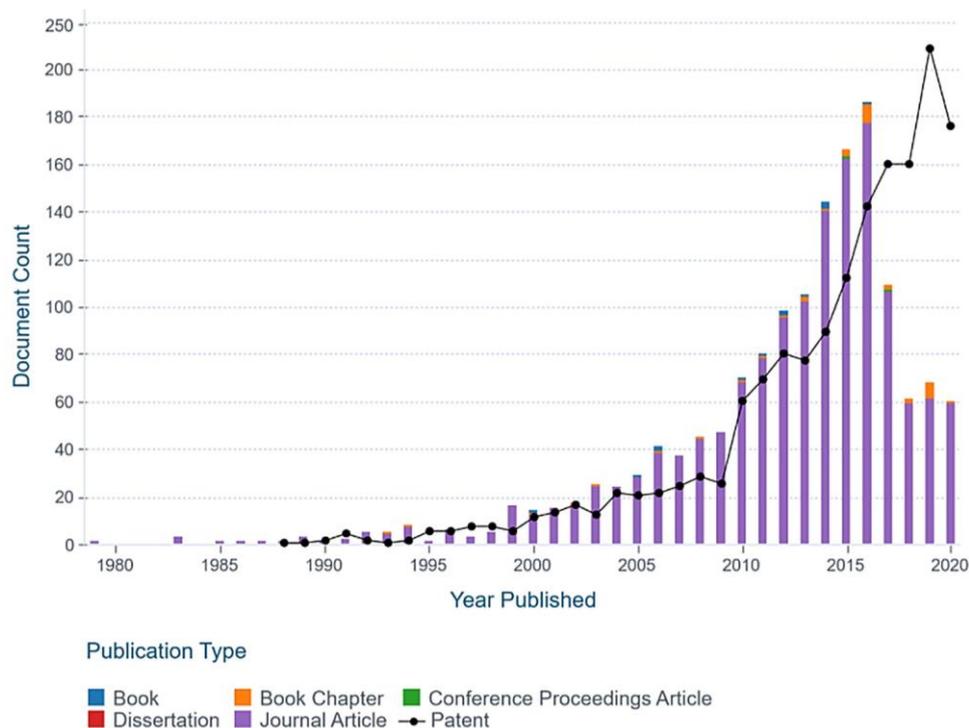
Atualmente este filo está dividido em 4 classes (Demospongiae, Calcarea, Homoscleromorpha e Hexactinellida), 25 ordens, 128 famílias e 680 gêneros. Existem aproximadamente 9.442 espécies válidas, sendo cerca de 600 espécies encontradas no Brasil. (DE VOOGD *et al.*, 2021; MURICY, 2021). Desse total, são catalogadas 494 espécies pertencentes a classe Demospongiae apresentando grande distribuição na região nordeste e

sudeste da costa brasileira. Ao contrário das outras classes de esponjas, cujos membros são todos marinhos, alguns membros da classe Demospongiae podem ser encontrados em águas continentais (MURICY, 2021; PECHENIK, 2016).

## 1.2 Produtos naturais de esponjas marinhas

Nas últimas décadas, a química de produtos naturais derivados de esponjas marinhas tornou-se foco de pesquisa na área biotecnológica e a busca por esses compostos aumentou consideravelmente (Figura 1). Isto é devido em grande parte, ao crescente reconhecimento desses organismos como fonte de compostos com potencial farmacêutico e biomédico para combater microrganismos causadores de doenças humanas e outras enfermidades (CARROLL *et al.*, 2019; VARIJAKZHAN *et al.*, 2021 ).

Figura 1- Publicação de trabalhos acadêmicos e patentes sobre a descoberta de compostos derivados de esponjas marinhas



Fonte: VARIJAKZHAN *et al.*, 2021. Publicação de trabalhos acadêmicos e patentes que relataram a descoberta e/ou aplicações de compostos bioativos derivados de esponjas marinhas recuperados de <https://www.lens.org/> usando palavras-chave “esponja marinha” e “compostos bioativos”.

Em 1950 os nucleosídeos espongotimidina e espongouridina, isolados da esponja marinha *Tectitethya crypta*, deram o passo inicial para despertar o interesse de indústrias farmacêuticas e pesquisadores pela busca por moléculas extraídas de esponjas e outros

organismos marinhos. Com o passar dos anos, essa busca por novos compostos produzidos pelos poríferos aumentou consideravelmente, como observado no levantamento realizado por Varijakzhan e colaboradores (2021).

O espongotimidina e esponouridina formaram a base para a síntese do primeiro agente antiviral adenina-arabinosídeo (ara-A), utilizado até os dias atuais para o tratamento de *Herps simplex* e *Herps zoster*, e o anticâncer citosina-arabosídeo (ara-C), utilizado atualmente no tratamento de pacientes com leucemia e linfoma, comercializados como Vidarabina® e Citarabina®, respectivamente (VARIJAKZHAN *et al.*, 2021).

Em 2010, o análogo do poliéter macrocíclico halicondrina B e o antineoplásico mesilato de eribulina Halaven® extraídos da esponja *Halichondria okadai*, passaram a ser utilizados para o tratamento do câncer de mama metastático. Um outro fármaco aprovado para o uso clínico em 2015 foi o análogo sintético da psammaplina A, Panobinostat (Farydak®), indicado a portadores de linfoma e isolado da esponja marinha *Psammaplysina* sp. (EL-DEMERDASH *et al.*, 2019; MOORE, 2016).

Várias outras substâncias oriundas de esponjas estão em fases de testes clínicos e pré-clínicos, como por exemplo: o geodisterol sulfato um peptídeo antifúngico de *Topsentia* sp., e o ácido homogentísico de *Pseudoceratina* sp., ambos para o tratamento contra a malária. Dysidina e Dysideamina, ambos terpenos isolados de *Dysidea* sp., que agem contra o diabetes e doenças do sistema nervoso e Hymenidina um alcaloide de *Axinella* sp. utilizado no combate a tuberculoses (GIANNINI *et al.*, 2001; LEBOUVIER *et al.*, 2009; MALVE, 2016; SUNA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012).

Um outro fato que chama a atenção é a variedade química de novos compostos descobertos com grande potencialidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre muitos isolados estão: nucleosídeos, esteróis, alcalóides, ácidos graxos, glicolipídios, derivados de aminoácidos, peptídeos e proteínas (lectinas). Essas moléculas apresentam diversas atividades farmacológicas como anticâncer, antifúngico, antiviral, anti-helmíntico, antiprotozoário, anti-inflamatório, agente modulador, imunossupressor e neurosupressor (ANJUM *et al.*, 2016; CARROLL *et al.*, 2019; ERCOLANO; DE CICCIO; IANARO, 2019). Em meio a esses compostos, as lectinas de esponjas têm se destacado devido seu potencial biomédico (GARDÈRES *et al.*, 2015).

A lectina de *Chondrilla nucula* demonstrou retardar o desenvolvimento do vírus HIV-I (SCHRÖDER *et al.*, 1990). A lectina isolada de *Cinachyrella* sp. produziu efeito modulador em receptores de glutamato (UEDA *et al.*, 2013). A lectina presente em *Haliclona caerulea* (H-3) e de *H. manglares* (HMA) exibiram efeito antioxidante contra a oxidação e

branqueamento do  $\beta$ -caroteno e na quelatção de íons ferrosos (CARNEIRO *et al.*, 2013a; CARNEIRO *et al.*, 2015). H-3 também foi capaz de induzir a apoptose de células de câncer de mama humano da linhagem MCF7 (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018).

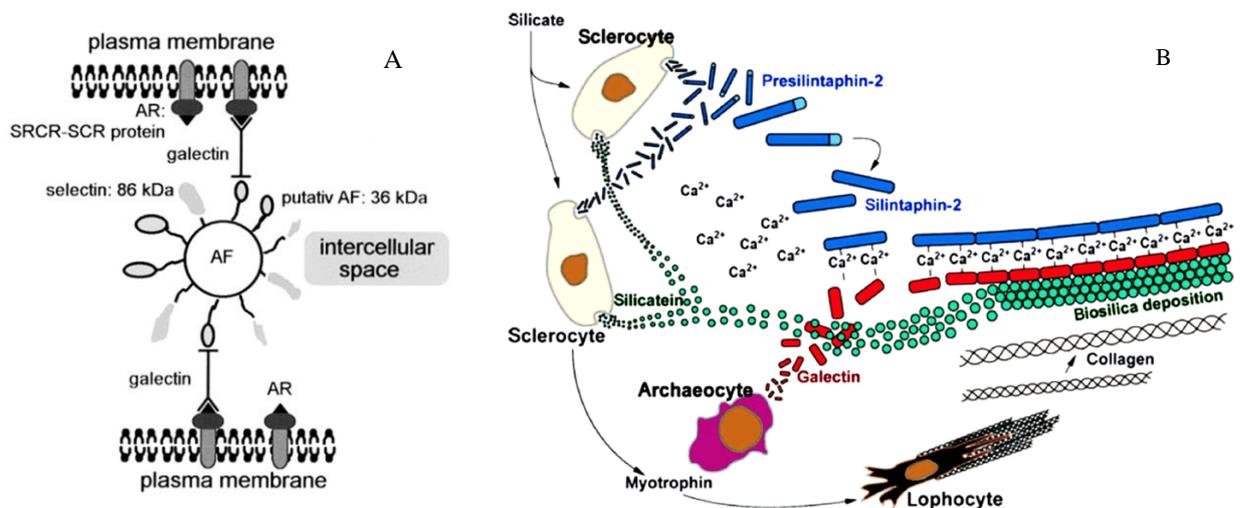
Lectinas isoladas de *A. fulva* (AFL) e *Aplysina lactuca* (ALL) mostraram efeitos antibacterianos contra bactérias gram-negativa e gram-positiva (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019). A lectina de *A. cauliformis*, ACL, e a CCL, de *Chondrilla caribensis*, causaram aglutinação de células bacterianas (MARQUES *et al.*, 2018; VIANA, 2021). CCL também apresentou atividade leishmanicida (SOUSA *et al.*, 2021).

### 1.3 Aspectos gerais de lectinas de esponjas marinhas

Por definição, as lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam reversivelmente a carboidratos sem alterar a estrutura dos mesmos (VASTA; AHMED, 2009). Muitas são encontradas em animais e sua principal função está relacionada a imunidade inata. Elas atuam na defesa direta, reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico, na regulação imune e prevenção autoimune (KILPATRICK, 2002).

No que concerne a funções fisiológicas das lectinas conferidas as esponjas estão o seu envolvimento na morfogênese e interações celulares, espiculogênese, defesa ou comunicação com microrganismos associados (Figura 2) (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Figura 2- Lectinas envolvidas na interação célula-célula e na interação molecular durante o processo de espiculogênese



Fonte: GARDÈRES *et al.*, 2015. A - A proteína galectina medeia a ligação entre o receptor de agregação (AR) e o fator de agregação (AF). B - Moléculas de galectina se associam na presença de Ca<sup>2+</sup> para formar uma rede que permite a ligação do silicato. O complexo galectina-silicateína é arranjado em torno das espículas durante seu processo de formação.

Dentre outras funções, em animais, essas proteínas podem estar envolvidas na embriogênese, desenvolvimento de larvas e mediação de simbiose entre o hospedeiro e seu simbiote (KITA *et al.*, 2015; MOTOHASHI *et al.*, 2017).

Podem atuar também como mediadores de reconhecimento e comunicação celular, ativar células através de diferentes vias de sinalização intracelular, interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e serem capazes de decodificar informações contida no glicocódigo (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas de animais são classificadas estruturalmente em famílias. Atualmente existem pelo menos 19 famílias de lectinas identificadas, são elas: Lectinas do tipo-C, -F, F-Box, -H, -I, -L, -M, -P, -R, -S, -X, tipo Quitinase, Anexinas, Calnexina e Calreticulina, Ficolina, Pentraxina, Tachylectinas e Lectinas Ligantes de Ramnose. Todas são classificadas com base em sua estrutura primária, especificidade à carboidratos e função (CARNEIRO, 2013).

Atualmente a literatura relata 44 lectinas isoladas de esponjas, todas pertencentes a classe Demospongie, com exceção de uma lectina isolada de *Aphrocallistes vastus*, da classe Hexatinelida e uma isolada de *Clathrina clathrus*, da classe Calcarea. Essas lectinas geralmente incluem-se nas famílias das lectinas do tipo C, Tachylectinas ou tipo S (galectinas) e 24 não se encaixam em nenhum desses grupos (CARNEIRO *et al.*, 2019; GARDÈRES *et al.*, 2015; GARDÈRES *et al.*, 2016; VIANA, 2021).

A família das lectinas do tipo C possui domínio lectínico do tipo C (CTLDS), este é caracterizado por apresentar uma alça dupla, estabilizado por interações hidrofóbicas, polares e por duas pontes dissulfeto no segundo *loop*, conservadas em sua base (ZELENSKY; GREASY, 2005). A lectina de *Aphrocallistes vastus* (AVL) pertence a esse grupo e sua expressão exógena em ratos mostrou atividade anticancerígena (WU *et al.*, 2019).

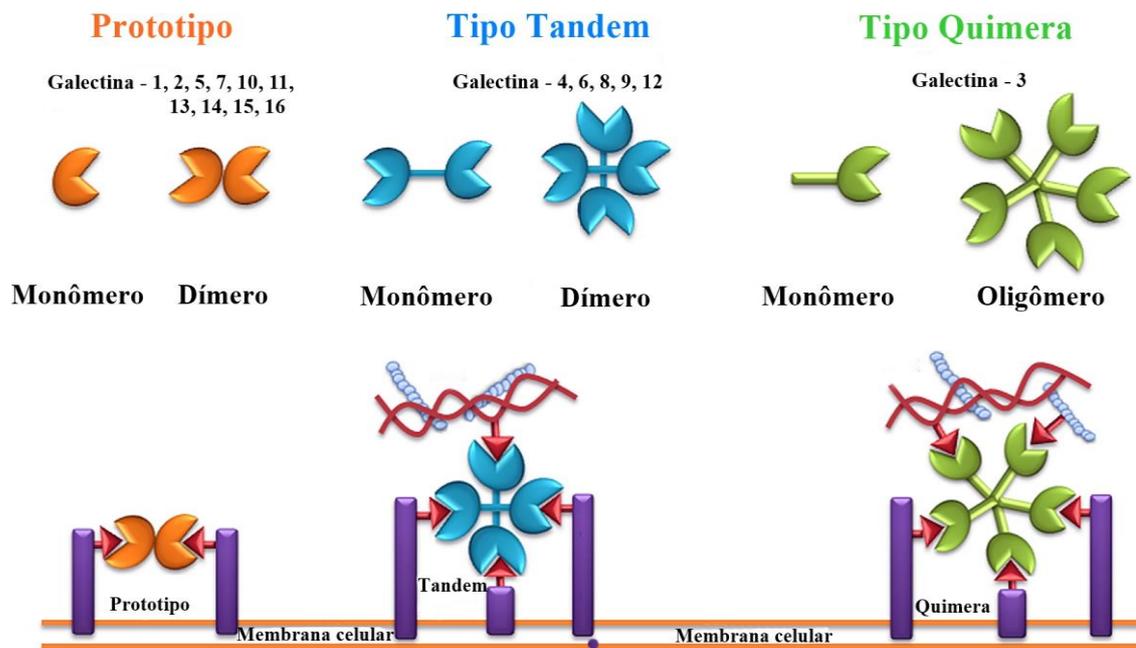
A família das Tachylectinas é caracterizada por seis repetições internas em *tandem* com habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (KILPATRICK, 2002). A lectina Sd extraída de *Suberites domuncula* compartilhou alta semelhança de sequência com a lectinas L6 do caranguejo ferradura *Tachypleus trunculus* (SCHRÖDER *et al.*, 2003).

A família das lectinas do tipo S, também chamadas de Galectinas, é específica a resíduos de galactosídeos. Estão divididas em 3 subfamílias com base em sua estrutura: prototipo, tipo *tandem* e tipo quimera (SEYREK; RICHTER; LAVRIK, 2019)

As galectinas prototipo, que apresentam um único Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD) por polipeptídeo e geralmente formam dímeros, são representadas por

Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -16, enquanto que as galectinas do tipo repetição em *tandem*, exibem dois CRDs em *tandem*, representados por Gal-4, -6, -8, -9 e -12 e finalmente as galectinas do tipo quimera, onde o CRD é fundido a outro domínio não lectínico, pode gerar oligômero e é representado por Gal-3 (Figura 3) (SEYREK; RICHTER; LAVRIK, 2019).

Figura 3- Classificação de galectinas



Fonte: Adaptado de SEYREK, RICHTER & LAVRIK, 2019.

Por meio de seus CRDs, as galectinas podem interagir com carboidratos à base de poli-*N*-acetilactosamina (Gal- $\beta$ (1-4)-GlcNAc, LacNAc) presentes em proteínas, lipídios ou outras moléculas (SEYREK; RICHTER; LAVRIK, 2019).

As galectinas encontradas em esponjas podem criar grandes complexos moleculares na presença de cálcio e apresentam uma grande afinidade por açúcares contendo *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) (GARDÈRES *et al.*, 2015). As lectinas CchG 1 e CchG 2 de *Cinachyrella* sp. mostraram alta afinidade por GalNAc e apresentaram uma estrutura típica de prototipo. Essa lectina possui potencial efeito modulador em receptores de glutamato de mamíferos o que sugeriu desempenhar um papel importante no sistema nervoso central (UEDA *et al.*, 2013). A CCL de *Chondrilla caribensis* mostrou possuir uma estrutura típica de galectina, que consiste em um  $\beta$ -sanduíche, exibindo aglutinação de células bacterianas e apresentou potencial antitumoral e leishmanicida (SOUSA *et al.*, 2021).

Gardères *et al.* (2015) propuseram agrupar as lectinas que não se encaixem nas famílias acima nos seguintes grupos: lectinas contendo ponte de dissulfeto intracadeia, lectinas de ligação à mucina, lectinas de ligação a *N*-acetil-D-glucosamina/*N*-acetil-D-galactosamina e grupo diversos.

As lectinas isoladas de *Axinella polypoides* (ApL I e ApLII) possuem uma ligação dissulfeto intracadeia, importante para estabilidade e atividade de ligação com os carboidratos (BUCK *et al.*, 1998). A atividade hemaglutinante de H-3 e H-2 foi inibida por mucina do estômago porco (CARNEIRO *et al.*, 2013a; CARNEIRO *et al.*, 2013b). A AcL I, uma lectina de *A. corrugata*, mostrou alta afinidade a carboidratos *N*-acetilados, como *N*-acetil-D-galactosamina, mas não se ligou a galactose simples (DRESCH *et al.*, 2008).

