



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

JESSICA DE ASSIS DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIBACTERIANO EM COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DE UMA
LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca***

FORTALEZA

2022

JESSICA DE ASSIS DUARTE

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIBACTERIANO EM COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DE UMA LECTINA
DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

D872c Duarte, Jessica de Assis.

Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* / Jessica de Assis Duarte. – 2022.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientação: Prof. Dr. Romulo Farias Carneiro.

1. Esponjas marinhas. 2. Lectinas. 3. Estrutura primária. 4. Sinergismo. I. Título.

CDD 639.2

JESSICA DE ASSIS DUARTE

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIBACTERIANO EM COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DE UMA LECTINA
DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 21/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

À Deus, por me manter firme durante essa jornada. Ao meu esposo Joaquim, meu filho Arthur, minha mãe Rose e minha tia Vânia que me deram apoio incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me ajudou a superar os obstáculos, me dando forças para concluir essa dissertação de mestrado que tanto me ajudou a evoluir.

Ao meu esposo Joaquim e meu filho Arthur, que foram meu porto seguro e me deram força nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Rose, tia Vânia e minha irmã Denisia por todo amor, carinho e compreensão.

Ao meu pai, por todo amor e confiança.

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Holanda Sampaio, pela oportunidade de ser sua orientanda, pelos ensinamentos e por sua disponibilidade sempre que foi preciso.

Ao meu co-orientador, Prof. Rômulo Farias Carneiro, pelos ensinamentos, paciência, amizade, por me auxiliar com ideias e por me ajudar a crescer na pesquisa. Não tenho como descrever todo meu agradecimento.

À Renata Pinheiro, pela amizade, por toda ajuda no laboratório e por compartilhar de forma tão disponível seu conhecimento.

Ao Prof. Celso Shiniti Nagano, pelos ensinamentos, por aceitar estar na minha banca examinadora e momentos de descontração.

Ao meu parceiro de bancada e amigo, Renato César, pelos conselhos, sorrisos, paciência e por me ajudar nos momentos difíceis do mestrado.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Andressa, Juliana, Philippe, por terem me recebido tão bem, compartilhado seu conhecimento e me auxiliado desde o início, e que assim como o Regi, Pedro Arthur, Pedro Abílio por tornarem os meus dias mais leves compartilhando suas histórias, alegria e sorrisos e por todo apoio nos momentos de aflição.

Aos professores Mayron Vasconcelos, Alexandre Andrade e outros que auxiliaram no complemento da pesquisa.

À Camila e Iracilda que me ajudaram sempre que foi preciso.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realização do mestrado

E a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

As esponjas são animais pertencentes ao filo Porífera, um dos mais antigos e com organização celular mais simples dentre os metazoários. O gênero *Aplysina* foi inserido à Ordem *Verongideae* devido a presença de compostos bromados com elevados efeitos biológicos oriundos de seu metabolismo. Além destes compostos, lectinas, proteínas capazes de se ligar à carboidratos sem alterar sua estrutura, já foram identificadas neste gênero. As lectinas têm a capacidade de interagir com glicanos alvos e desencadear respostas variadas, incluindo a inibição do desenvolvimento de vários patógenos. A determinação da sequência de aminoácidos dessas proteínas é essencial para compreender melhor suas funções, porém nesses organismos poucas estruturas primárias de lectinas foram completamente determinadas. Dentre as lectinas purificadas de esponjas marinhas, apenas uma tem sua estrutura tridimensional determinada. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi caracterizar estruturalmente e avaliar o potencial antibacteriano, em associação com diferentes antibióticos, e o efeito antibiofilme da lectina da esponja marinha *Aplysina lactuta* (ALL). ALL é uma proteína de 15 kDa que se oligomeriza formando um tetrâmero de 60 kDa. A lectina apresentou afinidade pelas glicoproteínas fetuína, asialo fetuína, mucina tipo III e mucina submaxilar bovina tipo I. As sequências de duas isoformas de ALL, denominadas ALL-a e ALL-b, foram completamente determinadas por espectrometria de massas em associação com degradação de Edman. ALL-a e ALL-b possuem 144 aminoácidos com massas moleculares de 15.736 Da e 15.985 Da, respectivamente. Ambas possuem sequências de aminoácidos contendo resíduos conservados típicos da família das galectinas. As estruturas tridimensionais previstas de ALL-a e ALL-b revelaram uma arquitetura de β sanduíche com duas folhas β antiparalelas. A previsão do sítio de ligação mostra as interações envolvendo os sacarídeos como ocorre em galectinas. ALL é uma proteína com potencial antibacteriano, quando em associação com a ampicilina a lectina potencializou seu efeito antibiótico, além de inibir a formação biofilme. Dessa forma, ALL mostra ser uma lectina com elevado potencial para elaboração de novos fármacos antibacterianos.

Palavras-chave: esponjas marinhas; lectinas; estrutura primária; sinergismo.

ABSTRACT

Sponges are animals belonging to the phylum Porifera, one of the oldest and with the simplest cellular organization among the metazoans. The genus *Aplysina* was inserted into the Order Verongideae due to the presence of brominated compounds with high biological effects arising from their metabolism. In addition to these compounds, lectins, proteins capable of binding to carbohydrates without altering their structure, have already been identified in this genus. Lectins have the ability to interact with target glycans and trigger varied responses, including inhibiting the development of various pathogens. Determining the amino acid sequence of these proteins is essential to better understand their functions, but in these organisms few primary lectin structures have been completely determined. Among the lectins purified from marine sponges, only one has its three-dimensional structure determined. Thus, the objective of this work was to structurally characterize and evaluate the antibacterial potential, in association with different antibiotics, and the antibiofilm effect of the lectin from the marine sponge *Aplysina lactuta* (ALL). ALL is a 15 kDa protein that oligomerizes to form a 60 kDa tetramer. The lectin showed affinity for the glycoproteins fetuin, asialo fetuin, mucin type III and bovine submaxillary mucin type I. The sequences of two isoforms of ALL, named ALL-a and ALL-b, were completely determined by mass spectrometry in association with degradation of Edman. ALL-a and ALL-b have 144 amino acids with molecular masses of 15,736 Da and 15,985 Da, respectively. Both have amino acid sequences containing conserved residues typical of the galectin family. The predicted three-dimensional structures of ALL-a and ALL-b revealed a β sandwich architecture with two antiparallel β sheets. The binding site prediction shows interactions involving saccharides as in galectins. ALL is a protein with antibacterial potential, when in association with ampicillin the lectin potentiated its antibiotic effect, in addition to having an antibiofilm effect. Thus, ALL shows to be a lectin with high potential for the development of new antibacterial drugs.