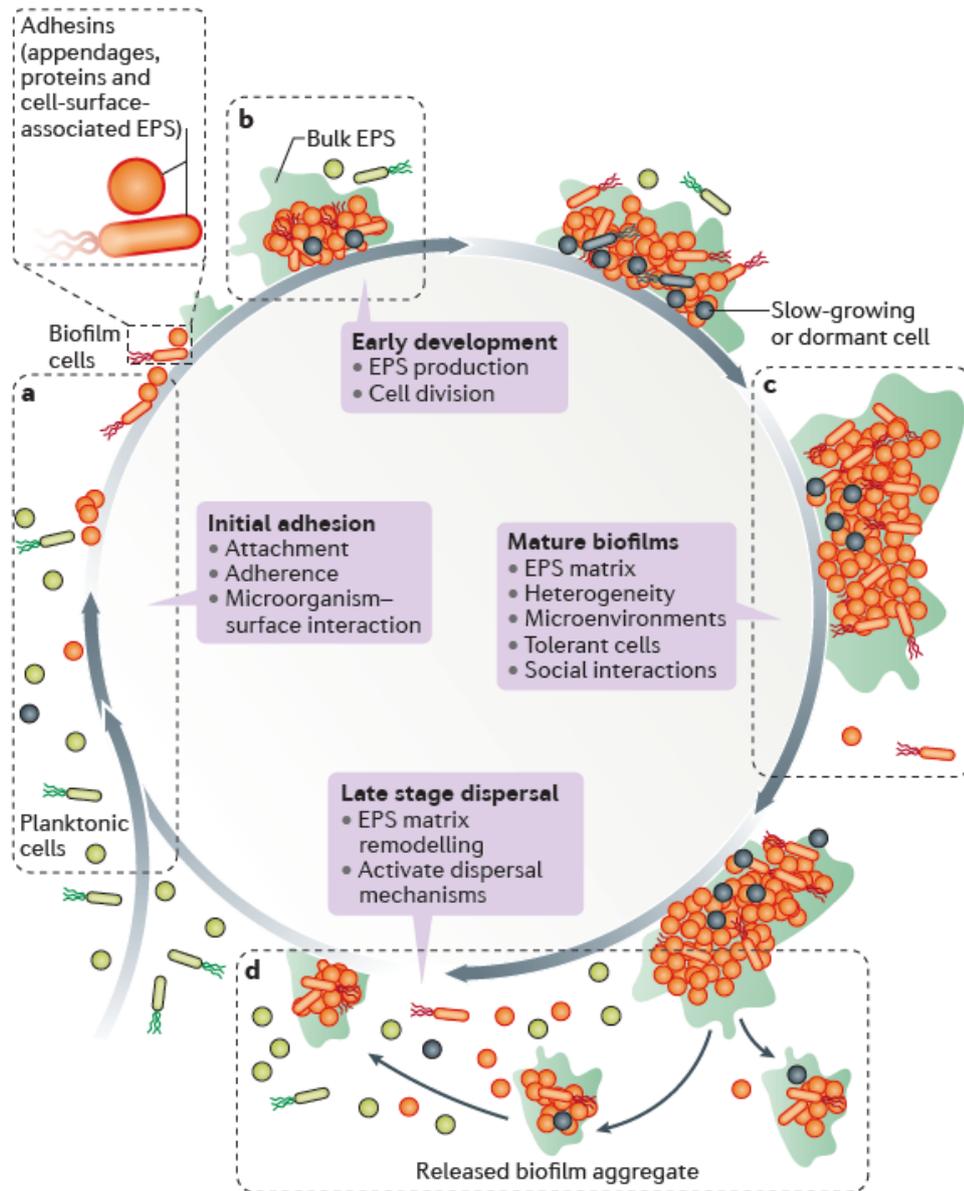
#### **1.4 Biofilmes e potencial antibacteriano de lectinas de esponjas**

Apesar do grande número de agentes antibacterianos disponíveis comercialmente com um amplo espectro, as bactérias frequentemente desenvolvem fatores de virulência relacionados à resistência antimicrobiana, sendo um deles a formação de biofilme (COELHO *et al.*, 2018). Esse tem se tornado um grande problema médico devido à falha dos antibióticos em eliminá-los com sucesso, e por ser um importante fator de virulência, uma vez que o sistema imunológico nem sempre é capaz de erradicá-los (VILA *et al.*, 2016).

A formação de biofilme ocorre em quatro estágios principais: fixação bacteriana a uma superfície, formação de microcolônia, maturação do biofilme e dispersão de bactérias, onde estas podem então colonizar novas áreas (CROUZET *et al.*, 2014).

Inicialmente, as células em estado planctônico aderem-se a uma superfície biótica ou abiótica, passam por mudanças físicas que envolvem regulação negativa da motilidade, enquanto regulam positivamente a produção de uma matriz extracelular complexa composta de exopolissacarídeos, DNA e proteínas, onde lá amadurecem. Essa matriz desempenha um papel fundamental, formando um arcabouço interativo para apoiar a arquitetura do biofilme e facilitar a comunicação célula-célula (Figura 4) (MAUNDERS; WELCH, 2017; KOO *et al.* 2017).

Figura 4 – Formação do biofilme bacteriano



Fonte: KOO *et al.* 2017. Etapas de formação do biofilme. (a) fixação bacteriana a uma superfície, (b) formação de microcolônia, (c) maturação do biofilme e (d) dispersão de bactérias.

O biofilme pode alcançar maior resistência aos antibióticos por meio de beta-lactamases (enzimas degradantes de antibióticos), bombas de efluxo e certos produtos gênicos cuja expressão é alterada pelo *Quorum Sensing* em resposta ao estresse bacteriano (KIRMUSAOĞLU, 2017; MAUNDERS; WELCH, 2017).

Algumas estratégias terapêuticas são utilizadas para reduzir a formação do biofilme, dentre elas: modificar a estrutura de aderência (inibição inespecífica), bloquear ou inibir a síntese de adesinas (inibição específica), bloquear seu processo de maturação por vias de sinalizações e realizar uma ação direta sobre os componentes da matriz. Este último com o

objetivo de enfraquecer os biofilmes já formados (Figura 4) (BELOIN *et al.*, 2014).

Algumas lectinas de esponja exibem atividade sob a formação de biofilmes formados por bactérias gram-negativas e gram-positivas. Não se sabe ao certo em que mecanismo as lectinas atuam para inibir ou reduzir a formação de biofilmes, mas dados evidenciam seu potencial biotecnológico como possível ferramenta terapêutica (CARNEIRO *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018). Além de atuarem sob a formação de biofilmes, algumas causam aglutinação direta em determinadas cepas patogênicas, papel este realizado por anticorpos (JEMILOHUN; ADEYANJU; BELLO, 2017).

A CCL de *Chondrilla caribensis* foi capaz de aglutinar *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* e reduzir a biomassa total do biofilme por elas produzido (MARQUES *et al.*, 2018). A CvL isolada de *Cliona varians* apresentou atividade antibacteriana, inibindo 90% do crescimento de *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (MOURA *et al.*, 2006). Já Sd isolada de *Suberites domunculadis* possuiu um efeito antibacteriano mais efetivo contra as bactérias da espécie *E. coli* do que contra *S. aureus* (SCHRÖDER *et al.*, 2003). A lectina isolada de *Aplysina lactuca* (ALL) aglutinou células bacterianas *S. aureus* e *E. coli* e reduziu significativamente a biomassa de ambos os biofilmes bacterianos (CARNEIRO *et al.*, 2017a). AFL de *A. fulva* reduziu a biomassa de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. A lectina afetou também o número de células viáveis destas bactérias (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Como observado, a maioria das bactérias destacadas nos ensaios com lectinas de esponjas pertencem ao gênero *Staphylococcus*. Este possui uma camada espessa de peptídeoglicano, ácidos teicóicos e fosfato, e são microbiologicamente caracterizados como gram-positivos (TONG *et al.*, 2015; WIDERSTRÖM, 2016).

O *S. aureus* é uma espécie perigosa que pode causar graves infecções, particularmente em pessoas debilitadas por doenças crônicas, lesões traumáticas, queimaduras ou imunossupressão e é também um dos principais responsáveis por infecções hospitalares de feridas cirúrgicas e, com *S. epidermidis*, causam infecções associadas a dispositivos médicos implantados (sondas, próteses articulares, dispositivos cardiovasculares e válvulas cardíacas artificiais) (TONG *et al.*, 2015; WIDERSTRÖM, 2016).

A bactéria *E. coli*, também se destaca em testes com lectinas. É uma bactéria gram-negativa, possui uma fina camada de peptídeoglicano no espaço periplasmático e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos (LPS). São amplamente estudadas e isoladas com maior frequência em laboratórios de microbiologia clínica por ser um dos principais patógenos causadores de infecções da corrente sanguínea e infecções do trato

urinário. Apesar de ser um comum habitante do trato gastrointestinal humano, apresentam enteropatogenicidade, além de infectar sítios extraintestinais e causar, por exemplo, meningite, infecções na pele e respostas inflamatórias sistêmicas (VILA *et al.*, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Purificar, caracterizar bioquimicamente e estruturalmente lectinas presentes em *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis*, esponjas marinhas coletadas no litoral cearense, e avaliar seu potencial antibacteriano.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar as lectinas presentes nos extratos de *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis*;
- Caracterizar as lectinas quanto as suas propriedades bioquímicas avaliando os efeitos de pH, temperatura e dependência de íons metálicos na atividade hemaglutinante;
- Determinar suas massas moleculares;
- Avaliar a especificidade de ligação a carboidratos e glicoproteínas;
- Quantificar a estrutura secundária por Dicroísmo Circular;
- Determinar a sequência de aminoácidos por sobreposição de peptídeos sequenciados por espectrometria de massas (MS/MS);
- Avaliar o efeito antibacteriano das lectinas sobre bactérias patogênicas humanas.

### **3 NOVA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA TROPICAL *Haliclona (Reniera) implexiformis* (HECHTEL, 1965) COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO**

#### **3.1 Introdução**

As esponjas marinhas são organismos multicelulares, sésseis e filtradores, pertencentes ao filo Porifera, o mais antigo dos Metazoários (PECHENIK, 2016). O gênero *Haliclona*, pertence à família Chalinidae e abriga organismos com morfologia simples e variável, de múltipla consistência, incluindo formas eretas, de tubo e ramificadas, macias e frágeis, firmes e elásticas (FROMONT; ABDO, 2014). Está subdividido em sete subgêneros: *Flagellia*, *Gellius*, *Halichoclona*, *Haliclona*, *Soestella*, *Rhizoniera* e *Reniera* (DE VOOGD *et al.*, 2021) e se destaca pela capacidade de sintetizar moléculas que combatem microrganismos patogênicos e doenças humanas (BRASIL, 2010; GARDÈRES *et al.*, 2015).

O subgênero *Reniera* contém a espécie *Haliclona (Reniera) implexiformis*. Essa esponja pode ser encontrada na região nordeste do Brasil, exibindo de 0,5 a 1,5 cm de espessura, e apresentando uma consistência frágil ou firme, suave ou compressível. Sua coloração vai do roxo ao violeta rosado e vivem em recifes de arenito ou em poças de marés (BISPO; CORREIA; HAJDU, 2016; SANTOS, 2016).

De todas as lectinas extraídas de esponjas marinhas, o gênero *Haliclona* é o que apresenta o maior número de lectinas já isoladas. Até o momento, seis lectinas foram purificadas: HL de *Haliclona* sp. (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985), HCL de *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002), H1, H2 e H-3 de *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013a; CARNEIRO *et al.*, 2013b) e HMA de *Haliclona manglaris* (CARNEIRO *et al.*, 2015). Dentre essas lectinas, várias propriedades biológicas têm sido descritas, como proteção do  $\beta$ -caroteno, efeitos citotóxicos contra náuplios de *Artemia*, células HeLa e FemX e a indução de apoptose e autofagia em células MCF7.

Nesse capítulo será relatado o isolamento, as propriedades bioquímicas, a especificidade de ligação a carboidratos, a aglutinação bacteriana e o efeito antibiofilme de uma nova lectina denominada HiL (*Haliclona (Reniera) implexiformis lectin*).

#### **3.2 Metodologia experimental**

##### **3.2.1 Material biológico**

Espécimes da esponja marinha *Haliclona (Reniera) implexiformis* (HECHTEL, 1965) foram coletadas em substratos rochosos, na zona entre marés da Praia do Pacheco, Ceará, Brasil. Os exemplares foram transportados em caixas térmicas para o laboratório e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. A espécie foi identificada, e um voucher foi depositado (RG: UFPEPOR2691) no Departamento de Zoologia do Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil. Todas as coletas foram autorizadas através de nosso cadastro no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-8). O acesso ao patrimônio genético da esponja foi autorizado pelo registro no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: A1792FE).

### **3.2.2 Extração e purificação da lectina**

Após a coleta, as esponjas foram cortadas em pequenos pedaços, maceradas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e  $\text{CaCl}_2$  20 mM (TBS- $\text{Ca}^{2+}$ ) à uma proporção de 1:2 (p/v). A mistura foi filtrada em tecido de náilon e centrifugada por 20 min a  $9000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante, ou extrato bruto, foi coletado e testado quanto à atividade hemaglutinante e proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976).

Em seguida, o extrato bruto obtido foi novamente centrifugado e submetido à cromatografia de afinidade em coluna Sepharose™ 4B (1,0 cm x 6,0 cm) ativada com HCl 0,1 M, previamente equilibrada com o mesmo tampão de extração (TBS- $\text{CaCl}_2$ ). As proteínas não ligadas foram lavadas com o mesmo tampão e a fração retida foi recuperada por meio de eluição com galactose 0,3 M em TBS sendo monitoradas por espectrofotometria a 280 nm. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas. A proteína isolada foi então denominada de HiL (*Haliclona implexiformis lectin*).

### **3.2.3 Atividade hemaglutinante e teste de inibição da atividade**

A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos humanos (A, B e O), obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Para o ensaio, foram utilizados eritrócitos nativos e tratados com proteases (tripsina e papaína). Para isso, os eritrócitos foram lavados 6 vezes com NaCl 150 mM e

suspendidos na mesma solução a 3% de concentração (v/v). Para o preparo de eritrócitos tratados com digestão enzimática, as suspensões foram incubadas com as proteases tripsina e papaína ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse tempo, as suspensões foram lavadas como descrito anteriormente e o volume aferido com a solução salina, a fim de obter novamente a concentração de eritrócitos a 3% (v/v).

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo V, aplicando o método da dupla diluição seriada conforme descrito por Sampaio e colaboradores (1998), utilizando eritrócitos nativos e tratados. Primeiramente, foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  de tampão TBS- $\text{CaCl}_2$  em cada poço e  $50 \mu\text{L}$  do extrato e de HiL diluída serialmente, e em seguida,  $50 \mu\text{L}$  das suspensões de eritrócitos a 3%, previamente preparados. As placas foram deixadas em repouso por 1 hora a temperatura ambiente e o resultado foi observado macroscopicamente e expresso em título de hemaglutinação, Unidades de Hemaglutinação por mL ( $\text{UH}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), definida como a quantidade de lectina capaz de aglutinar e precipitar eritrócitos em uma suspensão após 1 h.

Para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizou-se placas de microtitulação de fundo V, onde foram adicionados em cada poço  $25 \mu\text{L}$  da solução de HiL em TBS com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a  $4 \text{UH}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $25 \mu\text{L}$  da solução de açúcares e glicoproteínas, diluídos serialmente no mesmo tampão. A placa foi mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente, um volume igual de suspensão de eritrócitos a 3% foram adicionados. Após 1 hora, as placas foram observadas e os resultados foram expressos em concentração mínima de inibidores capazes de impedir a hemaglutinação (SAMPAIO *et al*, 1998).

Os seguintes açúcares e glicoproteínas foram usados no ensaio de inibição: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose,  $\alpha$ -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- $\alpha$ -D-glucosídeo, metil- $\alpha$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-tiogalactose, fenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, mucina submaxilar bovina (BSM) e mucina do estômago suíno (PSM) tipo II e tipo III (as mucinas foram adquiridas na Sigma Aldrich, lotes M3895 e M1778, respectivamente).

### **3.2.4 Efeito do pH, temperatura, EDTA e íon $\text{Ca}^{2+}$**

O efeito do pH na atividade hemaglutinante de HiL foi avaliada incubando 1 mg.mL<sup>-1</sup> da lectina por 1 hora em diferentes tampões variando o pH de 4,0 a 10,0. Logo após, o ensaio de hemaglutinação foi realizado como descrito na seção 4.3.1. Para isso, foram utilizados os seguintes tampões suplementados com NaCl 150 mM: acetato de sódio 100 mM pH 4 e pH 5, fosfato de sódio 100 mM pH 6, Tris 100 mM pH 7 e pH 8 e glicina 100 mM pH 9 e pH 10.

Para o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de HiL, foi preparada uma solução da lectina em TBS (1 mg.mL<sup>-1</sup>), onde esta foi aquecida em diferentes temperaturas (25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C) por 1 hora, antes de ser submetida ao ensaio de hemaglutinação.

Por fim, o efeito de íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e EDTA na atividade hemaglutinante de HiL, foi realizado solubilizando 1 mg.mL<sup>-1</sup> da lectina em NaCl 150 Mm, incubando por 1 hora em TBS/Ca<sup>2+</sup> e em tampão Tris-HCl contendo 20 mM, pH 7,6 contendo EDTA 20 mM (TBS/EDTA), e em seguida realizou-se a atividade hemaglutinante.

### ***3.2.5 Estimativa e determinação da massa molecular***

O grau de pureza e a massa molecular aparente da lectina, sob condição desnaturante, foram estimadas em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, poliacrilamida 15%), na presença e ausência de β-mercaptoetanol, seguido de coloração com Coomassie Brilliant Azul (LAEMMLI, 1970).

As amostras foram preparadas a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão de amostra (TBS pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% e SDS 10%) e aplicados 10μL em cada poço do gel. O sistema foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V, por 1 hora. Um marcador, (kit SigmaMarker™ low range/ Sigma Aldrich, MO) com proteínas de massas moleculares conhecidas, foi utilizado como padrão de referência para estimar a massa molecular aparente, contendo albumina sérica bovina – BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; α-lactalbumina, 14,2 kDa e aprotinina, 6,5 kDa.

A massa molecular nativa da lectina foi avaliada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), conforme descrito por Chaves (2018) e usando uma coluna BEH SEC Column 200 Å, 4,6 mm × 300 mm, tamanho de partícula de 1,7 μm, acoplada em um sistema Acquity UPLC Waters Corp. O tempo de eluição das proteínas foi determinado em

comparação com o tempo de eluição de proteínas com massa molecular conhecida, para isso, a coluna foi previamente calibrada com um kit de marcador contendo proteínas de pesos variando de 29 a 700 kDa (Sigma-Aldrich, EUA). A cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM e Glicerol 5% a um fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e monitorada as absorvâncias 280 nm, 400 e 700 nm.

A determinação da massa molecular média da lectina foi realizada por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.) de Ionização por Eletrospray (ESI-MS). Para isso, a proteína foi solubilizada a uma concentração de 10 µmol/µL em uma solução de acetonitrila 50% (ACN) contendo 0,2% de ácido fórmico (AF) e foi infundida no sistema. A calibração do equipamento foi realizada com íons de ácido fosfórico com *m/z* variando de 100 a 1500, operado em modo positivo, usando uma fonte de temperatura de 363 K e tensão capilar em 3,2 kV. Para a coleta e o processamento de dados foi utilizado o software Mass Lynx 4.1 (Waters).