Keyword: marine sponges; lectins; primary structure; synergistic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização do DRC de galectinas de invertebrados e vertebrados.....	18
Figura 2 -	Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose – 6B.....	31
Figura 3 -	Cromatografia de exclusão molecular.....	32
Figura 4 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida de ALL.....	34
Figura 5 -	Cromatografia de exclusão molecular de ALL.....	35
Figura 6 -	Sequências de aminoácidos das isoformas de ALL- a e ALL- b.....	38
Figura 7 -	Alinhamento entre as isoformas ALL - a e ALL – b.....	39
Figura 8 -	Alinhamento de ALL - a com proteínas similares identificadas no programa BLAST.....	40
Figura 9 -	Alinhamento de ALL - b com proteínas similares identificadas no programa BLAST.....	41
Figura 10 -	Alinhamento de ALL - a e ALL - b com galectinas de esponjas marinhas.....	42
Figura 11 -	Alinhamento do DRC de ALL com outras galectinas de esponja.....	43
Figura 12 -	Alinhamento de ALL -a e ALL -b com galectinas prototipo.....	44
Figura 13 -	Estrutura tridimensional prevista de ALL – a e ALL – b.....	45
Figura 14 -	Estrutura 3D prevista de ALL-a complexada com galactose.....	46
Figura 15 -	Estrutura 3D prevista de ALL-b complexada com galactose e lactose-ácido siálico.....	47
Figura 16 -	Efeito de ALL sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>S. epidermidis</i>	51
Figura 17 -	Efeito de CAM-ALL sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>S. epidermidis</i>	52
Figura 18 -	Número de células viáveis de <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>S. epidermidis</i> com ALL.....	53
Figura 19 -	Número de células viáveis de <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>S. epidermidis</i> com CAM-ALL.....	54
Figura 20 -	Representação esquemática dos elementos estruturais O-glicanos de mucina.....	56
Figura 21 -	Subsítio do DRC das galectinas.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Famílias de lectinas de esponjas.....	16
Tabela 2 -	Lectinas de esponja com estrutura primária determinada.....	19
Tabela 3 -	Sumário da purificação de ALL.....	32
Tabela 4 -	Atividade hemaglutinante.....	33
Tabela 5 -	Inibição da atividade hemaglutinante de ALL por glicoproteínas.....	33
Tabela 6 -	Sequência de peptídeos utilizados para obtenção da estrutura primária de ALL – a.....	36
Tabela 7 -	Sequência de peptídeos utilizados para obtenção da estrutura primária de ALL – b.....	37
Tabela 8 -	Microheterogeneidades observadas nas isoformas de ALL.....	39
Tabela 9 -	Efeito da lectina ALL combinada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina sobre <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>E. coli</i>	49

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA.....	12
1.1	Esponjas Marinhas.....	12
1.2	Lectinas.....	15
1.2.2	<i>Lectinas de Aplysina.....</i>	20
1.2.2.1	<i>Lectina de Aplysina lactuca.....</i>	21
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Coleta da esponja marinha.....	23
3.2	Purificação da lectina.....	23
3.2.1	<i>Derivatização da lectina de Aplysina lactuca ALL.....</i>	24
3.3	Atividade hemaglutinante e estudos de inibição.....	24
3.4	Eletroforese e estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.....	25
3.5	Determinação da estrutura primária.....	25
3.5.1	<i>Determinação da sequência de aminoácidos do N-terminal.....</i>	25
3.5.2	<i>Determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)</i>	26
3.5.2.1	<i>Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em gel.....</i>	26
3.5.2.2	<i>Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em solução.....</i>	26
3.5.2.3	<i>Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão.....</i>	26
3.5.2.4	<i>Análise dos dados.....</i>	27
3.5.2.5	<i>Análise da sequência de aminoácidos.....</i>	27
3.6	Modelagem molecular e predição do local de ligação ao carboidrato.....	28
3.7	Atividade antibacteriana.....	28
3.7.1	<i>Microrganismos.....</i>	28
3.7.2	<i>Atividade de ALL e CAM-ALL sobre o crescimento planctônico dos microrganismos.....</i>	28
3.7.3	<i>Atividade da lectina combinada a antibióticos.....</i>	29

3.7.4	<i>Ação das lectinas sobre a formação dos biofilmes</i>	29
3.7.5	<i>Quantificação da Biomassa</i>	30
3.7.6	<i>Enumeração de células viáveis</i>	30
3.7.7	<i>Análise estatística</i>	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Purificação da lectina	31
4.2	Atividade hemaglutinante e estudos de inibição	33
4.3	Eletroforese e estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular	34
4.4	Determinação da Sequência de Aminoácidos	36
4.4.1	<i>Sequência de aminoácidos do N- terminal</i>	36
4.4.2	<i>Sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)</i>	36
4.5	Domínio Conservado	40
4.6	Modelagem molecular e predição do local de ligação ao carboidrato	44
4.7	Atividade Antibacteriana	47
4.8	Atividade da lectina combinada a antibióticos	47
4.9	Ação das lectinas sobre a formação dos biofilmes	50
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA

1.1 Esponjas Marinhas

Inicialmente identificadas como plantas, devido a sua forma e ausência de movimento (SARÀ, 2021), as esponjas atualmente são caracterizadas como animais, apesar de suas características bem distintas. Dados obtidos através de estudos de biologia molecular sugerem que esses seres vivos e outros animais mais complexos, evoluíram de um ancestral em comum. São organismos bentônicos (possuem o meio de vida sésil fixo ao substrato), pertencentes ao filo Porífera (do latim *porus* = poro, *ferre* = portar), e são os metazoários mais primitivos que habitam o planeta (VAN SOEST *et al.*, 2012).

Dentre os seres multicelulares, as esponjas são os que possuem um nível de organização celular mais simples, composto por um sistema de filtração formado por canais constituídos de estruturas flageladas (coanócitos). Entretanto, são altamente eficientes na obtenção de micropartículas de nutrientes, oxigenação, além de eliminação de compostos tóxicos através da passagem do fluxo de água pelo seu corpo (MÜLLER; MÜLLER, 2003). Esse sistema aquífero não é observado apenas em esponjas carnívoras, que utilizam uma superfície externa pegajosa para capturar suas pequenas presas (TRAUTMAN; HINDI, 2001; VAN SOEST *et al.*, 2012).

As esponjas são predominantemente marinhas, porém algumas espécies podem ser observadas em água doce, apresentando tamanhos, aparência, cores, formas e consistências bem variadas (SARÀ, 2021). Apesar de serem organismos sésseis, suas larvas são móveis e nadam livremente de forma limitada no plâncton até se fixarem ao substrato e crescerem. Devido a facilidade de adaptação, relacionado ao seu *bauplan* (plano corporal) praticamente inalterado ao longo de sua existência, as esponjas estão amplamente distribuídas em todo o globo e são observadas de forma vertical desde regiões litorais à zona de mar profundo e de forma horizontal dos trópicos a latitudes mais elevadas. Dessa forma, esses animais também se mostram presentes em locais de climas bem distintos e a presença desses animais em zonas mais distantes pode se dar pela movimentação das correntes marinhas (HOOPER; VAN SOEST, 2002; VAN SOEST *et al.*, 2012).

O corpo dos poríferos contém diversos poros, denominados de óstios, pelos quais a água penetra e o local pelo qual a água é eliminada é o ósculo (DIAS, 2006). Por não possuírem tecidos e órgãos, as esponjas são formadas por células móveis com elevada capacidade de diferenciarem umas das outras, o que confere plasticidade à forma de

crescimento, responsáveis por suas funções vitais (HOOPER *et al.*, 2002). As partes externas e internas, assim como canais e câmaras microscópicas das esponjas são cobertas por uma camada de células achatadas em forma de T (pinacócitos), e na cavidade interna observa-se a presença dos coanócitos, responsáveis pelo sistema circulatório (aquífero) dos poríferos. O espaço entre os canais e as câmaras é preenchido por uma matriz de colágeno, denominada mesoilo, onde podem ser observadas células livres denominadas amebócitos (DE VOS *et al.*, 1991; VAN SOEST *et al.*, 2012), e o seu esqueleto é formado por pequenas espículas de carbonato de cálcio, sílica ou por fibras de colágeno (espongina) (BERGQUIST; DE COOK, 2002; EL-BAWAB, 2020).

As esponjas são importantes microhabitats aquáticos vivendo em simbiose com outros diversos microrganismos, animais e vegetais. Os ambientes ocupados pelos poríferos são de intensa competição física e química, fazendo com que as esponjas possuam um metabolismo complexo, de forma que esses organismos em associação com seus simbioses produzem compostos bioativos para eliminar predadores e concorrer por espaço com outras espécies, o que permite sua permanência no ambiente (MEHBUB, 2014; VAN SOEST *et al.*, 2012). De acordo com Puyana *et al.* (2015), dentre os invertebrados marinhos, as esponjas são as maiores fontes de metabólitos secundários, que já foram isolados e descritos com elevado potencial biotecnológico. As esponjas marinhas forneceram os primeiros produtos naturais marinhos, e a descoberta do nucleosídeo esponjouridina na década de 1950, levou ao primeiro medicamento antiviral Ara-A (Vidarabina®) (SIGWART, *et al.*, 2021). Até 2013, foram relatados 24.662 novos compostos, denominados de Produtos Naturais Marinhos (Marine Natural Products – MNPs), sendo que cerca de 32,4% foram isolados de esponjas marinhas (PANGGABEAN *et al.*, 2022). Dados compilados de estudos científicos mostraram que aproximadamente 80% dos MNPs pertenciam aos filos Porifera e Cnidaria com 47,1% e 33,5%, respectivamente (NIGAM *et al.*, 2019).

O filo porífera possui cerca de 9200 espécies descritas e agrupadas em quatro classes: Calcarea (do latim *calcis* = calcário), apresentam espículas de carbonato de cálcio aculeiformes ou com três a quatro raios, sendo que todas as espécies são marinhas; Hexactinélídea (do latim *hex* = seis, *aktis* = raio, *ellus* = sufixo diminutivo), contém espículas silicosas de seis raios, corpo geralmente cilíndrico ou em forma de funil, habitam águas profundas e também todas são marinhas; Demospongeae (do latim *demos* = povo, *spongos* = esponja) possui espículas silicosas ou de espongina (monoaxônicas ou tetraxônicas), com apenas uma família encontrada em água doce, sendo todas as outras de origem marinha; e Homoscleromorfa (do latim *homos* = igual, *skleros* = duros, *morphe* = forma), espículas

ausentes, ou quando presentes são muito pequenas e possuindo forma simples (GAZAVE *et al.*, 2012; KOHN *et al.*, 2020; MCMURRAY; BLUM; PAWLIK, 2008).

A Classe *Demospongiae* é a maior do filo Porífera, representando cerca de 90% de todas as espécies de esponjas. As esponjas desta classe possuem esqueleto formado por fibras de espongina, que é exclusiva ao grupo, além de ampla variedade de cores e formas. Podem ser encontradas tanto em água doce como em águas marinhas, devido a sua ampla distribuição e variedade é o grupo que desperta maior interesse biotecnológico (EHRlich *et al.*, 2010; HOOPER; VAN SOEST, 2002).

A família *Aplysinidae* é formada por esponjas que apresentam esqueleto formado apenas por fibras esponjosas pontilhadas e dispostas em malha geométrica tridimensional. Atualmente são descritas 15 espécies que estão amplamente distribuídas na costa brasileira, podendo ser mais frequentemente encontrada no Atlântico Tropical Sudoeste (ICMBIO, 2021; PINHEIRO; HAJDU; CUSTÓDIO, 2007). A espécie *Aplysina lactuca* foi descrita por Pinheiro, Hajdu e Custódio em 2007, estando inserida na Classe *Demospongeae*, Sub Classe *Verongimorpha*, Ordem *Verongiida*, Família *Aplysinidae*, Gênero *Aplysina* (SISBR, 2021).

As esponjas pertencentes ao gênero *Aplysina* produzem muitos metabólitos para se defender de seus predadores no ambiente natural. Muitos compostos já foram identificados nesse gênero, dentre eles, os compostos bromados, que são muito utilizados para a identificação dessas esponjas. Esses compostos estão presentes em elevadas concentrações, e chega a representar cerca de 13% de seu peso seco, que além de mostrar papel na defesa desses organismos, do ponto de vista ecológico, o principal papel na função biológica desse composto seria na ação antidepredatória. Por outra parte, apresentam elevado potencial biotecnológico, pois já demonstraram ação anticâncer, antimalárico, antifúngicos, antibacteriano, neuroprotetores e anti-histamínico (KAJAZANJIAN; FARIÑAS, 2006; LACERDA, 2021).

Alguns estudos relatam que compostos de defesa obtidos de extratos da esponja *A. fulva* possuem efeito antimicrobiano (KELLY *et al.*, 2005). Além disso, três extratos obtidos de *A. caissara* mostraram efeito antituberculose (AZEVEDO *et al.*, 2008).

Um composto nitrogenado que foi isolado da esponja *A. fulva* mostrou efeito ansiolítico, nesse estudo foi realizado *docking* molecular com a finalidade de compreender melhor a interação com o receptor da molécula em estudo (CESÁRIO *et al.*, 2021).

1.2 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos de maneira que não alteram a estrutura desses carboidratos, ou seja, não possuem ação enzimática e também não fazem parte de nenhuma classe de imunoglobulinas (KILPATRICK, 2000).

Essas proteínas, inicialmente, foram identificadas em extratos de plantas e foram denominadas hemaglutininas ou fitohemaglutininas, devido a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos (SHARON; LIS, 1972).

Boyd e Shapleigh (1954) propuseram o termo “lectina” (do latim *legere* = selecionar) devido a capacidade desse grupo de proteínas em apresentar seletividade ao interagir com carboidratos.

A primeira lectina isolada foi relatada por James B. Summer em 1919, denominada Concanavalina A (ConA), obtida de sementes de *Canavalia ensiformis*. Em 1936 foi sugerido que a ConA era capaz de aglutinar eritrócitos devido a sua especificidade por carboidratos presentes nas superfícies das células sanguíneas (SHARON; LIS, 2004). Em 1972, a estrutura primária e a estrutura tridimensional da ConA foram elucidadas (VASTA; AHMED, 2008) e até a atualidade é umas das lectinas mais estudadas.

Os momentos importantes para o interesse no desenvolvimento de diversas pesquisas sobre lectinas ocorreram nos anos de 1960, quando Nowel evidenciou que uma fitohemaglutinina obtida do feijão vermelho, *Phaseolus vulgare*, possuía a capacidade de estimular mitose em linfócitos (VASTA; AHMED, 2008). Até então, acreditava-se que as células de defesa não realizavam divisão celular; também nessa década, observou-se a primeira demonstração do papel biológico dos açúcares da superfície celular *in vitro*, quando foi comprovado que a ConA ativava a mitose em linfócitos pela sua ligação a carboidratos presente na superfície celular (SHARON; LIS, 2004). Esses relatos mostraram que os papéis das lectinas eram mais extensos do que simplesmente a hemaglutinação de células (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Após essas descrições, as lectinas foram cada vez mais estudadas e mais tarde algumas lectinas de plantas exibiram relação com a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, como a WGA (Wheat Germ Agglutinin) que inibiu o desenvolvimento inicial das cepas de *Fusarium graminearum* e *F. oxysporum* (CIOPRAGA *et al.*, 1999). NbLRK1 de *Nicotiana benthamiana* demonstrou defesa contra oomicetos que causam lesões marrons em

culturas de importância econômica, como batata, tomate e cacau (KANZAKI *et al.*, 2008). Ambas as lectinas mostraram papel de defesa contra patógenos.

Apesar de inicialmente terem sido mais estudadas em vegetais, atualmente já se sabe que essas proteínas estão presentes nos mais diversos táxons, sendo detectadas em microrganismos, plantas, fungos e animais, e estão envolvidas em diferentes processos celulares, devido a sua especificidade de ligação aos carboidratos através do seu Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (DRC). Essa característica, além da capacidade de ativar o sistema complemento e opsonização de possíveis patógenos, faz das lectinas candidatas promissoras para a produção de novos fármacos (ELUMALAI *et al.*, 2019; OGAWA *et al.*, 2011).