### ***3.2.6 Quantificação de grupos sulfidrilas***

Para quantificar as cisteínas (Cys) livres, uma solução de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de HiL diluída em bicarbonato de amônio 25mM (BA) foi preparada e incubada com iodoacetoamida 55 mM (IAA) ao abrigo da luz por 45 min em temperatura ambiente. Após a incubação, a lectina carboxamidometilada (CAM-lectina), foi submetida a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS), em que aplicou-se 2µL da solução lectínica em uma nanocoluna C-18 (0,075 x 100 mm), acoplada ao ESI-MS, equilibrada com 0,1% de AF e eluída com um gradiente de ACN 10% a 85% em 0,1% de AF.

Para quantificar as cisteínas totais, a proteína passou por um processo de redução com ditioneitol 10 mM (DDT) a 56°C, por 1 hora, e alquilação com IAA 55 mM ao abrigo da luz por 45 min à temperatura ambiente. Em seguida foi submetida à LC/MS como descrito anteriormente.

### ***3.2.7 Determinação da estrutura primária***

#### ***3.2.7.1 Determinação da extremidade N-terminal***

A sequência N-terminal da lectina foi determinada por degradação de Edman, em um sequenciador automático modelo Shimadzu PPSQ-31A (Shimadzu Corp., Japão). Os

resíduos de aminoácidos gerados pela reação de degradação, na forma de feniltiohidantoínas-aminoácidos (PTH-AA), foram separados em uma coluna ODS de 2,0 × 250 mm (Wakosil) conectada a um modelo de bomba LC-20AT. A absorvância foi detectada a 269 nm com um detector UV-VisSPD-20 e os aminoácidos foram identificados em comparação com o tempo de eluição de PTH-AA padrões.

### 3.2.7.2 Determinação de sequências de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)

A lectina foi submetida a SDS-PAGE (12%) conforme descrito na sessão 4.4. Após a coloração, as bandas eletroforéticas foram excisadas do gel, descoradas e desidratadas com 1 mL de ACN 100%, por 10 minutos. Em seguida, as proteínas presentes nos spots foram reduzidas em solução de BA 25 mM com DTT 10 mM à 56°C, por 30 minutos, e carboxamidometilada (CAM-lectina) com IAA 55 mM, os peptídeos foram então extraídos do gel de acordo com Shevchenko e colaboradores (2007).

Os spots foram digeridos com tripsina ou quimotripsina em BA 50 mM a 1:50 p/p (enzima/substrato). As digestões foram mantidas a 37°C por 18 h e depois interrompidas com 2 µL de AF 2%. As amostras foram lavadas quatro vezes com 100 µL de solução de ACN 50% contendo AF 5% e ao final foram adicionados 500 µL de ACN 100% permanecendo em repouso por 10 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram reunidos em tubos, secados em concentrador a vácuo e solubilizados em 20 µL de AF 0,1%.

Os peptídeos foram separados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (0,075 x 100 mm) acoplada para um sistema nanoAcquity. A coluna foi equilibrada com 0,1% de AF e eluída com um gradiente de ACN de 10% a 85% contendo 0,1% de AF. Os eluatos foram infundidos diretamente em um espectrômetro de massa híbrido (ESI-Q-ToF) (Synapt HDMS, Waters Corp, MA, EUA).

O espectrômetro de massa operou em modo positivo na faixa de  $m/z$  100 a 4000 com uma fonte de temperatura de 373 K e uma tensão capilar em 3,0 kV. O aparelho foi calibrado com íons de ácido fosfórico na faixa de  $m/z$  de 100 a 1500. Para as análises de LC-MS/MS utilizou-se a função aquisição dependente de dados (DDA), selecionando os íons precursores com carga ( $z$ ) entre 2+ e 4+. A referência utilizada durante a coleta de dados foi o íon de  $m/z$  686,8461 do ácido fórmico. Os íons precursores selecionados foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) usando argônio como o gás de colisão.

Os espectros foram coletados e processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram processados

manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters) e os peptídeos sequenciados foram pesquisados online em bancos de dados usando o BLAST no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>). Os alinhamentos das sequências foram feitos usando os programas MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e ESPript (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

### **3.2.8 Análise de dicroísmo circular (DC)**

A medição espectroscópica de DC foi realizada em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) conectado a um *peltier* com temperatura controlada, conforme Carneiro *et al.*, 2017b. Uma solução da lectina na concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> foi preparada usando tampão fosfato 20 mM pH 7,0 e disposta em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram adquiridos com velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup> e intervalo de 190 a 240 nm (*far-UV*). O servidor on-line DichroWeb foi usado para realizar análises de previsão de estrutura secundária (WHITMORE; WALLACE, 2008).

A fim de estudar a estabilidade térmica, a lectina foi submetida a temperaturas variando de 20°C a 100°C a uma taxa de 3°C.min<sup>-1</sup> e amostragem a cada 1°C. A Temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>), definida como a temperatura na qual metade das proteínas encontram-se na forma desnaturada, foi calculada monitorando as mudanças na elipticidade a 205 nm com a lectina na presença e ausência de galactose (10 mM) (GREENFIELD, 2006a; GREENFIELD, 2006b).

### **3.2.9 Aglutinação de bactérias e atividade antibacteriana**

#### **3.2.9.1 Cepas e condições de cultura**

Para o presente estudo, foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As cepas foram inoculadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) por 24 h a 37°C. As colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia) por mais 24 h a 37°C. Logo após, as células foram colhidas por centrifugação (5 min a 9000 xg) e a suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (CFU.mL<sup>-1</sup>) por turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinadas para cada cepa (VASCONCELOS *et al.*, 2014; CLSI, 2015).

### 3.2.9.2 Aglutinação bacteriana

Para o ensaio de aglutinação, foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303. As bactérias foram colhidas por centrifugação (2000 xg a 4°C), lavadas três vezes com TBS contendo NaCl 150 mM e suspensa em TBS contendo formol 4% e mantidas por 24 h a 4°C. Em seguida foram lavadas e suspensas no mesmo tampão e verificada a absorbância em 640 nm para ajustar a concentração final de bactérias a  $2 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> por turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinadas para cada cepa. A aglutinação bacteriana foi avaliada incubando uma solução de 50 µL da lectina (1mg.mL<sup>-1</sup>) a 50 µL da suspensão bacteriana, por 1h a temperatura ambiente. Também foi analisado a ação aglutinante da lectina na presença de  $\alpha$ -lactose, onde as bactérias foram incubadas previamente com 50 µL do carboidrato a 100 mM por 30 min. O controle consistiu apenas das células bacterianas com ou sem  $\alpha$ -lactose. Os resultados foram observados em um microscópio de luz. Adaptado do De Melo *et al.* (2014).

### 3.2.9.3 Efeito da lectina no crescimento celular planctônico

O efeito da lectina sobre o crescimento celular planctônico foi avaliado pela técnica padrão de microdiluição. A lectina foi diluída em NaCl 150 mM em concentrações variando de 7,8 a 500 µg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida foi adicionado em cada poço 100 µL dessas soluções e 100 µL de células bacterianas ( $2 \times 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em agitação constante. Para avaliar o crescimento bacteriano após a incubação foi realizada a medida da turbidez por meio da densidade óptica de cada poço utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3) em comprimento de onda de 620 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

### 3.2.9.4 Efeito da lectina na formação de Biofilme

O efeito da lectina sobre a formação de biofilme foi avaliado conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014). Duas placas de poliestireno estéreis de 96 poços foram preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente estabelecidos para o crescimento celular planctônico. Uma para a quantificação da biomassa do biofilme e outra para enumeração de células viáveis de biofilme.

### 3.2.9.5 Ensaio de biofilme: quantificação de biomassa e quantificação de células viáveis aprisionadas

O efeito da lectina sobre a formação de biofilme foi avaliado conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014). A quantificação da biomassa do biofilme foi determinada usando a coloração de cristal violeta (CV), método de acordo com Stepanović e colaboradores (2000) com algumas modificações de Vasconcelos *et al.* (2014).

Os biofilmes foram desenvolvidos na presença e ausência de diferentes concentrações da lectina (7,8 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 24 h. Depois de 24 horas de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM para a remoção de células fracamente aderentes. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de metanol a 95% por 5 minutos para a fixação dos biofilmes. Então, 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 1% foram adicionados aos poços por 5 minutos a 25°C. O excesso de corante foi removido e as placas lavadas com água destilada. O corante restante foi removido com 33% de ácido acético (v/v) e o corante remanescente eluído de cada poço foi quantificado medindo a densidade óptica a 590 nm ( $\text{OD}_{590}$ ) usando um leitor de microplaca (SpectraMax® i3).

Após a formação dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril para remover células fracamente aderentes. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril foi adicionada a cada poço e submetida a banho ultrassônico (Cristófoli / EQM-CF) operando a 50 kHz por 8 minutos para destacar as células incorporadas nos biofilmes. Diluições decimais em série das suspensões de bactéria foi semeada em meio TSA e incubada a 37°C por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado e os resultados expressos em termos de  $\text{Log}_{10}\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3.2.9.6 Análise estatística

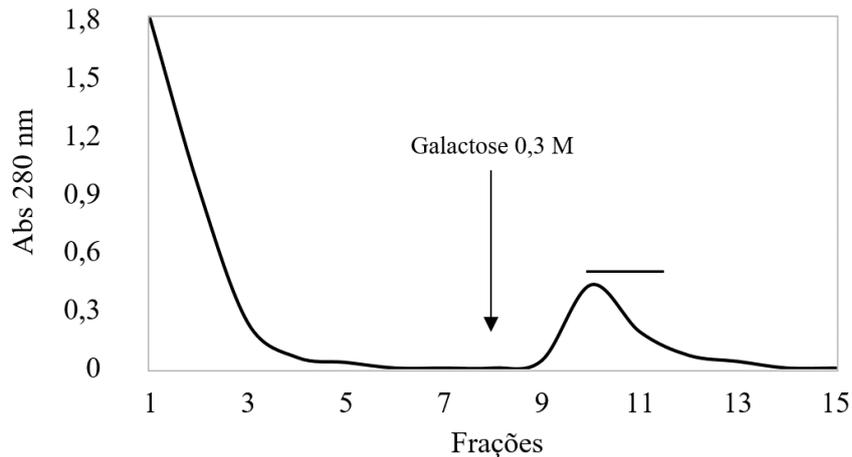
Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®, e os dados de todos os ensaios comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste Bonferroni *post hoc*. Foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Isolamento da lectina

O extrato bruto de *H. implexiformis* mostrou atividade lectínica contra eritrócitos humanos nativos e tratados com enzimas. Na cromatografia de afinidade, a lectina foi adsorvida na matriz de Sepharose™, e foi recuperada por eluição com galactose 0,3 M (Figura 5).

Figura 5 - Cromatografia de afinidade de HiL



Fonte: Elaborado pelo autor. Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose™ 4B (1,5 × 6,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e CaCl<sub>2</sub> 20 mM (TBS-Ca<sup>2+</sup>). As frações retidas foram eluídas com 0,3 M de galactose e o fluxo foi mantido a 1 mL.min<sup>-1</sup>. — Frações que apresentaram atividade hemaglutinante.

A lectina eluída da coluna representou 78% da atividade hemaglutinante total presente no extrato. Este procedimento aumentou 17 vezes a atividade específica da lectina em comparação com o extrato bruto (Tabela 1).

Tabela 1 - Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha *H. implexiformis*

Fração	Volume (mL)	Título (UH.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Atividade Hemaglutinante total (UH)	Atividade específica (UH.mg <sup>-1</sup> )	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	41	512	61	20.992	346	1	100
Afinidade	8	2.048	2,8	16.384	5.851	17	78

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.2 Inibição da atividade hemaglutinante de HiL por açúcares e glicoproteínas

A especificidade de ligação a carboidratos da lectina foi determinada pela inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas. Vários carboidratos relacionados à galactose mostraram atividade inibitória em níveis distintos. O carboidrato 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo foi o mais potente inibidor com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,19 mM, seguido por fenil- $\beta$ -D-galactosídeo e 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo com CIM de 0,39 mM, enquanto a glicoproteína PSM tipo 2 apresentou CIM em 0,03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 2).

Tabela 2- Inibição da atividade hemaglutinante de HiL

<b>Açúcares</b>	<b>CIM<sup>a</sup></b>
2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo	0.19 mM
fenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	0.39 mM
4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo	0.39 mM
4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo	0.78 mM
$\alpha$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Glc)	0.78 mM
D-lactulose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Fru)	0.78 mM
metil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	0.78 mM
metil- $\beta$ -D-thiogalactose	0.78 mM
D-galactose	0.78 mM
D-galactosamina	1.56 mM
<i>N</i> -acetil-D-galactosamina	1.56 mM
D-melibiose (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Glc)	1.56 mM
D-rafinose (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Fru)	1.56 mM
metil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo	1.56 mM
L-arabinose	25 mM
L-raminose	50 mM
<b>Glicoproteínas</b>	<b>CIM<sup>a</sup></b>
PSM II	0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
BSM	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

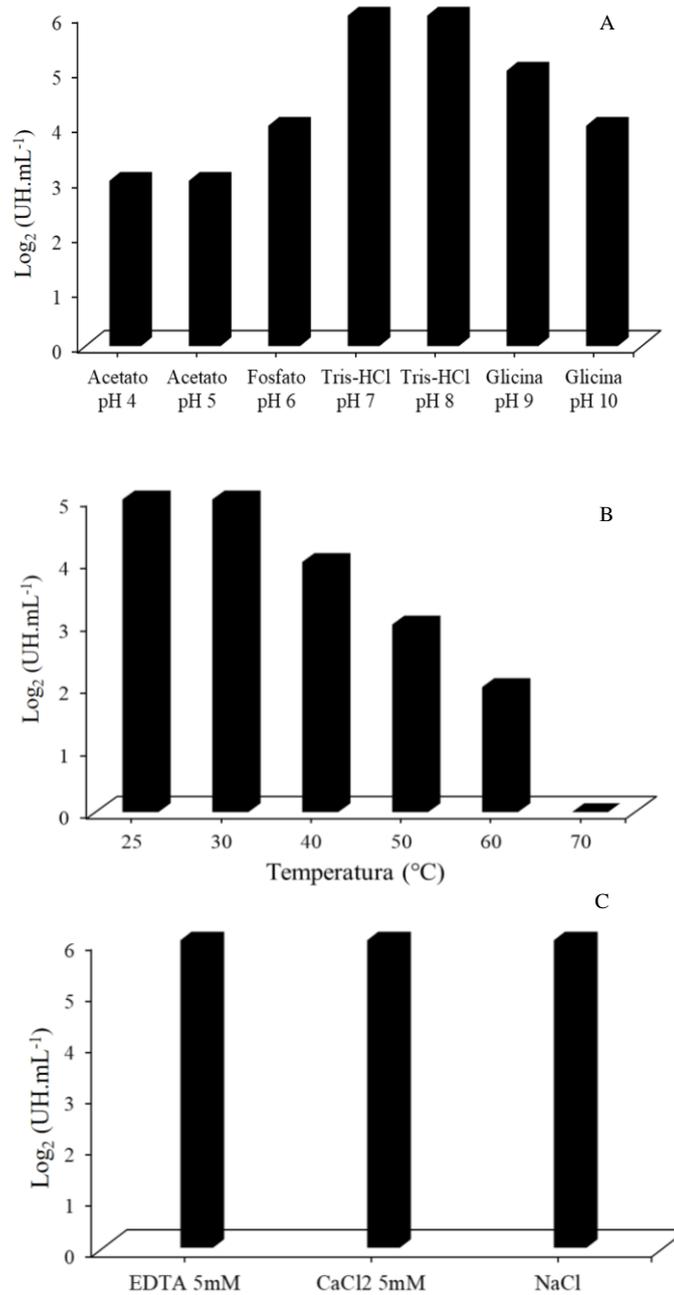
Fonte: Elaborado pelo autor. Concentração inibitória mínima (CIM) <sup>a</sup>.  
Concentração inicial dos carboidratos testados: 100 mM, concentração inicial de glicoproteínas: 1mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.3 Efeitos do pH, temperatura e cátion divalente na atividade hemaglutinante de HiL

A atividade hemaglutinante da lectina foi máxima entre pH 7,0 e 8,0, mas fora desses valores, a capacidade hemaglutinante foi reduzida em pH 4,0 e 10,0 (Figura 6A). Ficou

estável até 30° C, perdendo 50 % da atividade a 40°C, 75 % a 50° C e 87,5 % a 60° C, com perda total de atividade após aquecimento a 70° C (Figura 6B). A presença de CaCl<sub>2</sub> e EDTA não afetou a atividade hemaglutinante (dados não mostrados).

Figura 6- Propriedades da atividade hemaglutinante de HiL



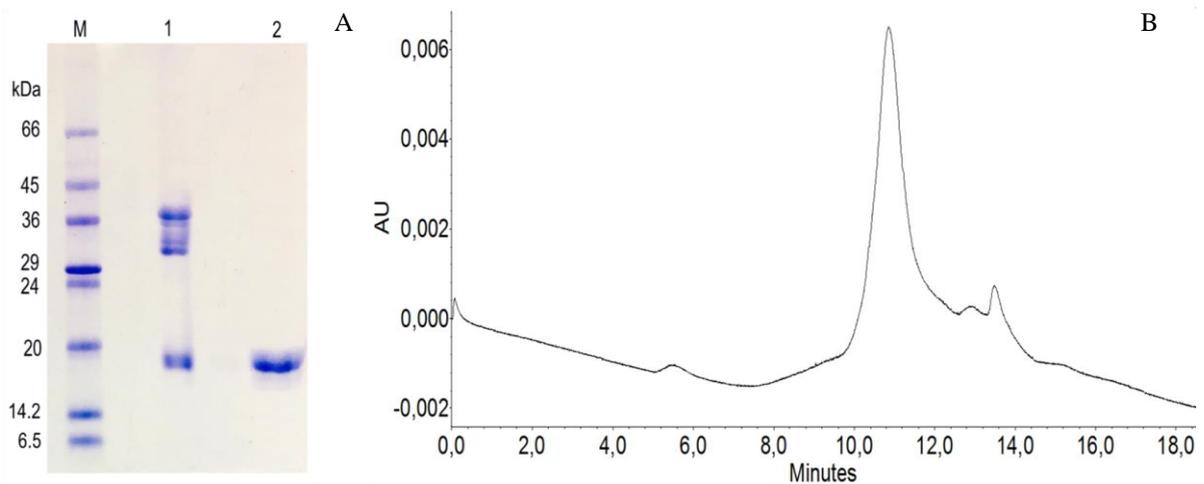
Fonte: Elaborado pelo autor. Efeito do pH (A); temperatura (B); íon cálcio e EDTA (C) na atividade hemaglutinante de HiL. Atividade hemaglutinante expressa em Log<sub>2</sub> (UH.mL<sup>-1</sup>).