1.2.1 Lectinas de esponjas marinhas

As esponjas marinhas são um reservatório de moléculas bioativas, dentre elas, as lectinas. As primeiras lectinas de esponja foram relatadas por Dodd e seus colaboradores em 1968, que observaram atividade hemaglutinante em extratos das esponjas *Cliona celata* e *Axinella sp* (DODD; MACLENNAN; HAWKINS, 1968).

A partir de então, várias pesquisas foram realizadas e mostraram que as lectinas isoladas de poríferos apresentaram diversas atividades biológicas: a lectina de *Cinachyrella apion* apresentou atividade antitumoral em células do câncer cervical (RABELO *et al.*, 2012); H-3 de *Haliclona caerulea* demonstrou efeito antitumoral, ocasionando autofagia e apoptose em células de MCF7 relativas ao câncer de mama (NASCIMENTO - NETO *et al.*, 2018); a lectina de *Aplysina fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019) exibiu atividade antibiofilme *in vitro*; e a lectina de *Stylissa flexibilis* (HUNG *et al.*, 2018) mostrou atividade antibacteriana frente a *Vibrio parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*.

Até o presente momento aproximadamente 45 lectinas de esponjas foram purificadas, mas apenas algumas estão classificadas em famílias de acordo com suas características estruturais e especificidade de ligação (Tabela 1).

Tabela 1 – Famílias de lectinas de esponjas.

Esponja	Lectina	Família	Afinidade de ligação
<i>Aphrocallistes vastus</i>	APHRLEC	Tipo C	Galactosídeos
<i>Lubormiskia baicalensis</i>	Lb MBL	Tipo C	Manose
<i>Chondrilla caribensis</i>	CCL	Galectina	Galactosídeos

<i>Cinachyrella allocada</i>	CaL	Galectina	Galactosídeos
<i>Cinachyrella sp.</i>	CchGs	Galectina	Galactosídeos
<i>Geodia cydonium</i>	GCG	Galectina	Galactosídeos
<i>Halichondria Okadai</i>	HoL - 30	Galectina	Galactosídeos
<i>Suberites dumuncula</i>	Sd galectin 1	Galectina	Galactosídeos
<i>Suberites dumuncula</i>	Sd galectin 2	Galectina	Galactosídeos
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	Ef lectin	Tachylectinas	Lipopolissacarídeos
<i>Suberites dumuncula</i>	Sd lectin	Tachylectinas	Lipopolissacarídeos

Fonte: A autora. Adaptado de Carneiro, 2017.

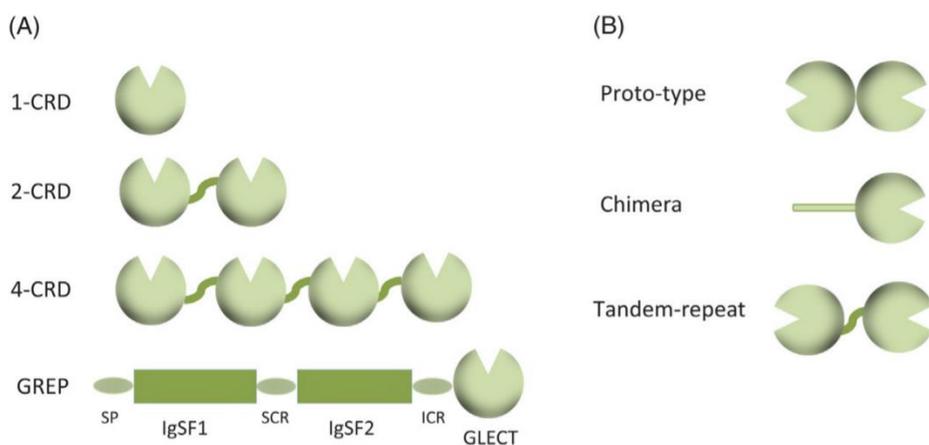
Lectinas do Tipo C representam uma superfamília de proteínas, inicialmente classificadas nesse grupo por serem dependente de Ca^{2+} . Atualmente as proteínas inseridas nesse grupo são caracterizadas por possuir um domínio CTLD (*C-type lectin like domain*) contendo entre 115 e 130 aminoácidos, o qual possui uma arquitetura modular, formado por uma alça dupla e com um motivo de sequência conservado. O motivo de sequência é formado por quatro cisteínas responsáveis pela formação das duas pontes dissulfeto que estabilizam as alças. Lectinas presente nesse grupo estão associadas a endocitose, interação célula-célula e adesão celular (BROWN; WILLMENT; WHITEHEAD, 2018; VASTA; AHMED, 2008;).

As lectinas do Tipo S ou galectinas são proteínas solúveis, embora algumas exceções possuam domínio transmembrana, ligantes de resíduos de β -galactosídeos, algumas mostram preferência por *N*-acetil-lactosamina (LacNac; Gal β -1,4GlcNac) e dissacarídeos relacionados. Elas são sintetizadas no citoplasma, encontradas tanto no ambiente intra como no extracelular, secretadas de forma não convencional, pois não possuem peptídeo sinal (VASTA, 2016), e que apresentam um DRC altamente conservado, que contem cerca de 135 aminoácidos que é necessário para a sua função biológica (MARSZEWKA-CHERUIYOT *et al.*, 2021; SHARON; LIS, 2003).

Em vertebrados foram descritas 16 galectinas que são distribuídas em três subfamílias de acordo com sua arquitetura estrutural: proto, quimera e tandem. As proto galectinas são dímeros não covalentes, onde cada cadeia possui um DRC (galectinas humanas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15, -16); as quimeras exibem um DRC e outro domínio tipo colágeno, rico em lisina e prolina (galectina humana -3); e as tandem apresentam dois DRCs em uma mesma cadeia polipeptídica, um no N- terminal e outro no C- terminal ,com base na estrutura dos seus sítios de ligação, é provável que sejam diferentes em a sua fina especificidade e reconhecer ligantes distintos (galectinas humanas -4, -6, -8, -9 , -12) (FIGURA 1.B) (BERTUZZI *et al.*, 2020; VASTA, 2016; WANG *et al.*, 2020).

Em invertebrados foram descritas galectinas que possuem um DRC, e as tipo tandem (como em vertebrados) contendo dois ou quatro DRCs; e uma única tipo quimera, denominada GREP, identificada no molusco *Biomphalaria glabrata*, em que o domínio do tipo galectina é localizado no C-terminal (GLECT) e unido por meio de uma região intermediária curta (IRC) ao domínio de duas superfamílias de imunoglobulinas (IgSF1 e IgSF2) separados por uma pequena região de conexão (SCR) e com o peptídeo sinal (SD) (FIGURA 1.A) (VASTA, 2016).

Figura 1 – Organização do DRC de galectinas de invertebrados e vertebrados.



Fonte: VASTA, 2016. A) Ilustração esquemática do DRC de galectinas de invertebrados nos tipos (1 – DRC, 2 – DRC e 4 – DRC), e GREP – a única quimera de invertebrados. B) Os DRC dos 3 tipos de galectinas identificadas em vertebrados.

As galectinas são intensamente estudadas e acredita-se que desempenhem papéis importantes nas interações célula–célula, adesão célula–matriz e sinalização celular (CUMMINGS, 2019; KILPATRICK *et al.*, 2002). No espaço extracelular, essas lectinas além de se ligarem a glicanos da superfície também podem reconhecer potenciais agentes patogênicos e parasitas (VASTA, 2016). Estas proteínas parecem ter grande importância biológica por possuir elevada conservação ao longo de sua evolução e ampla distribuição, devido sua ocorrência em organismos dos mais diversos filós, além de estarem presentes em diferentes locais celulares dos espécimes (RUBINSTEIN *et al.*, 2004; NONAKA *et al.*, 2021).

Dentre as galectinas presente nos poríferos, as de *Geodia cydonium* estão entre as mais estudadas. Estas lectinas na presença do íon cálcio sofrem oligomerização formando

grandes complexos proteicos, cuja função parece estar relacionada a coesão entre as células do animal (GARDÈRES *et al.*, 2015; WAGNER - HÜLSMANN *et al.*, 2006).

As Tachylectinas têm como principal característica possuírem sequência de aminoácidos com seis domínios repetidos. Essas lectinas mostraram ligação a lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas paredes celulares de bactérias Gram-negativas, o que indica sua possível função de defesa (ANGTHONG *et al.*, 2017).

As lectinas de esponja, denominadas “órfãs”, não estão inseridas em nenhuma dessas famílias, mas podem ser agrupadas de acordo com certas propriedades bioquímicas. Garderes e colaboradores sugerem a classificação das lectinas órfãs em; lectinas com ponte dissulfeto intracadeias, ligantes de mucina e ligantes a *N*-acetil-D-glucosamina/ *N*-acetilgalactosamina (GÁRDERES *et al.*, 2015).

O conhecimento da sequência de aminoácidos de uma proteína é de grande importância para avaliar sua função, família que pertence, possível estrutura tridimensional, localização, potencial biotecnológico, além de ajudar nos estudos taxonômicos e de evolução das espécies, através da identificação de semelhanças entre as sequências de outras lectinas que possuam dados estabelecidos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; SHARON; LIS, 2004).

Os métodos mais utilizados para obter as estruturas primárias das lectinas de esponjas marinhas são: degradação de Edman, espectrometria de massas e clonagem de DNA. De todas as lectinas de esponja que possuem sua sequência de aminoácidos determinada, apenas *Haliclona caerulea* e *Chondrila caribensis* tiveram sua sequência totalmente determinada por espectrometria de massas (CARNEIRO *et al.*, 2013; PFEIFER *et al.*, 1993; SOUSA, 2021; XIONG *et al.*, 2006).

Dentre as lectinas de esponja já isoladas e caracterizadas, apenas algumas possuem estrutura primária completamente determinada (Tabela 2).

Tabela 2 – Lectinas de esponja com estrutura primária determinada

Esponja	Lectina	Família	Afinidade de ligação
<i>Aphrocallistes vastus</i>	APHRLECC	Tipo C	Galactosídeos
<i>Cinachyrella sp.</i>	CchG	Galectina	Galactosídeos
<i>Geodia cydonium</i>	GCG	Galectina	Galactosídeos
<i>Suberites dumuncula</i>	GALEC1_SBDO GALEC2_SBDO	Galectina	Galactosídeos
<i>Halichondria okadai</i>	HoL – 30	Galectina	Galactosídeos

<i>Chondrilla caribenses</i>	CCL	Galectina	Galactosídeos
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	Ef lectin	Tachylectina	Lipopolissacarídeos
<i>Suberites dumuncula</i>	LEC_SUBDO	Tachylectina	Lipopolissacarídeos
<i>Axinella pollypoides</i>	AX - I AX - 2	n.d.	Galactosídeos
<i>Haliclona caerulea</i>	H-3	n.d.	N - Acetil- galactosamina

Fonte: A autora. Adaptado de CARNEIRO, 2017; GÁDERES *et al.*, 2015; SOUSA, 2021. Não determinado: n.d.

1.2.2 Lectinas de *Aplysina*

Até o presente momento, foram relatadas cinco lectinas isoladas do gênero *Aplysina*, das espécies *A. arqueri*, *A. lacunosa*, *A. lactuca*, *A. fulva* e *A. cauliformis* (CARNEIRO *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2019; VIANA, 2021; MIARONS; FRESNO, 2000).

As primeiras foram AaL de *A. arqueri* e AIL de *A. lacunosa*, ambas isoladas a partir de cromatografia de afinidade seguida de filtração em gel. AaL e AIL mostraram afinidade por resíduos de galactosídeos não redutores, sua a massa molecular foi de aproximadamente 16 kDa (na presença e ausência de agentes redutores) com massa molecular nativa de 63 kDa, o que relaciona a sua forma homotetramérica com seu estado nativo (MIARONS; FRESNO, 2000).

A lectina de *A. fulva* (AFL) foi isolada a partir de cromatografia de afinidade em coluna Sepharose. AFL é uma proteína dimérica com afinidade por mucina e demonstrou atividade antibiofilme sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2019).

A *Aplysina cauliformis lectin* (ACL) obtida da espécie *A. cauliformis* foi purificada a partir da combinação de cromatografias de afinidade, troca iônica e exclusão molecular. A lectina mostrou capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho e humanos do tipo O, tratados com enzima e não tratados, e afinidade, principalmente, por mucina estomacal suína. Em SDS PAGE, ACL apresentou massa molecular de 65 kDa em condições não redutoras e aproximadamente 35 kDa em condições redutoras. Como atividade biotecnológica essa proteína foi capaz de aglutinar bactéria *Escherichia coli* (VIANA, 2021).

1.2.2.1 Lectina de *Aplysina lactuca*

A lectina de *Aplysina lactuca* (ALL) foi purificada e isolada da esponja marinha *A. lactuca* (CARNEIRO *et al.*, 2017). ALL mostrou atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho e humanos (A, B e O), tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. Essa atividade foi inibida por α -lactose, lactulose e principalmente pela glicoproteína mucina estomacal suína. A lectina mostrou massa molecular média de $31.810 \pm 2\text{Da}$, determinada por ESI – MS (Espectrometria de Massas de Ionização por Electrospray).

A partir de dados também obtidos por ESI- MS observou-se que essa lectina possui 3 cisteínas envolvidas em ao menos uma ligação intracadeia e uma intercadeia. Além disso, duas isoformas foram confirmadas nas preparações de ALL: ALL-a (15.737 Da) e ALL-b (15.990 Da).

ALL causou redução significativa de biofilmes bacterianos e reduziu o número de células viáveis das bactérias avaliadas (*Staphylococcus aureus* e *E. coli*) em todas as concentrações testadas (CARNEIRO *et al.*, 2017). Oito peptídeos gerados a partir da digestão com tripsina foram obtidos por Carneiro e colaboradores (2017), porém a estrutura primária de ALL não foi ainda completamente determinada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar estruturalmente a lectina ALL presente na esponja marinha *Aplysina lactuca*, avaliar seu efeito antibacteriano em combinação com antibióticos e antibiofilmes.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar a lectina ALL de *Aplysina lactuca*.
- Avaliar a afinidade de ALL por glicoproteínas.
- Estimar a massa molecular nativa de ALL.
- Determinar a estrutura primária da lectina através da sobreposição de peptídeos obtidos por degradação de Edman e espectrometria de massas (MS/ MS).
- Construir modelo da estrutura tridimensional e prever o sítio de ligação da proteína por meio de modelagem estrutural.
- Avaliar o efeito antibacteriano da lectina em combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina.
- Avaliar a atividade de ALL sobre a formação de biofilmes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta da esponja marinha

Espécimes da esponja marinha *Aplysina lactuca* foram coletadas através de mergulho autônomo no Parque Estadual da Pedra da Risca do Meio, área litorânea de Fortaleza, Ceará. A coleta e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados e regulados pelos órgãos competentes (SISBIO ID: 33913-8 e SISGEN ID:AC14AF9).