### 3.3.4 Massa molecular

O SDS-PAGE da lectina purificada revelou uma única banda de aproximadamente 20 kDa na presença de agentes redutores. A mesma banda de 20 kDa e uma banda larga adicional de 36 kDa foram observadas na ausência de 2-ME (Figura. 7A).

Na forma nativa (avaliada por SEC), a lectina apresentou massa molecular estimada em 18,8 kDa, indicando um comportamento incomum na SEC (Figura 7B).

Figura 7 - Eletroforese SDS-PAGE e cromatografia de exclusão por tamanho de HiL

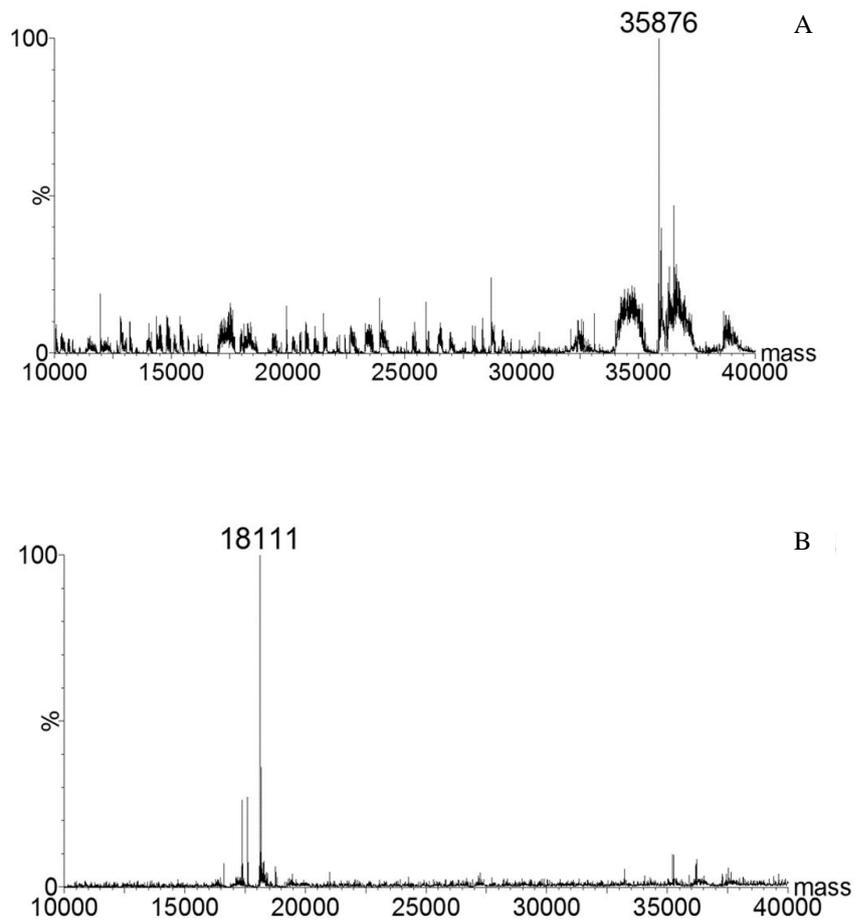


Fonte: Elaborado pelo autor. (A) SDS-PAGE (15%) de HiL purificada: (M) Marcador molecular; (1) 20 µg de HiL na ausência de agentes redutores; (2) 20 µg de HiL na presença de β-mercaptoetanol. (B) Cromatografia de exclusão por tamanho de HiL em coluna BEH SEC (4,6 mm × 300 mm, tamanho de partícula de 1,7 µm), equilibrada e eluída com Tris-HCl, 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM.. Aproximadamente 20 µg de HiL foram carregados e a UPLC operou com fluxo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

A lectina foi submetida a ESI-MS em formas distintas: nativa não reduzida e carboxiamidometilada (CAM). Ambas apresentaram massa molecular média de  $35.876 \pm 2\text{Da}$ , indicando ausência de cisteínas livres. Por outro lado, a CAM-lectina mostrou 18.111 Da. Este valor representa um incremento de 171 Da em relação ao monômero reduzido esperado ( $35.876 \text{ Da} / 2 = 17.938 \text{ Da}$ ).

Considerando que uma cisteína por monômero está envolvida em uma ligação dissulfeto, 2H deve ser adicionado, totalizando 17.940 Da. Como cada acetamida ligada a um grupo tiol produz um incremento de 57 Da, este resultado sugere a presença de três cisteínas ( $3 \times 57 \text{ Da} = 171 \text{ Da}$ ), todas envolvidas em ligações dissulfeto (Figura 8).

Figura 8- Determinação da massa molecular de HiL por ESI – MS



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Espectro de massa ESI deconvoluído de HiL. A lectina ( $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ) foi dissolvida em uma solução de ACN 50% contendo 0,2% de AF e infundida na fonte NanoESI acoplada a um espectrômetro de massa ESI-Q-ToF. (B) Espectro de massa deconvoluído de CAM-lectina.

### 3.3.5 Sequenciamento de aminoácidos

Os primeiros dezessete aminoácidos  $\text{NH}_2$ -terminal da lectina determinados foram:  $^1[\text{A/G}]\text{XPGVTF}^8[\text{L/Y}]\text{YVGRILTSM}^{17}$ , e não mostraram semelhança com nenhuma proteína conhecida. Micro heterogeneidades foram encontradas nas posições 1 (A / G) e 8 (L / Y). Na posição 2, apresenta um aminoácido não identificado.

As digestões trípica e quimotríptica produziram sete e três peptídeos identificados, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3- Sequências de aminoácidos dos peptídeos de HiL

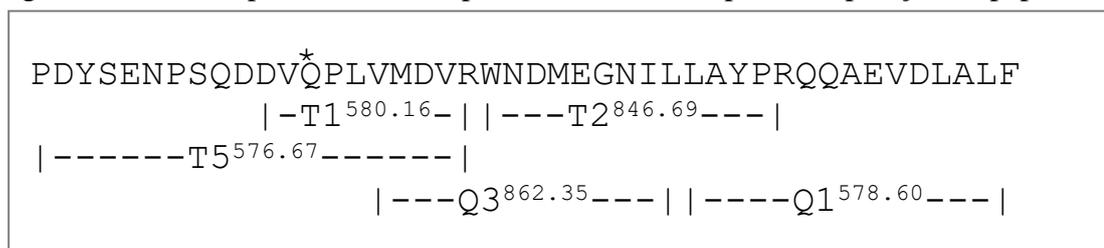
Peptídeo	<i>m/z</i>	Sequência	Massa		$\Delta$ (Da)
			Observada	Calculada	
T1	580.16	DSQPLVMDVR	1158.30	1158.57	0.27
T2	854.70	WNDM*EGNLLLAYPR	1706.37	1706.84	0.47
T2'	846.69	WNDMEGNLLLAYPR	1690.38	1690.81	0.43
T3	799.73	SSDKTTGVLATYDLK	1597.45	1597.78	0.33
T3'	591.25	TTGVLATYDLK	1180.50	11863	0.13
T4	982.75	STTLPDCFWLLSQLQR	1963.50	1963.98	0.48
T5	576.67	PDYSENPSQDDVQPLVMDVR	2302.67	2303.03	0.36
Q1	578.60	LAYPRQQAQAEVDLALF	1732.79	1732.91	0.12
Q2	571.59	GVFDNPPQLQPGVGCK	1711.77	1711.83	0.06
Q3	862.35	VM*DVRWNDM*EGNIL	1722.69	1722.83	0.04

Fonte: Elaborado pelo autor. T- peptídeos obtidos por tripsina; Q- peptídeos obtidos por quimotripsina. *m/z*: massa/carga.  $\Delta$ : Massa cal. - Massa obs. \*: Metionina oxidada.

Em alguns casos, foi observada sobreposição entre peptídeos distintos. Por exemplo, C-terminal do peptídeo T5 (Val-Met-Asp-Arg) sobreposto com NH<sub>2</sub>-terminal do peptídeo Q3, que, em por sua vez, sobrepõe sua sequência C-terminal (Gly-Glu-Asn-Ile-Leu) com o peptídeo T2. A sequência C-Terminal de T2 (Leu-Ala-Tyr-Pro-Arg) sobreposta a Q1. Assim, foi obtida uma sequência contínua de 44 aminoácidos (MW = 5090,46) (Figura 9). No entanto, nenhuma semelhança foi encontrada com qualquer proteína.

Alguns peptídeos foram considerados semelhantes. Por exemplo, os peptídeos T1 e T5 têm sequência de aminoácidos muito semelhantes, com modificação: Ser para Val. E os peptídeos T2 e T2' são distintos devido à oxidação encontrado em T2' (Figura 9). Todas as sequências, incluindo N-terminal, totalizaram 66% da sequência de aminoácidos de HiL.

Figura 9- Estrutura primária de HiL parcialmente obtida por sobreposição de peptídeos

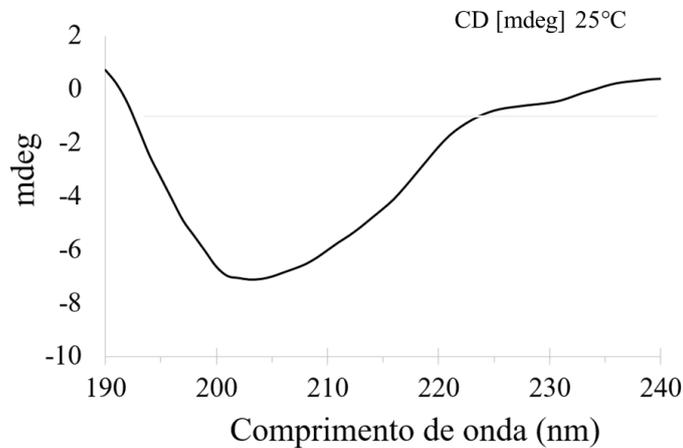


Fonte: Elaborado pelo autor. Sobreposição dos peptídeos obtidos por: T- tripsina e Q-quimotripsina. \* microheterogeneidade.

### 3.3.6 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros obtidos por DC de HiL mostraram uma absorção máxima positiva em torno de 190 nm e uma máxima negativa com mínimo entre 200 e 210 nm (Figura 10). Essa característica, em perfis espectrais de DC, é relacionada com a predominância de estruturas  $\beta$ . A ferramenta de predição CONTIN, alocado no servidor online DICROWEB, mostrou que a estrutura secundária teórica de HiL consistia em 6% de hélice  $\alpha$ , 31% de folha  $\beta$ , 18% de volta  $\beta$  e 45% de estruturas desordenadas.

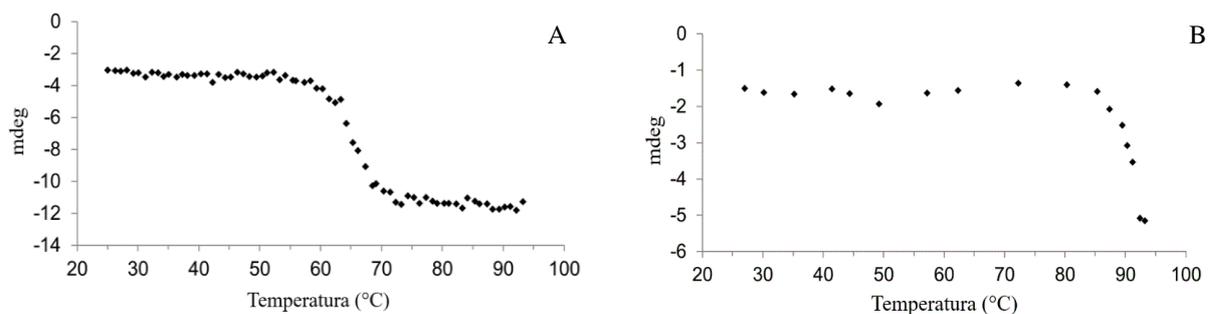
Figura 10- Espectro de dicroísmo circular de HiL



Fonte: Elaborado pelo autor. Espectros de DC em *Far-UV* (190-240 nm)

As temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) da lectina na ausência do ligante (Figura 11A) e complexada com galactose (Figura 11B) foram 64,9 e 90,7°C, respectivamente.

Figura 11- Determinação da  $T_m$  de HiL a partir de mudanças em DC em função da temperatura

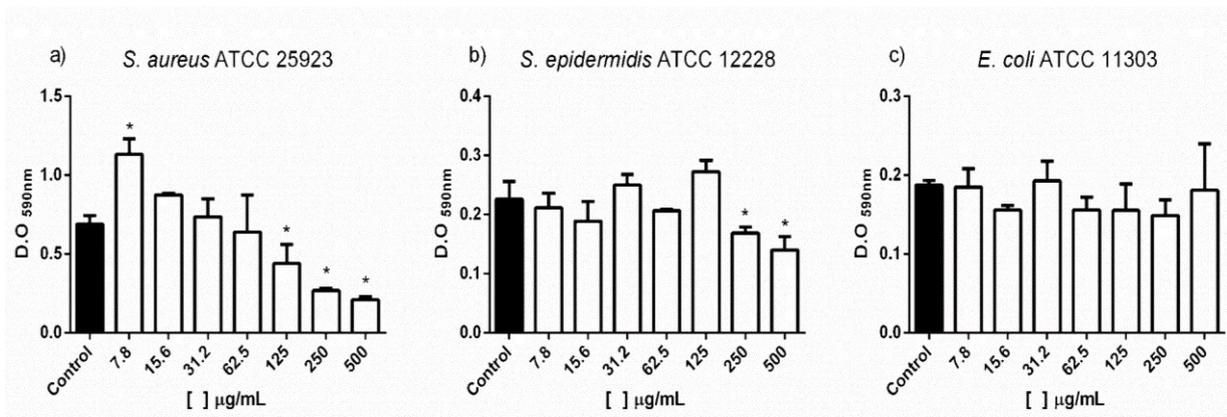


Fonte: Elaborado pelo autor. A lectina foi solubilizada em PBS, pH 7, na ausência (A) e presença (B) de galactose.

### 3.3.7 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias

HiL não teve efeito contra as células planctônicas, portanto os valores de CIM não puderam ser determinados. A lectina foi capaz de reduzir significativamente a biomassa de biofilmes de *Staphylococcus* nas maiores concentrações testadas (Figura 12A e 12B). Por outro lado, a lectina não causou redução da biomassa de biofilmes de *E. coli* (Figura 12C).

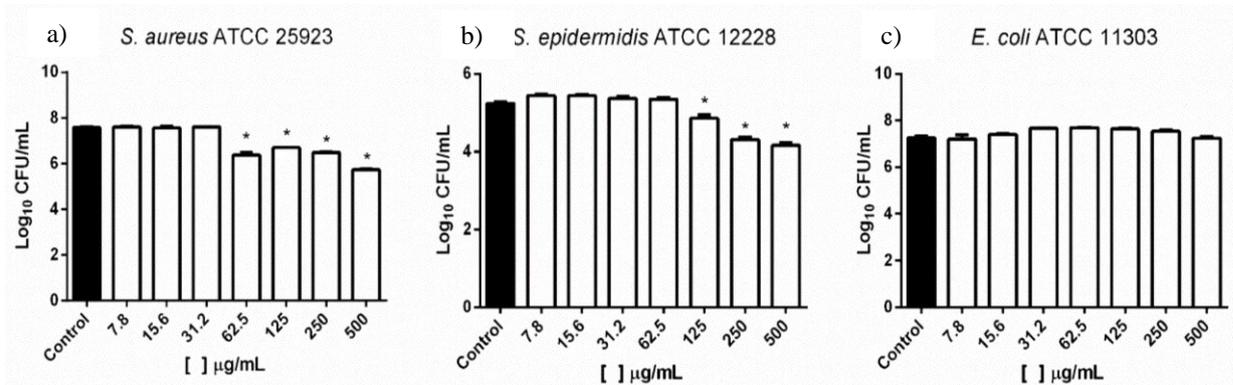
Figura 12- Atividade de HiL contra a formação de biofilme de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Elaborado pelo autor. Quantificação da biomassa total medindo a intensidade da coloração com cristal violeta para biofilmes de *S. aureus* (A), *S. epidermidis* (B) e *E. coli* (C)\* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle.

De acordo com os dados, HiL mostrou redução significativa no número de células viáveis de biofilmes de *Staphylococcus*. Conforme mostrado na Figura 13, uma redução de cerca de 2,0 logs para cepa *S. aureus* e aproximadamente 1,5 logs para *S. epidermidis* (Figura 13A e 13B). O mesmo efeito não foi observado por *E. coli*, não houve diferença estatisticamente significativa no número de células viáveis no controle de bactérias não tratadas com HiL com as concentrações testadas (Figura 13C).

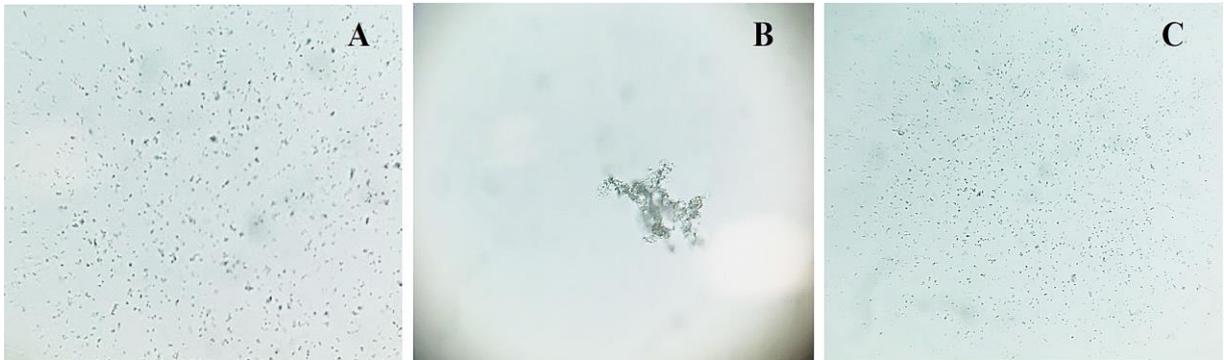
Figura 13- Enumeração de células viáveis aprisionadas ao biofilme



Fonte: Elaborado pelo autor. Unidades formadoras de colônias por mL para biofilmes de *S. aureus* (A), *S. epidermidis* (B) e *E. coli* (C). \* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle.

Nos ensaios de aglutinação bacteriana, foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303. HiL reconheceu somente carboidratos presentes na superfície celular da espécie *S. aureus* e foi capaz de aglutinar as células bacterianas (Figura 14B). A atividade aglutinante foi inibida quando a lectina foi posta em contato com  $\alpha$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Glc) (Figura 14C).

Figura 14- Aglutinação de *S. aureus* por HiL



Fonte: Elaborado pelo autor. A – Espécie *S. aureus* em solução de NaCl 0,85%; B – Espécie *S. aureus* com HiL; C - Espécie *S. aureus* com HiL complexada com lactose. As imagens foram obtidas por microscopia óptica.

### 3.4 Discussão

Neste trabalho, uma nova lectina extraída da esponja marinha *H. (Reniera) implexiformis* (HiL) foi isolada e caracterizada. A lectina foi purificada por cromatografia de afinidade em matriz Sepharose™ atividade por HCl, um método eficiente para isolar lectinas de ligação à galactose (CARNEIRO *et al.*, 2017b; CARNEIRO *et al.*, 2019; MOURA *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2018).

HiL provou ser mais ativa em um pH básico. Esse comportamento é semelhante ao observado na aglutinina de *H. manglaris* (HMA) (CARNEIRO *et al.*, 2015), na lectina HcL de *H. cratera* (PAJIC *et al.*, 2002), em H-1 de *H. caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013b) e na maioria das lectinas isoladas de esponjas marinhas, exceto para H-2 de *H. caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013b) que mostrou forte atividade em pH ácido valores (4-5). Conforme observado em H-2, HiL permaneceu ativa quando exposta a até 60°C por 60 min.

Estudos dos efeitos do EDTA e da necessidade de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) de várias lectinas de esponja, incluindo H-1, H-2, H-3 e HMA (CARNEIRO *et al.*, 2013a; 2013b; 2015), mostraram que a atividade hemaglutinante não foi afetada pela presença destes íons. Resultados semelhantes foram observados neste trabalho.

Assim, HiL apresentou várias características bioquímicas comuns às lectinas de esponja marinha, tais como não especificidade para tipos de sangue, atividade hemaglutinante independente de íons divalentes, termoestabilidade e resistência a variações de pH. Tal como HiL, várias lectinas de esponjas marinhas reconhecem alguns derivados de galactose (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2006). No entanto, alguns aspectos importantes do perfil de inibição de HiL merecem mais atenção.

HiL mostrou especificidade para galactose e carboidratos com terminais não redutores contendo galactose. A preferência por  $\beta$ -galactosídeos observada no ensaio de inibição sugere a envolvimento de grupos substituintes C1 na interação da lectina com o açúcar. Por exemplo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo é duas vezes mais eficaz que 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo. O mesmo é verdadeiro para metil- $\beta$ -D-galactosídeo e metil- $\alpha$ -D-galactosídeo. Como algumas lectinas de algas marinhas, HiL parece possuir uma região hidrofóbica próxima ao seu local de ligação a carboidratos, uma vez que a inibição mostrada por nitrofenil-D-galactosídeos foi mais forte do que metil-D-galactosídeos (SAMPAIO *et al.*, 1998; SAMPAIO *et al.*, 1999).

O deslocamento do radical nitro ( $-\text{NO}_2$ ) de orto-dirigente em 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo para o para-dirigente em 2-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo aumentou a eficiência inibitória do carboidrato em duas vezes e gerou maior estabilidade de ligação entre todos os açúcares, garantindo maior poder inibitório com CIM de 0,19 mM.

A natureza do grupo substituinte C1, como metil, fenil e nitrofenil, pode aumentar afinidade, mas não define especificidade. A substituição da hidroxila por outros grupos C2 diminui afinidade; por exemplo, a inibição da D-galactose cai duas vezes quando os radicais amino ou acetil estão ligados naquele carbono.

Embora C1 pareça ser um ponto importante de reconhecimento, um grau semelhante de inibição de  $\beta$ -D-lactulose ( $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{Fru}$ ) e rafinose ( $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Fru}$ ) indica que C1 não pode ser considerado como um ponto chave para o reconhecimento da lectina.

A configuração em C4 do anel de piranose é importante, uma vez que nem a glicose nem seus derivados mostraram qualquer atividade inibidora contra HiL. A diferença na estrutura entre galactose e a glicose pode ser vista ao comparar as estruturas de anel simétrico onde o grupo hidroxila em C4, na projeção de Haworth, na glicose está abaixo do plano do anel (equatorial), enquanto com galactose, está acima do plano do anel (axial). Devido à sua posição axial em C4, L-arabinose e L-ramnose foram capazes de inibir, mas apenas em altas concentrações. Além disso, a posição C6 no sítio de ligação é importante uma vez que o ácido D-galacturônico não inibiu a lectina.

Algumas *O*-glicoproteínas que exibem em suas estruturas terminais GalNAc e D-galactose, como PSM e BSM, também foram capazes de inibir HiL. Afinidade para BSM e PSM foram também observadas na lectina H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013a), na lectina de *A. lactuca* (ALL) (CARNEIRO *et al.*, 2017a), de *A. fulva* (AfL) (CARNEIRO *et al.*, 2019) e de *Craniella australiensis* (CaL) (XIONG *et al.*, 2006).

Estruturalmente, HiL também apresentou propriedades semelhantes às de outras lectinas de esponja. Por exemplo, a presença de ligações dissulfeto, predominância de conformação  $\beta$  e sequência única de aminoácidos são características encontradas nas lectinas CvL, AfL e CCL (CARNEIRO *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2006).

No entanto, um aspecto incomum observado em HiL foi sua estrutura quaternária. Apesar da SEC mostrar resultados inconclusivos para a determinação da estrutura quaternária de HiL, o SDS-PAGE e a análise MS deixam clara a predominância da lectina como um dímero ligado por ligações dissulfeto. Isto é uma organização quaternária incomum para lectinas de esponjas. CvL (MOURA *et al.*, 2006) e lectinas de *Aplysina lacunosa* e *A. archeri* (MIARONS; FRESNO, 2000) são tetrâmeros ligados por ligações dissulfeto, enquanto que a lectina H-2 de *H. caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013b) e HCL de *H. cratera* são dímeros mantidos por interações fracas (PAJIC, *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, algumas lectinas de esponjas marinhas foram isoladas e a sequência de seus aminoácidos foram parcialmente determinadas (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; GARDÈRES *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2018). No entanto, somente um número bastante reduzido de lectinas desses organismos tiveram suas estruturas primárias totalmente determinadas. Na verdade, as últimas lectinas de esponjas a terem suas

estruturas primária depositadas foram H-3 de *Haliclona carulea* (CANEIRO *et al.*, 2013a) e CCL de *Chondrilla caribensis* (SOUSA *et al.*, 2021).

As tentativas de determinar a sequência de aminoácidos de lectinas de esponjas falham por muitos motivos, como a pequena quantidade de proteína por biomassa animal, presença de isoformas e glicofomas, e possíveis níveis de expressão diferenciais em certas estações (CARNEIRO *et al.*, 2013a; 2013b).

Neste estudo, em particular, houve a dificuldade de determinar a sequência completa de aminoácidos da lectina devido a (1) baixa ocorrência de *H. implexiformis* ao longo de nossa costa e (2) ausência de proteínas similares nos bancos de dados atuais, o que faz o sequenciamento por técnicas diretas (MS/MS e degradação de Edman) muito complexo e dificultoso. Portanto, novos experimentos devem ser realizados para determinar estrutura do HiL e classificá-la em alguma família de lectinas animais.

HiL não exibiu nenhum efeito no crescimento das células planctônicas, uma vez que, nas concentrações testadas, não foi possível determinar o CIM. No entanto, esta lectina foi capaz de reduzir a biomassa total e o número de células viáveis de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Estudos anteriores usando lectinas de esponjas marinhas também apresentaram resultados semelhantes ao encontrado nesse trabalho. Carneiro e colaboradores (2019) avaliaram a atividade antibacteriana de AFL, que não inibiu o crescimento planctônico das bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas, no entanto, a lectina reduziu significativamente o biofilme de biomassa da bactéria *S. aureus*, *S. epidermidis*, e *E. coli*.

Outra lectina, CCL de *Chondrilla caribensis* (MARQUES *et al.*, 2018) foi capaz de aglutinar as mesmas cepas avaliadas nesse estudo, mas não mostrou inibição de crescimento planctônico dessas bactérias, mesmo assim, apresentou redução significativa na biomassa do biofilme. Estudos evidenciam que lectinas de ligação à galactose podem reconhecer glicanos na superfície bacteriana e distinguir bactérias gram-positivas de bactérias gram-negativas, como ADEL, uma lectina de *Aplysia dactylomela* que causou aglutinação e inibiu a formação de biofilme de *S. aureus*, mas não de *E. coli*. (CARNEIRO *et al.*, 2017b).

A formação de biofilme representa um importante mecanismo de virulência de muitos patógenos bacterianos e uma estratégia usada por essas mesmas bactérias para sobreviver em ambientes naturais ou em tecidos colonizados de alguns hospedeiros (RAAFAT; WURGLICS, 2019). De acordo com o resultado encontrado, HiL foi capaz de reduzir em 50% a biomassa total e até 2,0 logs do número de células viáveis de *S. aureus*, o mais problemático patógeno do gênero *Staphylococcus* por causar numerosas infecções agudas e crônicas, isso evidência a importância biomédica da lectina.

Resultados semelhantes foram observados em biofilme de *S. epidermidis*. Contudo, *E. coli* mostrou maior resistência à atividade da lectina. Isso pode ser atribuído à resistência inerente de bactérias gram-negativas, intrínsecas à sua atividade metabólica e/ou presença de uma membrana externa (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017). Segundo Coelho e colaboradores (2018), o reconhecimento de glicanos na membrana bacteriana por lectinas pode causar um efeito inibitório na formação do biofilme.

O mecanismo de atividade das lectinas na formação de biofilme ainda não está totalmente determinado, mas alguns modelos são sugeridos, como inibição da adesão bacteriana, redução da expressão de genes associado à formação de biofilme, regulação negativa em sistemas de *quorum-sensing* e ruptura da matriz do biofilme (CAVALCANTE *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2018; ISLAM *et al.*, 2009).

## **4 EFEITO ANTIBACTERIANO DE UMA NOVA LECTINA ISOLADA DA ESPONJA MARINHA *Aplysina fistulares***

### **4.1 Introdução**

A química de produtos naturais provenientes de esponjas marinhas tornou-se um foco de pesquisa em áreas médicas. Isso se deve em grande parte ao crescente reconhecimento desses organismos como fonte de compostos com potencial farmacêutico e biomédico que combatem microrganismos patogênicos e doenças humanas (VARIJAKZHAN *et al.*, 2021).

O biofilme bacteriano é caracterizado por uma comunidade de bactérias aderidas a um substrato e inseridas em uma matriz de substância polimérica extracelular (SPE) que atua como uma barreira a antibióticos ou agentes antimicrobianos, tornando-os resistentes até 1000 vezes mais do que em seu próprio estado planctônico (KOO *et al.*, 2017; MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006).

Atualmente, a literatura relata 43 lectinas isoladas de esponjas com algumas apresentando potencial antibacteriano, atuando na inibição de biofilmes de bactérias gram-negativas e gram-positivas, possibilitando seu uso como novos agentes contra infecções bacterianas resistentes, responsáveis pelo aumento das infecções hospitalares e taxa de mortalidade (CARNEIRO *et al.*, 2019; GARDÈRES *et al.*, 2015).

*Aplysina* é o gênero mais representativo da família Aplysinidae. Cinco lectinas deste gênero foram isoladas, AaL de *A. archeri*, AIL de *A. lacunosa* (MIARONS; FRESNO, 2000), ALL de *A. lactuca* (CARNEIRO *et al.*, 2017a), AFL de *A. fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019) e AcL de *Aplysina cauliformis* (VIANA, 2021).

É notável o potencial antibacteriano das lectinas desse gênero. A ALL aglutinou cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e reduziu significativamente a biomassa de ambos os biofilmes bacterianos. AFL reduziu a biomassa de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, e também afetou o número de células viáveis dessas bactérias. AcL foi capaz de aglutinar cepas *E. coli*. (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; MIARONS; FRESNO, 2000; VIANA, 2021).

Será relatado nesse capítulo a purificação e caracterização bioquímica de uma lectina isolada da esponja marinha *Aplysina fistulares* (AfiL) com potencial antibiofilme bacteriano e capaz de aglutinar células bacterianas.

### **4.2 Metodologia experimental**

#### **4.2.1 Coleta dos animais e preparação do extrato**

Espécimes da esponja marinha *Aplysina fistulares* foram coletados no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, Brasil. Os exemplares foram transportados em caixas térmicas para o laboratório e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. Todas as coletas e seu acesso genético foram autorizados e certificados pelos órgãos ambientais responsáveis (SISBIO ID: 33913-8 e SISGEN ID: A1792FE).

No laboratório, as esponjas foram cortadas em pequenos pedaços, trituradas em almofariz e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7 contendo NaCl 150 mM a proporção de 1:2 (p/v). O homogenato foi filtrado em tecido de náilon e clarificado por centrifugação por 20 min a  $9000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante (extrato bruto) foi submetido à precipitação com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 70% (F 0-70%) de saturação durante 4 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação por 20min a  $9000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e solubilizadas em um pequeno volume de TBS (F 0-70%).

#### **4.2.2 Purificação da lectina**

Aproximadamente 45 mL de F 0-70% foram aplicados à coluna de afinidade contendo Sepharose™ 4B (1,0 cm x 6,0 cm) ativada com HCl 0,1 M, previamente equilibrada com TBS. As proteínas não ligadas foram lavadas com o mesmo tampão e a fração retida foi recuperada através da eluição com lactose 0,3 M em TBS. Os eluatos da cromatografia foram monitorados por absorvância a 280 nm usando um espectrofotômetro UV/Visível. As frações eluídas com lactose em TBS foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas até o uso. A proteína isolada foi então denominada de AfiL (*Aplysina fistulares lectin*).

#### **4.2.3 Atividade hemaglutinante e ensaio de inibição**

A atividade hemaglutinante foi realizada utilizando eritrócitos humanos (A, B e O), obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Para o ensaio, foram utilizados eritrócitos nativos e tratados com proteases (tripsina e papaína). Para isso, os eritrócitos foram lavados 6 vezes com NaCl 150 mM e suspensos na mesma solução a 3% de concentração (v/v). Para o preparo de eritrócitos tratados com digestão enzimática, as suspensões foram incubadas com as proteases tripsina e

papaína ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse tempo, as suspensões foram lavadas como descrito anteriormente e o volume aferido com a solução salina, a fim de obter novamente a concentração de eritrócitos a 3% (v/v).

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo V, utilizando eritrócitos nativos e tratados, usando o método da dupla diluição seriada conforme descrito por Sampaio e colaboradores (1998). Primeiramente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão TBS- $\text{CaCl}_2$  em cada poço e 50  $\mu\text{L}$  do extrato, de F 0-70 e de AfIL diluída serialmente, e em seguida, 50  $\mu\text{L}$  das suspensões de eritrócitos a 3%, previamente preparados. As placas foram deixadas em repouso por 1 hora a temperatura ambiente e o resultado foi observado macroscopicamente e expresso em título de hemaglutinação, Unidades de Hemaglutinação por mL ( $\text{UH}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizou-se placas de microtitulação de fundo V, onde foram adicionados em cada poço 25  $\mu\text{L}$  da solução de AfIL em TBS com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a 4  $\text{UH}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 25  $\mu\text{L}$  da solução de açúcares e glicoproteínas, diluídos serialmente no mesmo tampão. A placa foi mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente, um volume igual de suspensão de eritrócitos a 3% foram adicionados. Após 1 hora, as placas foram observadas e os resultados foram expressos em concentração mínima de inibidores capazes de impedir a hemaglutinação (SAMPAIO *et al*, 1998).

Os seguintes açúcares e glicoproteínas foram usados no ensaio de inibição: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose,  $\alpha$ -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- $\alpha$ -D-glucosídeo, metil- $\alpha$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-galactosídeo, metil- $\beta$ -D-tiogalactose, fenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, mucina submaxilar bovina (BSM) e mucina do estômago suíno (PSM) tipo II e tipo III (as mucinas foram adquiridas na Sigma Aldrich, lotes M3895 e M1778, respectivamente).

O efeito da temperatura, pH e íons divalentes sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi avaliado conforme métodos pré-estabelecidos (SAMPAIO *et al*, 1998).

#### **4.2.4 Estimativa e determinação da massa molecular**

O grau de pureza e a massa molecular aparente da lectina, sob condição de desnaturação, foram estimadas em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, seguido de coloração com Coomassie Brilliant Azul (LAEMMLI, 1970).

As amostras foram preparadas a concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão de amostra (TBS pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% e SDS 10%) e aplicados  $10 \mu\text{L}$  em cada poço do gel (poliacrilamida 15%). O sistema foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V, por 1 hora. Um marcador, (kit SigmaMarker™ low range/ Sigma Aldrich, MO) com proteínas de massas moleculares conhecidas, foi utilizado como padrão de referência para estimar a massa molecular aparente, contendo albumina sérica bovina – BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa;  $\alpha$ -lactalbumina, 14,2 kDa e aprotinina, 6,5 kDa.

A massa molecular nativa da lectina foi avaliada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), conforme descrito por Chaves (2018), usando uma coluna BEH SEC Column 200 Å,  $4,6 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ , tamanho de partícula de  $1,7 \mu\text{m}$ , acoplada em um sistema Acquity UPLC Waters Corp. O tempo de eluição das proteínas foi determinado em comparação com o tempo de eluição de proteínas com pesos conhecidos, variando de 29 a 700 kDa (Sigma-Aldrich, EUA). A cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM e Glicerol 5% a um fluxo de  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$  e monitorada as absorvâncias 280 nm, 400 e 700 nm.

#### ***4.2.5 Determinação da estrutura primária por espectrometria de massa (MS / MS)***

A lectina foi submetida a SDS-PAGE (12%) conforme descrito na sessão 2.2.4.

Após a coloração, as bandas eletroforéticas foram excisadas do gel, descoradas e desidratadas com 1 mL de acetonitrila 100% (ACN), por 10 minutos. Em seguida, as proteínas presentes nos spots foram reduzidas em solução de bicarbonato de amônio 25 mM (BA) com ditioneitol 10 mM (DDT) à  $56^\circ\text{C}$ , por 30 minutos, e carboxamidometilada (CAM-lectina) com IAA 55 mM. Os peptídeos foram então extraídos do gel de acordo com Shevchenko *et al.*, 2007.

Os spots foram digeridos com tripsina e quimotripsina em BA 50 mM a 1:50 p/p (enzima/substrato). As digestões foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 18 h e depois interrompidas com  $2 \mu\text{L}$  de ácido fórmico 2% (AF). As amostras foram lavadas quatro vezes com  $100 \mu\text{L}$  de

solução de ACN 50% contendo AF 5% e ao final foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ACN 100% permanecendo em repouso por 10 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram reunidos em tubos, secados em concentrador a vácuo e solubilizados em 20  $\mu\text{L}$  de AF 0,1%.

Os peptídeos foram separados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (0,075 x 100 mm) acoplada para um sistema nanoAcquity. A coluna foi equilibrada com 0,1% de AF e eluída com um gradiente de ACN de 10% a 85% contendo 0,1% de AF. Os eluatos foram infundidos diretamente em um espectrômetro de massa híbrido (ESI-Q-ToF) (Synapt HDMS, Waters Corp, MA, EUA).