3.2 Purificação da lectina

A lectina presente na esponja marinha *Aplysina lactuca* foi obtida seguindo o protocolo previamente estabelecido por Carneiro e colaboradores (2017) com algumas modificações.

As esponjas foram pesadas, cortadas em pedaços pequenos, maceradas, homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM e L- cisteína 5 mM (TBS/Cys) na proporção de 1:2 (p/v). O extrato homogeneizado passou por filtração em tecido de nylon para retenção de partículas grandes, e posteriormente foi centrifugado a 9000 xg, por 25 minutos, a 4°C.

O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 70% de saturação para precipitação das proteínas, após 4 horas a 4°C a amostra foi centrifugada a 9000 xg, por 20 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em um pequeno volume de TBS/Cys e submetido a cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose™ 6B, previamente equilibrada com o tampão de extração. A fração não retida foi retirada com TBS/Cys. A lectina foi recuperada por meio da eluição com glicina 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM e L- cisteína. As frações eluídas foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas, e posteriormente submetidas a cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em uma coluna Sephacryl S200 (2 x 60cm) acoplada a um sistema HPLC (*High Performace Liquid Chromatography*) ÄKTA pure (GE Healthcare), a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A coluna foi equilibrada e eluída com TBS/Cys. As frações contendo a lectina foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para uso posterior.

Em cada passo de purificação, uma fração de 1 mL foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2.1 Derivatização da lectina de *Aplysina lactuca* ALL

Para evitar alteração na conformação da proteína causada por um ambiente redutor artificial, no caso, a adição de DTT ou L-cisteína, os resíduos de cisteína de ALL foram alquilados com Iodoacetamida (IAA). A adição de IAA forma um tioéter estável que é resistente a modificações. A proteína alquilada permanece estável por períodos prolongados e mantém suas propriedades funcionais (STOWELL *et al.*, 2015).

Para isso, após a eluição da proteína foi adicionado 20 mM de iodoacetamida a uma solução de ALL, sendo em seguida submetida a diálise contra NaCl 150 mM. Após diálise a lectina foi recolhida e armazenada para uso posterior em uma solução de 0,5 mg.mL⁻¹, a concentração foi obtida através do coeficiente de extinção molar da proteína.

A solução foi submetida a teste de hemaglutinação com sangue O para avaliar se a IAA alterava a função da lectina. A adição de IAA não modificou a atividade hemaglutinante.

3.3 Atividade hemaglutinante e estudos de inibição

Os eritrócitos humanos do tipo O foram obtidos junto ao hemocentro do Ceará (HEMOCE). A lavagem dos eritrócitos ocorreu 6 vezes em diluição de NaCl 150 mM na proporção de 1/10, posteriormente uma suspensão a 3% de eritrócitos foi preparada em NaCl 150 mM (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados segundo o método estabelecido por Sampaio e colaboradores (1998). Nessa metodologia, 50 µL de TBS foram adicionados em poços de placas de microtitulação de fundo V, seguidos de 50 µL da amostra a ser analisada. Após a adição da amostra, foi realizado a diluição seriada em cada fileira de poços e, por fim, foram adicionados 50 µL da suspensão de eritrócitos a 3%. Após 1 h a temperatura ambiente, a visualização da atividade hemaglutinante foi feita a olho nu e expressa em títulos de aglutinação (U.H.mL⁻¹), que representa a unidade inversa da maior diluição de amostra capaz de aglutinar eritrócitos.

O ensaio de inibição seguiu o método também estabelecido por Sampaio e colaboradores (1998), utilizando uma concentração de lectina capaz de causar 4 U.H.mL⁻¹.

As concentrações iniciais das glicoproteínas, fetuína, mucina estomacal suína tipo III (PSM, *Porcine stomach mucin* – III), mucina submaxilar bovina tipo I (MSB -I) e asialofetuína foram de 1 mg.mL⁻¹. Na placa de microtitulação com fundo em V, inicialmente foram adicionados 50 µL de TBS em todos os poços, seguido da adição de 50 µL da solução de glicoproteína na primeira fileira e diluídos serialmente. 50 µL da solução lectina com 4 U.H.mL⁻¹ foram então adicionados e a placa incubada por 1h. Finalmente, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados. Após 1 h, a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e determinada concentração inibitória mínima (CIM).

3.4 Eletroforese e estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foi conduzida de acordo com Laemmli (1970), com objetivo de estimar a massa molecular aparente, assim como avaliar a homogeneidade da lectina purificada.

Para estimativa da massa molecular nativa da lectina, a proteína foi solubilizada em TBS + CYS e TBS sem a presença da cisteína, ambas as amostras foram centrifugadas e aplicadas em uma coluna BEH SEC Column 200 Å, 1,7 µm (4,6 mm x 300 mm) acoplada a sistema HClass-Bio Waters Corp. Após o equilíbrio da coluna com TBS, a amostra foi aplicada e monitorada nas absorvâncias 280 nm e 216 nm. O tempo de eluição de cada amostra foi utilizado para estimar a massa molecular mediante comparações com o tempo de eluição de proteínas de massa molecular conhecida (tiroglobulina bovina, 669 kDa; apoferritina, 443 kDa; β-amilase, 220 kDa; álcool desidrogenase, 150 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; lisozima, 14 kDa).

3.5 Determinação da estrutura primária

3.5.1 Determinação da sequência de aminoácidos do N-terminal

A determinação da sequência do N-terminal da proteína foi obtida através da degradação de Edman, que foi realizada conforme descrito por Carneiro *et al.* (2015) utilizando um sequenciador automático de proteínas e peptídeos modelo PPSQ – 31-a (Shimadzu).

Os PTH – aminoácidos da sequência N-terminal foram separados em uma coluna Wakosil ODS de (2,0 x 250 mm), Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japão) conectada

a uma bomba modelo LC-20 AT. A absorvância foi detectada a 269 nm com detector UV-vis SPD-20A.

3.5.2 Determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)

3.5.2.1 Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em gel

A lectina purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), corado com Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970). As bandas foram excisadas e posteriormente reduzidas e alquiladas com ditioneitol (DTT) e iodacetamida (IAA), respectivamente, como descrito por Shevchenko *et al.* (2007).

A digestão da proteína ocorreu com a adição de quimotripsina (Roche) e tripsina (Promega), os peptídeos foram extraídos conforme protocolo de Shevchenko *et al.*, (2007). As digestões foram realizadas em bicarbonato de amônio na proporção 1:50 p/p (enzima/substrato). Todas as digestões foram realizadas a 37°C por 16 horas.

A digestão foi interrompida com a adição de 2 µL de ácido fórmico 2%, e os peptídeos foram extraídos do gel de acordo com Shevchenko *et al.* (2007).

3.5.2.2 Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em solução

A digestão da lectina, com as enzimas proteolíticas Lys-C, Glu-C e Asp-N, foi realizada em uma solução de bicarbonato de amônio (BA) 50 mM, contendo DTT 10 mM e IAA 50 mM, na presença do surfactante RapiGest (Waters Corp), conforme instruções do fabricante. As enzimas foram usadas na proporção de 1:200 p/p e as digestões foram mantidas por 4 h a 37°C e interrompidas com 10 µL de ácido trifluoroacético a 5%.

3.5.2.3 Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão

Os peptídeos oriundos da digestão em gel e em solução foram injetados em uma coluna de fase reversa C18 (75 µm x 100 mm) em um sistema nanoAcquity (Waters Corporation, MA, EUA) e eluídos por gradiente linear de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico. Os eluatos foram infundidos diretamente em uma fonte de nanoeletrospray (ESI-LC/MS).

O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de m/z 50 a 3000, sob voltagem do capilar de 3,5 kV e temperatura da fonte de 363 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga (z) entre 2⁺ e 4⁺, onde foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação.