O espectrômetro de massa operou em modo positivo na faixa de  $m/z$  100 a 4000 com uma fonte de temperatura de 373 K e uma tensão capilar em 3,0 kV. O aparelho foi calibrado com íons de ácido fosfórico com  $m/z$  variando de 100 a 1500, operado em modo positivo, usando uma fonte de temperatura de 363 K e tensão capilar em 3,2 kV. Para a coleta e o processamento de dados foi utilizado o software Mass Lynx 4.1 (Waters). Para as análises de LC-MS/MS utilizou-se a função aquisição dependente de dados (DDA), selecionando os íons precursores com carga ( $z$ ) entre 2+ e 4+. A referência utilizada durante a coleta de dados foi o íon de  $m/z$  686,8461 do ácido fórmico. Os íons precursores selecionados foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) usando argônio como o gás de colisão.

Os espectros foram coletados e processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram processados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters) e os peptídeos sequenciados foram pesquisados online em bancos de dados usando o BLAST no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>). Os alinhamentos das sequências foram feitos usando os programas MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

#### **4.2.6 Análise de dicroísmo circular (DC)**

A medição espectroscópica de DC foi realizada em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) conectado a um *peltier* com temperatura controlada, conforme Carneiro *et al.*, 2017b. Uma solução da lectina na concentração de 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi preparada usando tampão fosfato 20 mM pH 7,0 e disposta em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram adquiridos com velocidade de varredura de 50  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$  e intervalo de 190 a 240 nm (*far-UV*). O servidor on-line

DichroWeb foi usado para realizar análises de previsão de estrutura secundária (WHITMORE; WALLACE, 2008).

A fim de estudar a estabilidade térmica, a lectina foi submetida a temperaturas variando de 20°C a 100°C a uma taxa de 3°C.min<sup>-1</sup> e amostragem a cada 1°C. A Temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>), definida como a temperatura na qual metade das proteínas encontram-se na forma desnaturada, foi calculada monitorando as mudanças na elipticidade a 205 nm com a lectina na presença e ausência de galactose (10 mM) (GREENFIELD, 2006a; GREENFIELD, 2006b).

#### **4.2.7 Aglutinação de bactérias e atividade antibacteriana**

##### *4.2.7.1 Cepas e condições de cultura*

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As cepas foram inoculadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) por 24 h a 37°C. As colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia) por mais 24 h a 37°C. Logo após, as células foram colhidas por centrifugação (5 min a 9000 xg) e a suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (CFU.mL<sup>-1</sup>) por turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinadas para cada cepa (VASCONCELOS *et al.*, 2014; CLSI, 2015).

##### *4.2.7.2 Aglutinação bacteriana*

As cepas utilizadas no teste de aglutinação foram *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303. As bactérias foram colhidas por centrifugação (2000 xg a 4°C), lavadas três vezes com TBS contendo NaCl 150 mM e suspensa em TBS contendo formol 4% e mantidas por 24 h a 4°C. Em seguida foram lavadas e suspensas no mesmo tampão e verificada a absorvância em 640 nm para ajustar a concentração final de bactérias a 2x10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> por turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinadas para cada cepa. A aglutinação bacteriana foi avaliada incubando uma solução de 50 µL da lectina (1mg.mL<sup>-1</sup>) a 50 µL da suspensão, por 1h a temperatura ambiente. Também foi analisado a ação aglutinante da lectina na presença de α-lactose, onde as bactérias foram incubadas previamente com 50

$\mu\text{L}$  do carboidrato a 100 mM por 30 min. O controle consistiu apenas das células bacterianas com ou sem  $\alpha$ -lactose. Os resultados foram observados em um microscópio de luz. Adaptado do De Melo *et al.* (2014).

#### 4.2.7.3 Efeito da lectina no crescimento celular planctônico

O efeito da lectina sobre o crescimento celular planctônico foi avaliado pela técnica padrão de microdiluição. A lectina foi diluída em NaCl 150 mM em concentrações variando de 7,8 a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida foi adicionado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  dessas soluções e 100  $\mu\text{L}$  de células bacterianas ( $2 \times 10^6$  CFU. $\text{mL}^{-1}$ ). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em agitação constante. Para avaliar o crescimento bacteriano após a incubação foi realizada a medida da turbidez por meio da densidade óptica de cada poço utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3) em comprimento de onda de 620 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

#### 4.2.7.4 Efeito da lectina na formação de Biofilme

O efeito da lectina sobre a formação de biofilme foi avaliado conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014). Duas placas de poliestireno estéreis de 96 poços foram preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente estabelecidos para o crescimento celular planctônico. Uma placa para a quantificação da biomassa do biofilme e outra para enumeração de células viáveis de biofilme.

#### 4.2.7.5 Ensaios de biofilme: quantificação de biomassa e quantificação de células viáveis aprisionadas

O efeito da lectina sobre a formação de biofilme foi avaliado conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014). A quantificação da biomassa do biofilme foi determinada usando a coloração de cristal violeta (CV), método realizado de acordo com Stepanović e colaboradores (2000) com algumas modificações de Vasconcelos *et al.* (2014).

Os biofilmes foram desenvolvidos na presença e ausência de diferentes concentrações da lectina (7,8 a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 24 h. Depois de 24 horas de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 150 mM para a remoção de células fracamente aderentes. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de metanol a

95% por 5 minutos para a fixação dos biofilmes. Então, 200 µL de cristal violeta a 1% foram adicionados aos poços por 5 minutos a 25°C. O excesso de corante foi removido e as placas lavadas com água destilada. O corante restante foi removido com 33% de ácido acético (v/v) e a mancha eluída de cada poço foi quantificada medindo a densidade óptica a 590 nm (OD<sub>590</sub>) usando um leitor de microplaca (SpectraMax® i3).

Após a formação dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril para remover células fracamente aderentes. Posteriormente, 200 µL de água destilada estéril foi adicionada a cada poço e submetida a banho ultrassônico (Cristófoli / EQM-CF) operando a 50 kHz por 8 minutos para destacar as células incorporadas nos biofilmes. Diluições decimais em série das suspensões de bactéria foi semeada em meio TSA e incubada a 37°C por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado e os resultados expressos em termos de Log<sub>10</sub>CFU.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.7.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. e os dados de todos os ensaios comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste Bonferroni. *post hoc*. Foi considerado um nível de significância de  $p < 0,001$ .

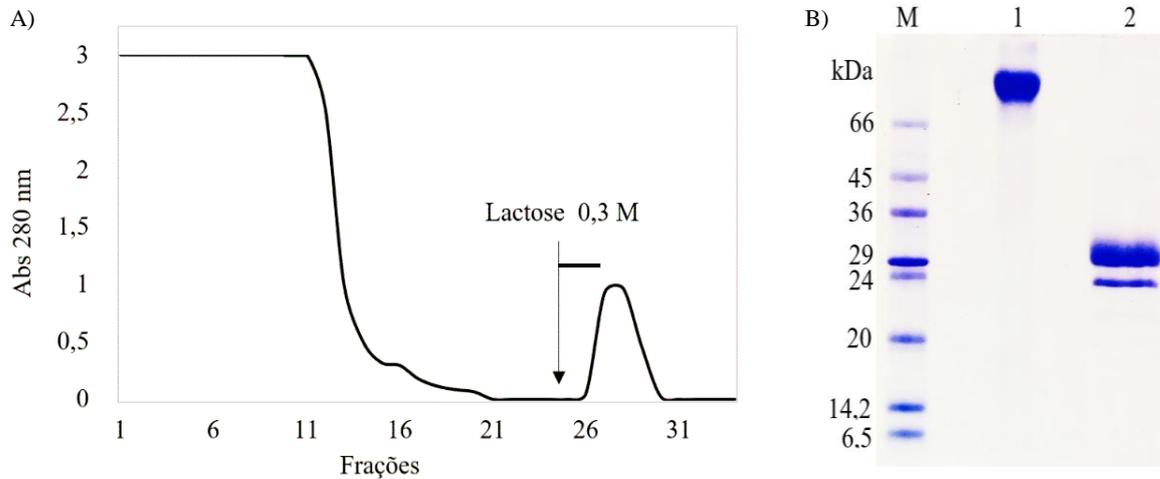
### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Purificação e estimativa da massa de AfiL

O extrato bruto e a fração (F 0-70%) do extrato de *Aplysina fistularis* mostraram atividade lectina contra todos os eritrócitos testados. A fração 0-70% foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna Sepharose™ e a lectina foi recuperada por eluição com lactose 0,3 M (Figura 15A).

O grau de pureza obtido pelo processo cromatográfico pode ser evidenciado pela presença de uma banda única observada no SDS-PAGE em condições não redutoras (Figura 15B). Através da eletroforese foi possível estimar a massa de AfiL e analisar seu comportamento frente a condições redutoras e não redutoras. Na ausência de β-mercaptoetanol, AfiL mostrou uma única banda de aproximadamente 70 kDa. Já na presença de β-mercaptoetanol apresentou duas bandas em torno de 30 kDa e 24 kDa (Figura 15B).

Figura 15- Cromatografia de afinidade e SDS-PAGE de AfIL



Fonte: Elaborado pelo autor. A – Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose™ (1,5×6,0 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM (TBS). As frações retidas foram eluídas com 0,3 M de lactose e o fluxo foi mantido a 1 mL.min<sup>-1</sup>. Frações que apresentaram atividade hemaglutinante. B – SDS-PAGE (15%) de AfIL purificada: (M) Marcador molecular; (1) 20 µg de AfIL na ausência de agentes redutores; (2) 20 µg de AfIL na presença de β-mercaptoetanol.

A lectina recuperada da coluna representou 15,0% do total da atividade hemaglutinante presente no extrato e o método cromatográfico aumentou 8,4 vezes a atividade específica de AfIL em comparação com o extrato bruto (Tabela 4).

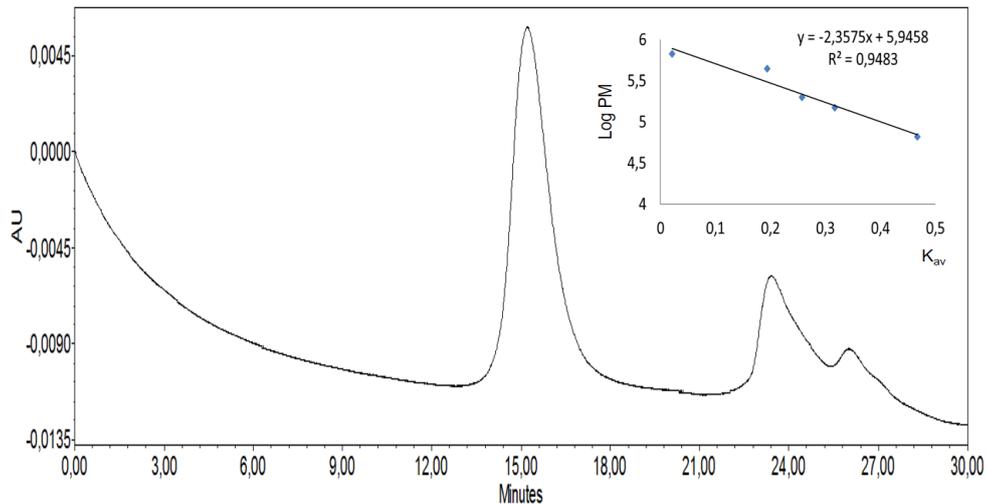
Tabela 4 – Tabela de purificação de AfIL

Fração	Volume (mL)	Título (UH.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Atividade Hemaglutinante total (UH)	Atividade específica (UH.mg <sup>-1</sup> )	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	50	1.024	67.5	51.200	758,5	1	100
F 0-70%	35	1.024	70	35.840	512	0,67	70
Afinidade	15	512	1.2	7.680	6.400	8,4	15

Fonte: Elaborado pelo autor.

A estimativa da massa molecular nativa de AfIL por cromatografia de exclusão molecular, em comparação com o tempo de eluição de proteínas com massa molecular conhecida, foi de 224 kDa (Figura 16).

Figura 16- Cromatografia de exclusão por tamanho de AfiL



Fonte: Elaborado pelo autor. Aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  de AfiL foram carregados em coluna BEH SEC (4,6 mm  $\times$  300 mm, partícula 1,7  $\mu\text{m}$ ) acoplada em um sistema Acquity UPLC, fluxo 0,5 ml.min, equilibrada e eluída com Tris-HCl, 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM. Proteínas de calibração da coluna: tiroglobulina bovina, 669 kDa; apoferritina, 443 kDa;  $\beta$ -amilase, 220 kDa; álcool desidrogenase, 150 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; lisozima, 14 kDa.

#### 4.3.2 Inibição da atividade hemaglutinante de AfiL

A especificidade de ligação a carboidrato de AfiL foi determinada pela inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas. Na tabela 5 podemos observar que, dentre os carboidratos testados a lectina foi inibida pelos dissacarídeos  $\alpha$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Glc) e  $\beta$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -Glc) e os galactosídeos 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo e 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, todos apresentando CIM de 12,5 mM. O dissacarídeo D-lactulose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Fru) apresentou CIM de 25 mM. A glicoproteína PSM mostrou ser o inibidor mais potente com CIM de 0,006  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , seguido por BSM e fetuína com CIM de 0,049  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e 0,39  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

Tabela 5- Inibição da atividade hemaglutinate de AfiL (Continua)

Açúcares	CIM <sup>a</sup>
$\alpha$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Glc)	12,5 mM
$\beta$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -Glc)	12,5 mM
D-lactulose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Fru)	25,0 mM
4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo	12,5 mM
4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo	12,5 mM

Tabela 5- Inibição da atividade hemaglutinate de AfiL (Conclusão)

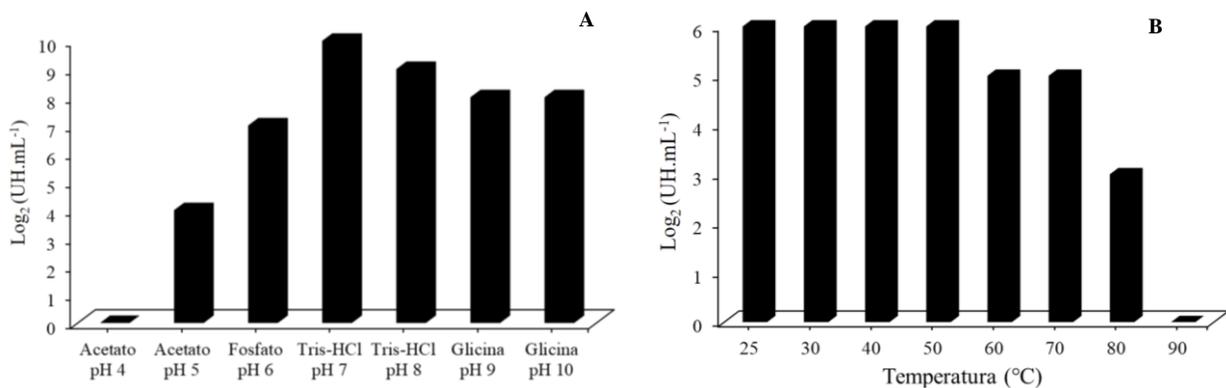
Glicoproteínas	CIM <sup>a</sup>
PSM-II	0,006 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
PSM-III	0,006 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
BSM	0,049 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Fetuína	0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: Elaborado pelo autor. Concentração inibitória mínima (CIM) <sup>a</sup>

#### 4.3.3 Efeitos do pH, temperatura e cátion divalente na atividade hemaglutinante de AfiL

A atividade hemaglutinante de AfiL apresentou um pH ótimo na faixa neutro-alcalina (pH 7-10) e em condições ácidas houve perda de hemaglutinação, sendo está total em pH 4 (Figura 17A). AfiL permaneceu estável até temperatura de 50°C e perdeu cerca de 50% de sua atividade quando elevada a 60° e 70°C, e cerca de 87,5% quando elevado para 80°C por 1h, acontecendo perda total de atividade a 90°C. (Figura 17B). A atividade não foi afetada na presença de CaCl<sub>2</sub> ou EDTA (dados não mostrados).

Figura 17- Propriedades da atividade hemaglutinante de AfiL



Fonte: Elaborado pelo autor. Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade hemaglutinante de AfiL. A atividade hemaglutinante foi expressa em Unidades de Hemaglutinação por mL (Log<sub>2</sub> UH.mL<sup>-1</sup>).

#### 4.3.4 Sequenciamento de aminoácidos

As digestões com tripsina produziram 9 peptídeos identificáveis ao passo que com quimotripsina identificou-se 5 peptídeos (Tabela 6).

Tabela 6- Sequências de aminoácidos dos peptídeos de AfiL

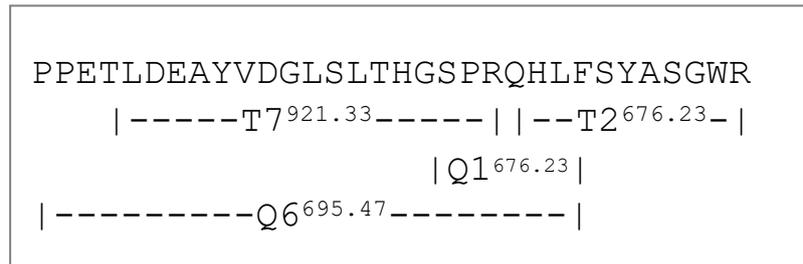
Peptídeo	<i>m/z</i>	Sequência	Massa		$\Delta$ (Da)
			Observada	Calculada	
<b>T1</b>	657.17	NYGSPDGFNSQK	1312.33	1312.56	0.23
<b>T2</b>	676.23	QHLFSYASGWR	1350.44	1350.68	0.24
<b>T4</b>	438.15	LVACPCR	874.34	874.41	0.13
<b>T6</b>	920.32	VPQAFVGDNYCDSVELASGK VDTK	2703.96	2704.26	0.30
<b>T7</b>	921.33	TLDEAYVDGLSLTHGSPR	1929.72	1929.94	0.22
<b>T9</b>	681.75	TFLFSYATAWR	1361.49	1361.67	0.18
<b>T13</b>	412.6	FDHHLR	823.30	823.40	0.10
<b>T17</b>	902.69	LWFPDTLLWHAATGCSDTDLAC R	2705.04	2705.30	0.26
<b>T22</b>	737.29	HDQLDEAYVDGLSLTHGSPR	2208.87	2208.95	0.08
<b>Q1</b>	471.18	GSPRQHFLF	940.35	940.39	0.04
<b>Q2</b>	662.74	SAVCGLVEGRNY	1323.4	1323.63	0.16
<b>Q6</b>	695.47	PPETLDEAYVDGLSLTHGSPRQH LF	2777.88	2778.36	0.48
<b>Q8</b>	399.16	PRQHFLF	796.32	796.43	0.11
<b>Q16</b>	456.67	ANSAGTSTGF	911.32	911.40	0.08

Fonte: Elaborado pelo autor. T- peptídeos obtidos por tripsina; Q- peptídeos obtidos por quimotripsina. *m/z*: massa/carga.  $\Delta$ : Massa cal. - Massa obs. Marcados em cinza apresentam microheterogeneidades.

O peptídeo T17 possui 20 aminoácidos e nenhuma região da sequência apresenta sobreposição com os demais peptídeos encontrados, o mesmo acontece com os peptídeos T1 e Q2, ambos com 12 aminoácidos. O peptídeo Q8 apresenta total semelhança ao peptídeo Q1, ausentando-se somente os aminoácidos Gly-Ser da região N-terminal. Encontrou-se também microheterogeneidade nos peptídeos T2 e T9, onde os aminoácidos Gln, His, Ser e Gly foram substituídos por Thr, Phe, Thr e Ala na devida ordem, e também nos peptídeos Q6 e T22, onde Pro, Glu e Thr foram substituídos por His, Asp e Glu respectivamente.

Encontrou-se sobreposição entre alguns peptídeos distintos. O peptídeo Q1 se sobrepõe na região C-terminal do peptídeo T7 (Gly-Ser-Pro-Arg) e a região N-terminal do peptídeo T2 (Gln-His-Leu-Phe). O peptídeo T7 se sobrepõe completamente ao peptídeo Q6, o de maior sequência encontrada (25 aminoácidos) (Figura 18). Com base nos achados, foi possível obter uma sequência contínua de 32 aminoácidos (MW = 3585,71).

Figura 18- Estrutura primária de AfiL parcialmente obtida por sobreposição de peptídeos



Fonte: Elaborado pelo autor. Sobreposição dos peptídeos obtidos a partir da digestão com: T- tripsina e Q-quimotripsina.

A sequência contínua e os peptídeos não sobrepostos foram submetidos ao programa BLASTp para comparar e identificar outras proteínas similares a AfiL. A sequência parcial de AfiL não apresentou similaridade com nenhuma família de lectina já conhecida, porém apresentou 33,33% de identidade e 69,26% de similaridade com uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha *Amphimedon queenslandica* XP\_019851427.1 (Figura 19).

Figura 19- Alinhamento da estrutura de AfiL, parcialmente obtida por MS/MS, com uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha *Amphimedon queenslandica*.



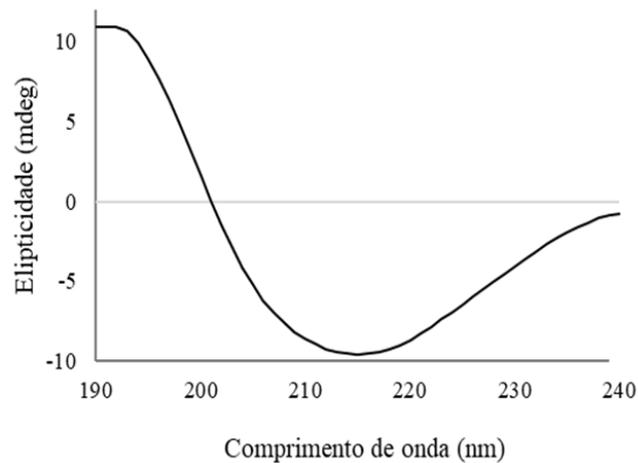
Fonte: Elaborado pelo autor. AfiL (*Aplysina fistularis* lectin), A.queenslandica (Proteína não caracterizada da esponja marinha *Amphimedon queenslandica*). Alinhamento realizado com o auxílio da ferramenta MultiAlin.

#### 4.3.5 Dicroísmo circular

Os espectros obtidos por DC da lectina em questão, mostraram uma absorção máxima positiva em 190 nm e uma máxima negativa com mínimo entre 210 e 220 nm (Figura

20). A ferramenta de predição CONTIN, alocado ao servidor online DICROWEB, mostrou que a estrutura secundária teórica de AfiL não apresenta  $\alpha$ -hélice (0%) e possui 58% de estruturas  $\beta$  e 42% de estruturas desordenadas. A lectina mostrou-se termorresistente frente as variações de temperatura, não permitindo determinar as temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) na presença ou ausência de ligantes.

Figura 20- Espectro de dicroísmo circular de AfiL

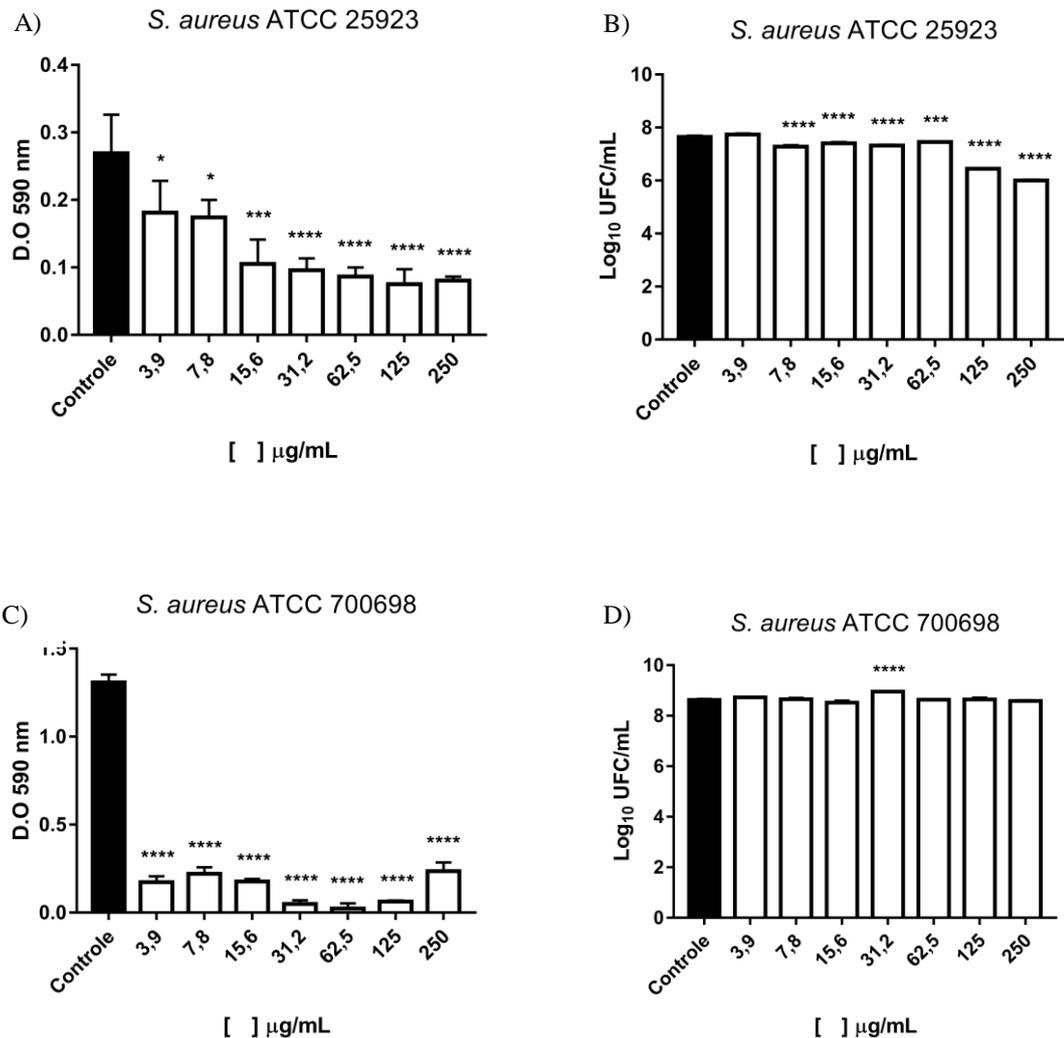


Fonte: Elaborado pelo autor. Espectros de DC em Far-UV (190-240 nm)

#### 4.3.6 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias

A AfiL não foi capaz de reduzir o crescimento planctônico da cepa *S. aureus* ATCC 25923, porém mostrou resultados satisfatórios ao inibir significativamente a formação de biofilmes em todas as concentrações testadas (Figura 21A). Com relação ao número de células viáveis somente a menor concentração ( $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) não apresentou efeito, as demais diminuíram na ordem de 0,3 a 1,0 logs.

Na cepa *S. aureus* ATCC 700698, relatada na literatura como resistente a metilicina (MRSA), foi observado efeito bacteriostático de AfiL com CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e efeito inibitório em mais de 70% na formação de biofilme em todas as concentrações testadas, merecendo destaque na concentração de  $62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que inibiu cerca de 100% da formação, em comparação com o controle negativo (Figura 21C). É interessante notar que o tratamento não causou redução no número de células viáveis do biofilme dessa cepa, do contrário, houve um aumento significativo na concentração de  $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na ordem de aproximadamente 0,3 logs (Figura 21D).

Figura 21- Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas *S. aureus*

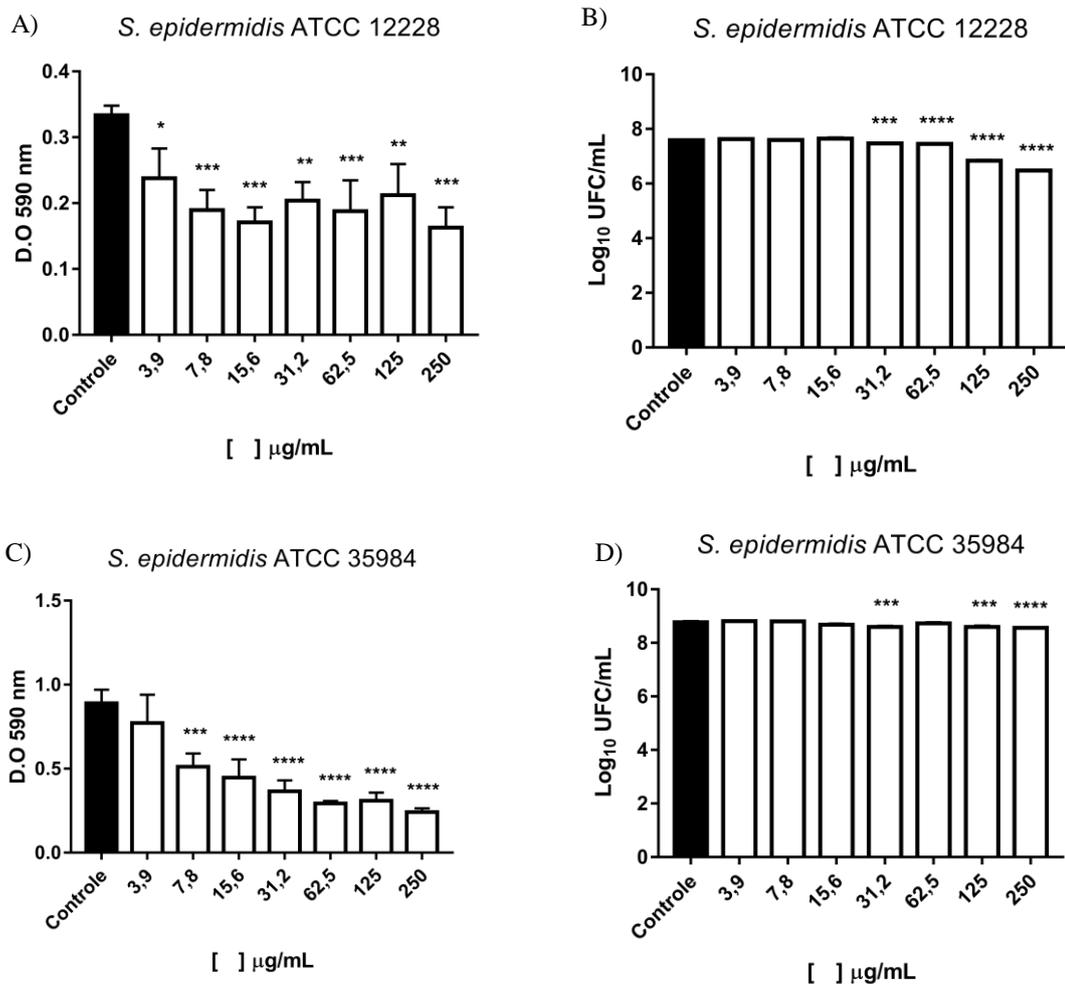
Fonte: Elaborado pelo autor. Quantificação da biomassa dos biofilmes (A, C,) e número de células viáveis presentes nos biofilmes (B, D). Barras brancas representam bactérias tratadas com AfiL, barras pretas representam bactérias sem tratamento. Significativamente diferente \* $p < 0,05$ \*\*  $p < 0,01$ \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao controle.

Dados semelhantes foram encontrados no tratamento das cepas de *S. epidermidis*. AfiL não apresentou efeito planctônico, porém foi capaz de diminuir significativamente a formação de biofilme. Em *S. epidermidis* ATCC 12228, AfiL teve efeito sob o biofilme formado, diminuindo sua produção de 30% a 50% nas concentrações testadas (Figura 22A). No ensaio sobre a quantificação de células viáveis, as cepas mostram-se suscetíveis, com redução significativa no número de UFCs nas maiores concentrações (31,2 a 250 µg.mL<sup>-1</sup>) na ordem de aproximadamente 0,2 a 1,0 logs (Figura 22B).

Em *S. epidermidis* ATCC 35984, relatado na literatura como cepas resistentes a antibióticos β-lactâmicos, AfiL apresentou bons resultados, reduzindo mais de 65% a formação do biofilme nas concentrações de 62,5 e 250 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 22C), sendo que,

apenas a menor concentração testada não mostrou efeito significativo. Com relação ao número de células viáveis presentes no biofilme, a lectina reduziu cerca de 0,3 logs nas concentrações de 31,2, 125 e 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

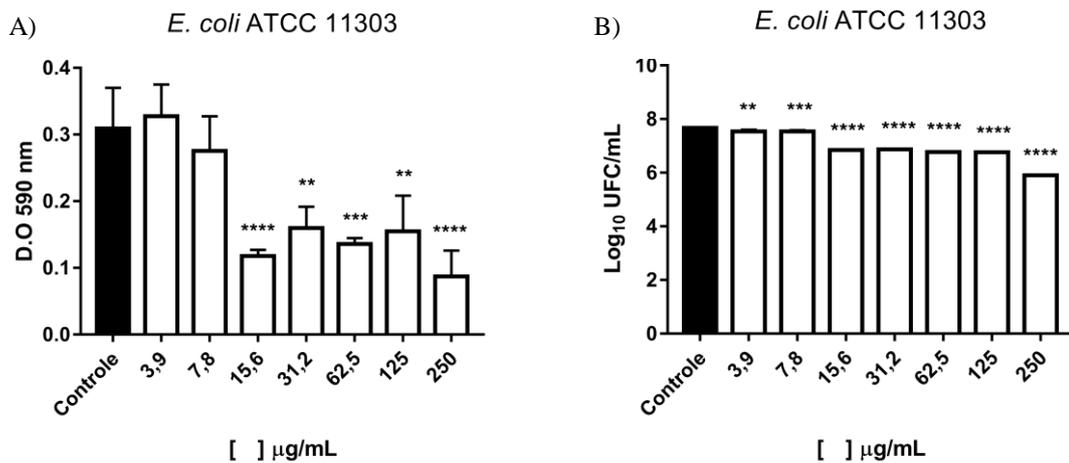
Figura 22- Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas *S. epidermidis*



Fonte: Elaborado pelo autor. Quantificação da biomassa dos biofilmes (A, C) e número de células viáveis presentes nos biofilmes (B, D). Barras brancas representam bactérias tratadas com AfiL, barras pretas representam bactérias sem tratamento. Significativamente diferente \* $p < 0,05$ \*\* $p < 0,01$ \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao controle.

A AfiL também mostrou efeito sobre o biofilme da cepa *E. coli* ATCC 11303, inibindo cerca de mais de 50% a 75% sua formação, nas concentrações variando de 15,6 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 23A). Em relação ao número de células viáveis presentes nos biofilmes, o tratamento com a lectina nessa cepa, apresentou os melhores resultados em comparação com as cepas apresentadas anteriores. Houve uma redução significativa de UFCs em todas as concentrações testadas, com destaque para a concentração de 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que diminuiu na ordem de 1,8 logs aproximadamente (Figura 23B).

Figura 23- Efeito de AfiL sobre a formação de biofilmes das cepas *E. coli*



Fonte: Elaborado pelo autor. Quantificação da biomassa dos biofilmes (A) e número de células viáveis presentes nos biofilmes (B). Barras brancas representam bactérias tratadas com AfiL, barras pretas representam bactérias sem tratamento. Significativamente diferente \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 em relação ao controle.

Nos ensaios de aglutinação bacteriana, foram utilizadas as cepas *E. coli* ATCC 11303 e *S. aureus* ATCC 25923. AfiL conseguiu aglutinar somente a espécie *S. aureus* (Figura 24B). A atividade aglutinante foi inibida quando a lectina foi posta em contato com  $\alpha$ -D-lactose (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Glc) (Figura 24C).

Figura 24- Aglutinação de *S. aureus* por AfiL



Fonte: Elaborado pelo autor. A – Espécie *S. aureus* em solução de NaCl 0,85%; B – Espécie *S. aureus* com AfiL; C – Espécie *S. aureus* com AfiL complexada com lactose. As imagens foram obtidas por microscopia óptica.

#### 4.4 Discussão

Neste trabalho, uma nova lectina foi extraída da esponja marinha *Aplysina fistularis* (AfiL), estabelecendo um protocolo de purificação a partir do extrato bruto e utilizando a cromatografia de afinidade em matriz Sepharose™ como principal técnica de

isolamento.

Devido à alta afinidade das lectinas de esponja para resíduos de galactosídeo, matrizes de Sepharose ou conjugadas são selecionadas nas primeiras etapas de purificação. O isolamento de ALL de *A. lactuca* (CARNEIRO *et al.*, 2017a) aconteceu por meio da matriz goma de guar e para AFL de *A. fulva* utilizou-se matriz Sepharose (CARNEIRO *et al.*, 2019). As lectinas AaL de *A. archeri* e AIL de *A. lacunosa* foram purificadas em coluna de  $\rho$ -aminobenzil- $\beta$ -1-tiogalactopiranosídeo-agararose (MIARONS; FRESNO, 2000).

Alguns protocolos para purificação de lectinas, podem requerer mais de uma técnica cromatográfica para obter sucesso na purificação, como realizado por Viana 2021, que para extrair ACL de *A. cauliformis* utilizou cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B, troca iônica, exclusão molecular e de fase reversa.

Trabalhos realizados com lectinas determinam suas massas moleculares relativas, sob condições nativas, utilizando como técnica a cromatografia de exclusão molecular e as massas de suas subunidades através da análise estimada por SDS-PAGE sob condições desnaturantes, a união dessas duas técnicas norteia o estudo estrutural da lectina (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Na ausência de agentes redutores, AfiL apresentou uma única banda de aproximadamente 70 kDa em SDS-PAGE e na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, duas bandas em torno de 30 kDa, uma mais larga e outra mais delgada. O perfil migratório de duas bandas em condições redutoras, também foi observado em outras lectinas extraídas do gênero *Aplysina*, como evidenciado em ACL (VIANA, 2021) e AFL de *A. fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019). Com base no perfil eletroforético e nos dados de peso molecular nativo de 224 kDa de AfiL, é possível sugerir que a lectina seja formada por uma unidade homodímera capaz de formar um oligômero com mais duas unidades. Comportamento semelhante também é encontrado em ACL, em que o autor sugere uma estrutura oligomérica (VIANA, 2021).