3.5.2.4 Análise dos dados

Os espectros coletados foram processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corporation). Os espectros de fragmentação foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters). Os aminoácidos Leu/Ile foram determinados pela especificidade da enzima quimotripsina (Roche), a qual cliva no C-terminal de Leu, mas não de Ile.

As sequências de aminoácidos determinadas para as isoformas ALL-a e ALL-b foram depositadas junto ao banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), sob os códigos C0HM19 e C0HM20.

3.5.2.5 Análise da sequência de aminoácidos

A similaridade de sequência de aminoácidos de ALL com proteínas conhecidas foi avaliada no banco de dados de proteínas *online*, através da ferramenta BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A ferramenta *on line* SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi usado para determinar a arquitetura de domínio da lectina. O alinhamento das sequências foi realizado com o ESPript (<https://esprpt.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

A ferramenta *on line* ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi usada para estimativa do coeficiente de extinção molar e pI da proteína.

3.6. Modelagem molecular e predição do local de ligação ao carboidrato

A estrutura tridimensional de ALL foi prevista pelo servidor *on line* I-TASSER como descrito por ZHENG e seus colaboradores (2019). O servidor COACH foi utilizado para identificar o local mais provável do sítio de ligação ao carboidrato (YANG; ROY; ZHANG, 2013).

3.7. Atividade antibacteriana

3.7.1 Microrganismos

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Triptona de soja (TSA; HIMEDIA, Índia) e incubadas a 37°C por 24 h. Após o crescimento no meio sólido, algumas colônias isoladas foram removidas, inoculadas em Caldo triptona de Soja (TSB) e incubadas durante 24h a 37°C. As células foram colhidas por centrifugação durante 10 minutos, 9000 xg, a 4°C. As células foram suspensas em TSB e a densidade celular de cada suspensão bacteriana foi ajustada para a concentração final de 2×10^6 (UFC.mL⁻¹), por densidade óptica de 620nm.

3.7.2 Atividade de ALL e CAM-ALL sobre o crescimento planctônico dos microrganismos

O efeito da lectina ALL sobre o crescimento planctônico foi realizado segundo teste de microtitulação em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U”. O experimento foi realizado com a ALL e ALL alquilada com IAA (carboxiamidometil-ALL, CAM-ALL) em NaCl 150mM nas concentrações de 250 a 3,9 µg.mL⁻¹. Cada poço da microplaca foi preenchido com 100 µL de meio de cultura contendo as diferentes concentrações da lectina. Em seguida, foram adicionados 100 µL de células (2×10^6 células/mL) obtendo um volume final de 200 µL em cada poço. As placas foram então encubadas a 37°C, durante 24 horas a 120 rpm e posteriormente a densidade óptica de cada poço foi registrada a 640 nm utilizando um leitor de ELISA automático (Synergy TM HT Multi- detection Microtiter Reader) para avaliar o crescimento microbiano.

3.7.3 Atividade da lectina combinada a antibióticos

A avaliação do efeito de ALL e CAM-ALL combinadas aos antibióticos foi realizada através do método *checkerboard*, descrito nos trabalhos realizados por Lechartier, Hartkoom e Cole (2012) com adaptações. O termo *checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Este método consiste em colunas contendo concentrações diferentes da droga “A” diluídas ao longo do eixo x, e linhas contendo as concentrações da droga “B” ao longo do eixo y (LORIAN, 2005).

Para este estudo, foram avaliadas as combinações de ALL e CAM-ALL com os antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra), contra todas as bactérias descritas no item 3.7.1. Para cada combinação testada foram usados 25 poços da microplaca de 96 poços de fundo em "U", das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, das linhas A a E nas concentrações da CIM, 1/2 x CIM, 1/4 x CIM, 1/8 x CIM e 1/16 x CIM, e a lectina na concentração constante de 125 µg.mL⁻¹ nas colunas 1 a 5. Tanto os antibióticos quanto a lectina foram diluídos separadamente em placas de microtitulação, e logo em seguida foram misturados em nova placa, que foi preenchido com 50 µL do antibiótico, 50 µL da lectina e 100 µL do inóculo bacteriano previamente ajustado. A linha F foi usada como controle da CIM do antibiótico, e a linha G como controle do crescimento bacteriano.

Logo após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas e para a determinação da nova CIM em combinação, a D.O foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (Spectramax).

Para bactérias que apresentaram valores iguais a 1/2 x CIM, consideramos efeito aditivo; valores entre 1/4 e 1/16, efeito sinérgico.

3.7.4 Ação das lectinas sobre a formação dos biofilmes

Para avaliar a ação da lectina sob a formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia baseada no teste em placas de microtitulação desenvolvido por Stepanovic e colaboradores (2000), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 2014). As amostras testadas foram ALL e ALL alquilada com IAA, denominada carboxiamidometil-ALL (CAM-ALL).

Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h em para o desenvolvimento dos biofilmes. Após o crescimento do biofilme, na presença e ausência de lectinas, o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL/poço de água estéril com o objetivo de remover células fracamente aderidas. O procedimento foi realizado em duas placas de microtitulação distintas, uma para a avaliação da biomassa total, e a outra para a análise do número de células viável presentes nos biofilmes.

3.7.5 Quantificação da Biomassa

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

3.7.6 Enumeração de células viáveis

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

3.7.7 Análise estatística

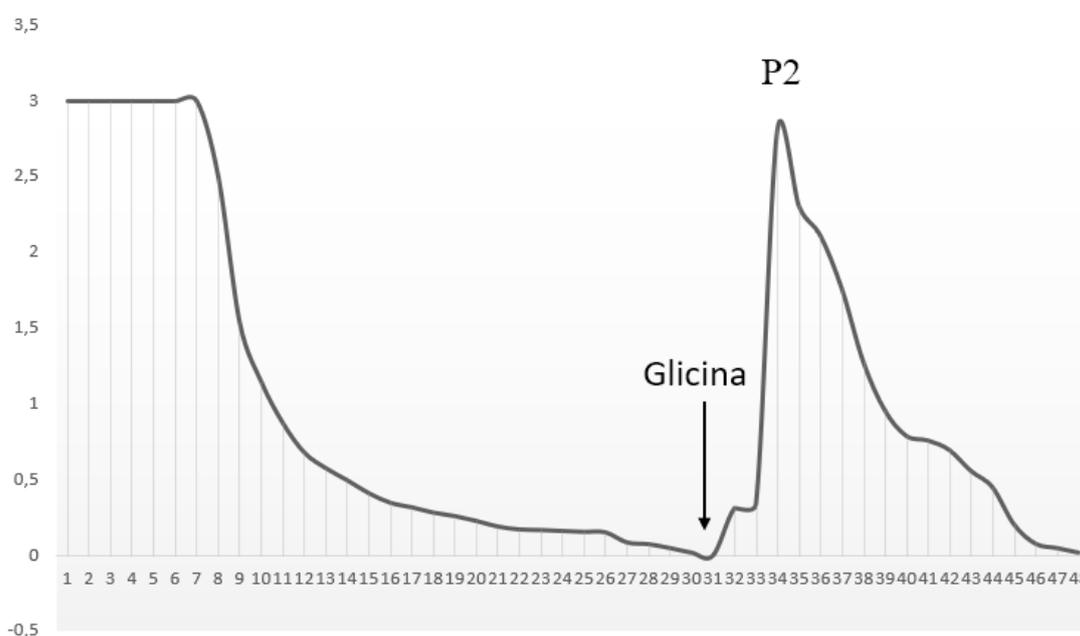
As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste Bonferroni post-hoc.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação da lectina

ALL foi eficientemente purificada da esponja marinha *Aplysina lactuca* seguindo o protocolo estabelecido por Carneiro *et al.* (2017), com modificações. O pico contendo atividade hemaglutinante foi eluído com glicina 50 mM, pH 2,6 contendo NaCl 150mM e L-cisteína (Figura 2).