No SDS-PAGE as proteínas são submetidas a condições desnaturantes, abolindo sua conformação, por isso, nem sempre as massas moleculares estimadas se ajustam perfeitamente aos resultados encontrados na cromatografia de exclusão molecular. O SDS-PAGE, além de ser utilizado em estudos de massa aparente, apresenta-se útil em constatar a presença ou ausência de contaminante, evidenciando assim a eficiência do processo de isolamento (GARDÈRES, 2015), como observado nesse trabalho, ao constatar uma banda única no gel em torno de 70 kDa.

AfiL demonstrou ser mais ativa em pH na faixa neutro-alcálico, com seus maiores títulos de aglutinação entre pH 7 e 10. Resultados semelhantes são comumente observados em

outras lectinas de esponjas marinha em que a atividade se dar preferencialmente em zona alcalina, como em AFL e ALL que apresentaram maiores títulos de aglutinação entre pH 7 e 10 (CARNEIRO *et al.*, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2017a). Pequenas variações ótimas de faixas levemente ácidas podem ser observadas entre as lectinas, como em CvL que mostrou melhor atividade entre pH 6 e 8 (MOURA *et al.*, 2006) e CCL entre pH 6 e 9 (MARQUES *et al.*, 2018).

A atividade hemaglutinante de AfIL perante as variações de temperaturas, permaneceu inalterada até 50°C e mostrou variações de estabilidade em 60°, 70° e 80°C, com perda total de atividade em 90°C. Observando o comportamento térmico de outras lectinas de esponjas, em ALL a atividade permaneceu inalterada até 60°C e a lectina foi completamente desnaturada a 90°C, com perda total de atividade (CARNEIRO *et al.*, 2017a). Em H-1, sua capacidade de aglutinação reduziu gradualmente não apresentando estabilidade térmica e foi totalmente abolido a 70°C, do contrário, H-2 apresentou grande estabilidade, não alterando seu título de hemaglutinação em todas as temperaturas testadas até 80°C (CARNEIRO *et al.*, 2013b), o mesmo ocorreu com AFL, até 70°C (CARNEIRO *et al.*, 2019).

A desnaturação de uma proteína pode ser classificada como reversível ou irreversível. A medida com que a temperatura aumenta o equilíbrio estrutural entre estado nativo e estado desnaturado diminui, até chegar a um ponto que o processo se torna totalmente irreversível e conseqüentemente a proteína perde sua total atividade (NELSON; COX, 2014), fato esse que pode explicar a resistências estrutural em pontuais temperaturas de AfIL. Para Nelson e Cox (2014), uma mudança abrupta de temperatura pode gerar uma perda estrutural de uma parte e desestabilizar outras, causando perda total da função.

Avaliando a importância da presença ou ausência de íons divalentes na atividade hemaglutinante, observou-se que a AfIL não foi afetada pela presença ou ausência do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , e sua capacidade aglutinante persistiu mesmo na presença do EDTA, um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com íons metálicos. Isso mostra que AfIL não depende de íons metálicos para sua estabilização estrutural ou interação lectina-carboidrato.

A dependência do íon cálcio varia entre as lectinas de esponjas do gênero *Aplysina*. As lectinas AaL e ALL mostram-se dependente de íons divalentes ( $\text{Ca}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) como mediadores da ligação à carboidratos e tiveram sua atividade inibida por EDTA (MIARONS; FRESNO, 2000; MOURA *et al.*, 2006), do contrário, a atividade de ALL, AFL e ACL não foi afetada pela presença do agente quelante (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; VIANA, 2021).

As lectinas extraídas de esponjas do gênero *Aplysina*, bem como de outras esponjas, parecem exibir usualmente, afinidade por galactose e seus derivados com ligação do tipo Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4. AfiL mostrou preferência por dissacarídeos e galactosídeos contendo essa característica de ligação como a D-lactose, D-lactulose e nitrofenil-D-galactosídeo, perfil semelhante encontrado em AFL (CARNEIRO *et al.*, 2019) e ALL (CARNEIRO *et al.*, 2017a). Outras lectinas de esponjas também mostraram afinidade por dissacarídeos como CvL (MOURA *et al.*, 2006) e CCL (MARQUES *et al.*, 2018).

Analisando a importância da natureza dos grupos em C1, AfiL não reconheceu os açúcares com terminais de elevada hidrofobicidade como o fenil- $\beta$ -D-galactosídeo e 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, do contrário, foi inibida por 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo e 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo. O fato desses dois nitrocompostos aromáticos não interferirem no reconhecimento de AfiL pelo açúcar, pode estar relacionado a dirigência do grupo nitro no anel aromático. A posição em *orto* expõe uma maior região do anel hidrofóbico. Por outro lado, o grupo em *para*, em 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo e 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo, torna a região um pouco menos hidrofóbica pela menor exposição do anel aromático, quando comparado com os demais açúcares mencionados em questão.

Tratando-se de glicoproteínas, AfiL foi inibida fortemente por PSM, seguida por BSM e fetuína. É comum encontrarmos a inibição por mucinas entre as lectinas de esponjas, algumas até muito específicas que não reconhecem nenhum carboidrato simples e se ligam especificamente a glicoproteínas, como foi o caso de CAL, a lectina de *Craniella australiensis* (XIONG *et al.*, 2006), H-1 e H-2 (CARNEIRO *et al.*, 2013b). No caso de H-3 a lectina ligou preferencialmente PSM, porém foi capaz de reconhecer também *N*-acetilgalactosamina (CARNEIRO *et al.*, 2013). Outras lectinas extraídas do gênero *Aplysina* como ALL, AFL e ACL, também foram inibidas por PSM (CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; VIANA, 2021). Já as lectinas de *A. archeri* e *A. lacunosa* foram inibidas por fetuína e galactosídeos (MIARONS; FRESNO, 2000).

A estrutura primária parcial de AfiL não apresentou semelhança com nenhum membro das famílias de lectina animal, no entanto, ao comparar a lectina com um fragmento do genoma da esponja marinha *Amphimedon queenslandica*, observou-se 33,33% de identidade e 69,26% de similaridade. A H-3 de *Haliclona caerulea*, também não mostrou nenhuma semelhança com qualquer lectina conhecida, mas apresentou alta similaridade com uma proteína putativa codificada no genoma de *A. queenslandica* (CARNEIRO *et al.*, 2013a).

A estrutura teórica secundária de AfiL apresentou 0% de  $\alpha$ -hélice. Perfil semelhante foi encontrado em AFL compostas somente por 2%. ALL e CLL apresentou

percentual pouco maior de 9% e 10,4% de  $\alpha$ -hélice respectivamente, porém com predominâncias de estruturas  $\beta$ , fato este que se tem observado em estruturas secundárias de esponjas marinhas (CARNEIRO *et al.*, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2017a; MARQUES *et al.*, 2018).

Sreerama e Woody 2003 comparam os espectros de dicroísmo circular de 16 proteínas ricas em estruturas  $\beta$  e comprovam que proteínas do tipo  $\beta$ -I apresentam uma banda forte em torno de 190 nm e uma banda negativa em torno de 210-220 nm no espectro de dicroísmo. Assim, com base no espectro de AfiL, podemos classifica-la como uma  $\beta$ <sub>I</sub>-proteína, que por sua vez difere de  $\beta$ <sub>II</sub>-proteína por apresentar um número maior de estruturas  $\beta$  e uma razão com estruturas desordenadas menor que 0,4.

Algumas lectinas de esponjas apresentam grande capacidade de se ligarem a carboidratos específicos da parede celular bacteriana e, dessa forma, exibem atividades antibacterianas (GARDÈRES *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2017a; MARQUES *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2019).

Atualmente os antibióticos atingem principalmente microrganismos em crescimento exponencial resultando apenas na eliminação das células planctônicas e são pouco eficazes contra os biofilmes, o que promove a busca por agentes adjuvantes que inibam ou diminuam a formação do biofilme (BELOIN *et al.*, 2014). Nesse contexto, AfiL seria um forte agente adjuvante contra infecções bacterianas, visto que além de inibir a formação do biofilme em cepas de bactérias gram-negativas e gram-positivas, causou também efeito bacteriostático em cepas resistentes de *S. aureus* no estado planctônico.

Assim como AfiL, que causou aglutinação de *S. aureus*, outras lectinas de esponjas também apresentaram capacidade de aglutinar células bacterianas, como CCL que aglutinou *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (MARQUES *et al.*, 2018), ALL que aglutinou *S. aureus* e *E. coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017a) e a lectina de *A. cauliformis*, que aprestou essa atividade para cepa *E. coli* (VIANA, 2021).

Do ponto de vista biomédico, o processo de aglutinação seria um recurso que poderia contribuir para a eliminação de bactérias no foco infeccioso, preparando um campo antes que as células fagocíticas do hospedeiro entrem em ação, facilitando o processo fagocitário (TORRENT *et al.*, 2012).

As reações de aglutinação trazem importantes implicações na medicina clínica, uma vez que esse ensaio pode ser usado para identificar culturas bacterianas e tem sido comumente utilizado em países em desenvolvimento para determinar se um paciente teve ou tem uma infecção bacteriana, um exemplo é o teste Widal, usado no diagnóstico de febre

tifóide, em que se procura a aglutinação de *Salmonella enterica* subespécie *typhi* em soros de pacientes na fase aguda (JEMILOHUN; ADEYANJU; BELLO, 2017).

Do ponto de vista biotecnológico, uma vez observado a seletividade da lectina por determinada bactéria, o teste de aglutinação poderia ser utilizado como base para projetos de biodispositivos ou para outras aplicações envolvendo captura bacteriana. Gasmi, Ferré e Herrero (2017) desenvolveram um biossensor específico a lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), utilizando lectinas na interface de reconhecimento. A criação foi possível devido a capacidade da lectina em reconhecer, aglutinar e reter bactérias gram-negativas (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae*) no sistema. O biossensor foi capaz de discriminar bactérias gram-negativas de bactérias gram-positiva, possuiu alta sensibilidade e rápida determinação.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos protocolos estabelecidos, foram purificadas duas novas lectinas de esponjas marinhas, HiL de *Haliclona (Reniera) implexiformis* e AfiL de *Aplysina fistularis*, ambas coletadas no litoral cearense. O sucesso na purificação foi garantido utilizando cromatografias de afinidade, uma técnica eficiente e amplamente utilizada no isolamento de lectinas de esponjas. As duas lectinas apresentaram resistência térmica e suportaram variações de pH, características importantes que mantem a integridade da proteína e sua atividade. As estruturas primárias das lectinas foram parcialmente determinadas. Na AfiL, houve avanço um pouco maior do que em HiL, por ter encontrado uma lectina putativa codificada no genoma da esponja marinha *Amphimedon queeslandica*, que apresentou significativa identidade, porém ainda é necessária uma maior investigação para elucidar sua estrutura primária. A descoberta de novas lectinas de esponjas é de extrema relevância para o avanço biotecnológico dos recursos naturais, visto que a habilidade dessas moléculas em reconhecer e interagir com carboidratos bacterianos de cepas patogênicas podem ser úteis no processo de aglutinação bacteriana ou atuarem na potencialização da ação antibiótica contra bactérias resistentes produtoras de biofilmes.

## REFERÊNCIAS

- ANJUM, K. *et al.* Marine sponges as a drug treasure. **Biomolecules and Therapeutics**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 347-362, 2016.
- BELOIN *et al.* Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 18, p. 61-68, 2014.
- BISPO, A.; CORREIA, M. D.; HAJDU, E. Two new shallow-water species of *Haliclona* from north-eastern Brazil (Demospongiae: Haplosclerida: Chalinidae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 237-249, 2016.
- 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**, [s. l.], v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCK, F. *et al.* Amino acid sequence of the D-galactose binding lectin II from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt) and identification of the carbohydrate binding site in lectin II and related lectin I. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 153-160, 1998.
- CARNEIRO, R. F. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea***. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013a.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* 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, n. 1, p. 51-58, 2013b.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 72, p. 1368-1375, 2015.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 99, p. 213-222, 2017a.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* 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, n. 1, p. 49-64, 2017b.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 662, n. October 2018, p. 169-176, 2019.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 122-173, 2019.

CAVALCANTE *et al.* A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Adv Biosci Biotechnol**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1073-1078, 2013.

CHAVES, R. P. *et al.* *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin Family. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 2629-2638, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for Dilution Antibacterial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard – Tenth Edition. **M07-A10**, Pennsylvania, v.35, n. 2, p. 1-87, 2015.

COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

CROUZET, M. *et al.* Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1-12, 2014.

DE MELO, A. A. *et al.* 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.

DE VOOGD *et al.* **World Porifera Database**. 2021. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/porifera>. doi:10.14284/359. Acesso em: 31 de set. 2021.

DO NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* 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.

DRESCH, R. R. *et al.* ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 23-30, 2008.

EL-DEMERDASH, A. *et al.* Chemical diversity and biological activities of marine sponges of the genus *Suberea*: A systematic review. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 1-14, 2019.

ERCOLANO, G.; DE CICCO, P.; IANARO, A. New drugs from the sea: Pro-apoptotic activity of sponges and algae derived compounds. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1-31, 2019.

FROMONT, J.; ABDO, D. A. New species of *Haliclona* (Demospongiae: Haplosclerida: Chalinidae) from Western Australia. **Zootaxa**, [s. l.], v. 3835, n. 1, p. 97-109, 2014.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.

- GASMI, L.; FERRÉ, J. F.; HERRERO, S. High bacterial agglutination activity in a single-CRD C-Type lectin from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biosensors**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1-9, 2017.
- GARDÈRES, J. *et al.* 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**, [s. l.], v. 200, p. 17-27, 2016.
- GIANNINI, C. *et al.* New sesquiterpene derivatives from the sponge *Dysidea* species with a selective inhibitor profile against human phospholipase A2 and other leukocyte functions. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 612-615, 2001.
- GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism, **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2733-2741, 2006a.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions, **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2527-2535, 2006b.
- HESTETUN, J. T.; TOMPKINS-MACDONALD, G.; RAPP, H. T. A review of carnivorous sponges (Porifera: Cladorhizidae) from the Boreal North Atlantic and Arctic. **Zoological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 1-69, 2017.
- HECHTEL, G. J. A systematic study of the Demospongiae of Port Royal, Jamaica. **Bulletin of the Peabody Museum of Natural History**, [s. l.], v. 20, p. 1-103, 1965.
- ISLAM, B.; KHAN, S. N.; NAEEM, A.; SHARMA, V.; KHAN, A. U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm training on saliva-revestido **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 106, n. 5, p. 1682-1689, 2009.
- JEMILOHUN, A. C.; ADEYANJU, A. T.; BELLO, M. M. How useful is the widal test in modern clinical practice in developing countries? A Review. **IJTDH**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1-11, 2017.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1572, n. 2, p. 187-197, 2002.
- KITA, A. *et al.* Crystal structure of a symbiosis-related lectin from octocoral. **Glycobiology**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1016-1023, 2015.
- KIRMUSAOĞLU, S. The correlation of the biofilm production with methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Sciences and Research**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 191-205, 2017.
- KOO, H. *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 740-755, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LEBOUVIER, N. *et al.* Antiplasmodial activities of homogentisic acid derivative protein kinase inhibitors isolated from a vanuatu marine sponge *Pseudoceratina* sp. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 640-653, 2009.

MANCONI, R.; PRONZATO, R. Phylum Porifera. In: THORP, J. H.; COVICH, A. P. **Ecology and classification of North American freshwater invertebrates**. 4 ed. [s. l.], 2015.

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 83-91, 2016.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 364, n. 13, p. 1-10, 2017.

MARQUES, D. N. *et al.* 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.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antimicrobial therapy: principles of use. **Medicine (United Kingdom)**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 614-621. 2017.

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**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 955-62, 1985.

MEDEIROS, D. S. *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella* apion: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, [s. l.], v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Vet. J.**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 398-407, 2006.

MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.

MOORE, D. Panobinostat (farydak): A novel option for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. **P and T**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 296-300, 2016.

MOTOHASHI, S. *et al.* Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the sea hare *Aplysia kurodai*. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1-14, 2017.

MOURA, R. M. 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**, [s. l.], v. 145, p. 517-523, 2006.

- MURICY, G. 2021. Porifera in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/6>. Acesso em: 26 set. 2021.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2014.
- PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, [s. l.], v. 132, p. 213-221, 2002.
- PECHENIK, J. A. **Biologia dos invertebrados**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.
- RAAFAT, K.; WURGLICS, M. Phytochemical analysis of *Ficus carica* L. active compounds possessing anticonvulsant activity. **J Tradit Complement Med**, [s. l.], v. 9, n. 4 p. 263-270. 2019.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAMPAIO, S. S.; COSTA, F. H. F.; RAMOS, M. V. A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **J Appl Phycol**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 539-546, 1999.
- SCHRÖDER, H. C. *et al.* Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 35, p. 32810-32817, 2003.
- SCHRÖDER, H.C. *et al.* The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'- 5') oligoadenylate metabolism. **Antivir. Chem. Chemother**, [s. l.], v. 1, p. 99-105, 1990.
- SANTOS, G. J.G. **Taxonomia das esponjas marinhas do estado da Paraíba**. 2016. 323 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- SHARO, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognize molecules. **Glycobiology**, [s. l.], v. 14, n.11, p.53-62, 2004.
- SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.
- SEYREK, K.; RICHTER, M.; LAVRIK, I. N. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 26, p. 98-993, 2019.
- SOUSA *et al.* Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **BBA- General Subjects**, [s. l.], v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Structural composition of  $\beta$ I- and  $\beta$ II-proteins. **Protein Science**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 384-388, 2003.

SUNA, H. *et al.* Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 3968-3972, 2009.

TONG *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TORRENT, M. *et al.*, Exploring new biological functions of amyloids: bacteria cell agglutination mediated by host protein aggregation. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2012.

UEDA, T. *et al.* Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 412-425, 2013.

VARIJAKZHAN *et al.* Bioactive compounds from marine sponges: fundamentals and applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 19, n. 246, p. 2-38, 2021.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 9, 2014.

VASTA, G. R.; AHMED, H. **Animal Lectins: A Functional View**. [s. l.]: CRC Press, 2009.

VIANA, L. A. A. **Purificação, caracterização bioquímica e estrutura primária parcial de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis***. 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

VILA, J. *et al.* Escherichia coli: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 40, p. 437- 463, 2016.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids**, [s. l.], v.1, n. 32, p. 668-673, 2008.

WIDERSTRÖM, M. Significance of *Staphylococcus epidermidis* in health care-associated infections, from contaminant to clinically relevant pathogen: this is a wake-up call! **J Clin Microbiol**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1679-1681, 2016.

WU, T. *et al.* Oncolytic vaccinia virus expressing aphrocallistes vastus lectin as a cancer therapeutic agent. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 6, 2019.

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*, **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, [s. l.], v. 143, n. 1, p. 9-16, 2006.

ZELENSKY, A. N.; GREADY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.

ZHANG, H. *et al.* A search for kinase inhibitors and antibacterial agents: Bromopyrrolo-2-aminoimidazoles from a deep-water Great Australian Bight sponge, *Axinella* sp. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 53, n. 29, p. 3784-3787, 2012.