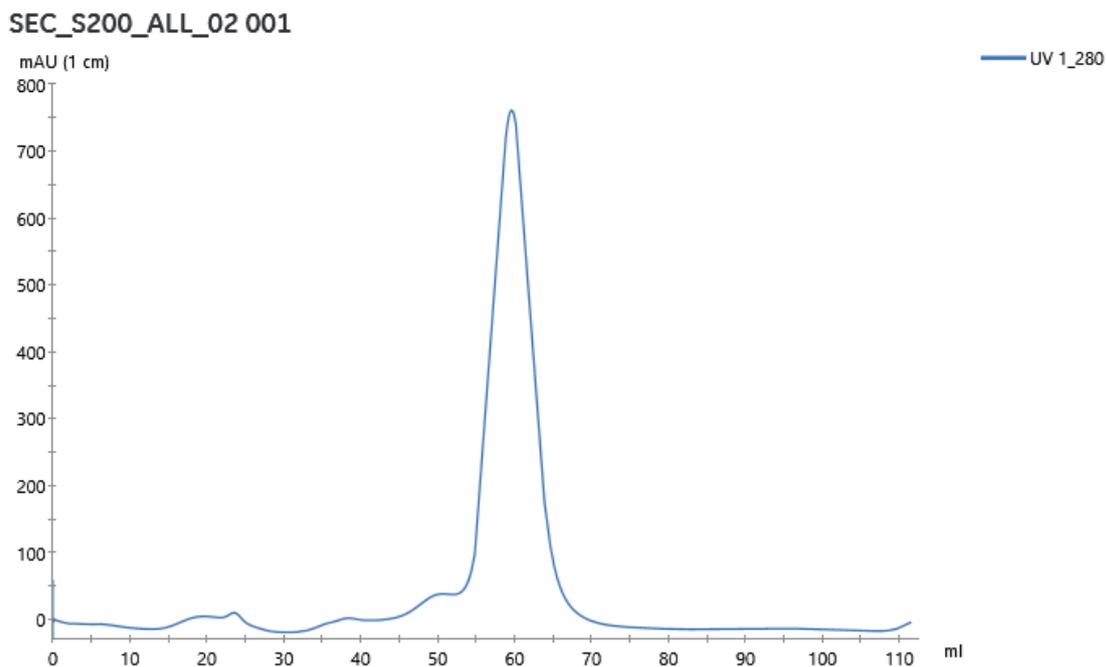
Figura 2 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose – 6B.



Fonte: A autora. Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-6B equilibrada com Tris 50 mM NaCl 150 mM e L- cisteína 5 mM, pH 7.6. A coluna foi eluída com glicina 50 mM, pH 2.6, contendo NaCl 150 mM e L- cisteína 5 mM. P2) Frações contendo a lectina. Foram coletadas frações contendo 2 mL correspondentes aos tubos 31 ao 45. O fluxo foi mantido a 2mL.min⁻¹.

Após a cromatografia de afinidade a fração retida foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular. Nesta fase de purificação foi observado apenas um pico sendo então as frações contendo atividade hemaglutinante eluídas entre 55 e 70 mL (Figura 3).

Figura 3 – Cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: A autora. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S 300 HR acoplada a um sistema AKTA Pure (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão TBS, pH 7,6, com adição de L-cisteína 5 mM. O fluxo foi mantido em 1 mL.min⁻¹.

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford e os ensaios de atividade hemaglutinante revelaram uma concentração no extrato bruto de 1,12 mg.mL⁻¹ e título de 512 U.H.. Já para a fração coletada da cromatografia de afinidade, a concentração de proteínas foi de 0,33 mg.mL⁻¹ com título de 1024 U.H. Valores de concentração de proteínas e título hemaglutinante estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 – Sumário da purificação de ALL.

Fração	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U.H.mL ⁻¹)	Rendimento (%)	Atividade específica (U.H.mg ⁻¹)	Purificação (vezes)	*CMA (µg)
Extrato bruto	232,2	106.240	100	457	1	2,2
ALL	7,4	23040	21,7	3113	6,8	0,32

Fonte: A Autora. CMA-Capacidade Mínima de Aglutinação (quantidade mínima de proteína capaz de aglutinar eritrócitos).

4.2 Atividade hemaglutinante e estudos de inibição

A atividade hemaglutinante da proteína foi realizada utilizando sangue humano tipo O, em condições redutoras e não redutoras. Os resultados para as diferentes amostras foram: 4096 U.H.mL⁻¹ quando em ambiente redutor e 256 U.H.mL⁻¹ quando em ambiente não redutor (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade hemaglutinante.

Amostra	U. H. mL⁻¹	U.H.mg
ALL + CYS	4096	2730
ALL + DTT	4096	2730
ALL Oxi	256	170

Fonte: A autora. Concentração da proteína de 1,5 mg.mL⁻¹

ALL foi inibida pelas glicoproteínas PSM-III, BSM, fetuína e asialo fetuína com uma mínima concentração inibitória (CIM) de 250 µg.mL⁻¹, 3,9 µg.mL⁻¹, 7,81 µg.mL⁻¹ e 3,90 µg.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante de ALL por glicoproteínas

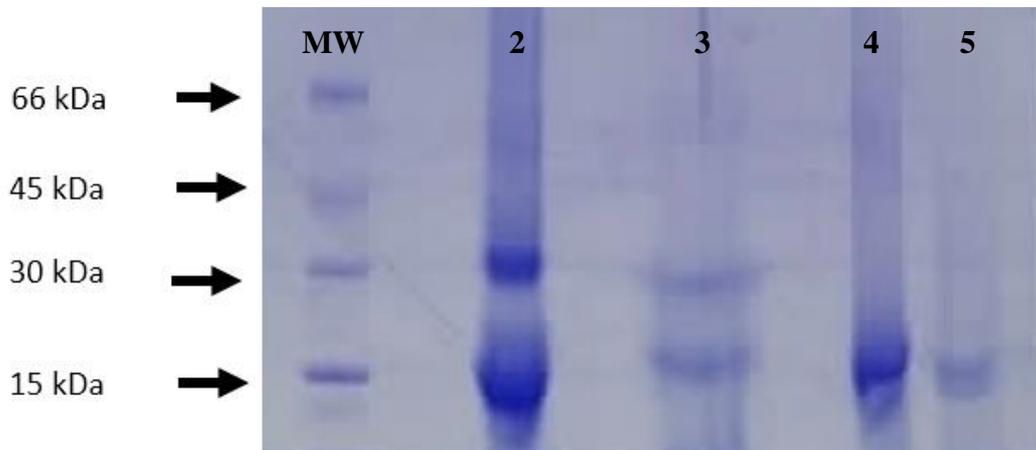
Glicoproteínas	CIM*
Fetuína	3,90 µg.mL ⁻¹
Mucina estomacal suína tipo III	250 µg.mL ⁻¹
Mucina submaxilar bovina tipo I	3,90 µg.mL ⁻¹
Asialofetuína	7,81 µg.mL ⁻¹

Fonte: A autora. * Concentração inibitória mínima

4.3 Eletroforese e estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular

A massa molecular estimada de ALL por SDS-PAGE, na ausência de agente redutor, foi de aproximadamente 30 kDa, e também uma de 15 kDa. Quando adicionados agentes redutores aos tampões de extração e eluição, a lectina apresentou massa molecular estimada de 15 kDa (Figura 4).

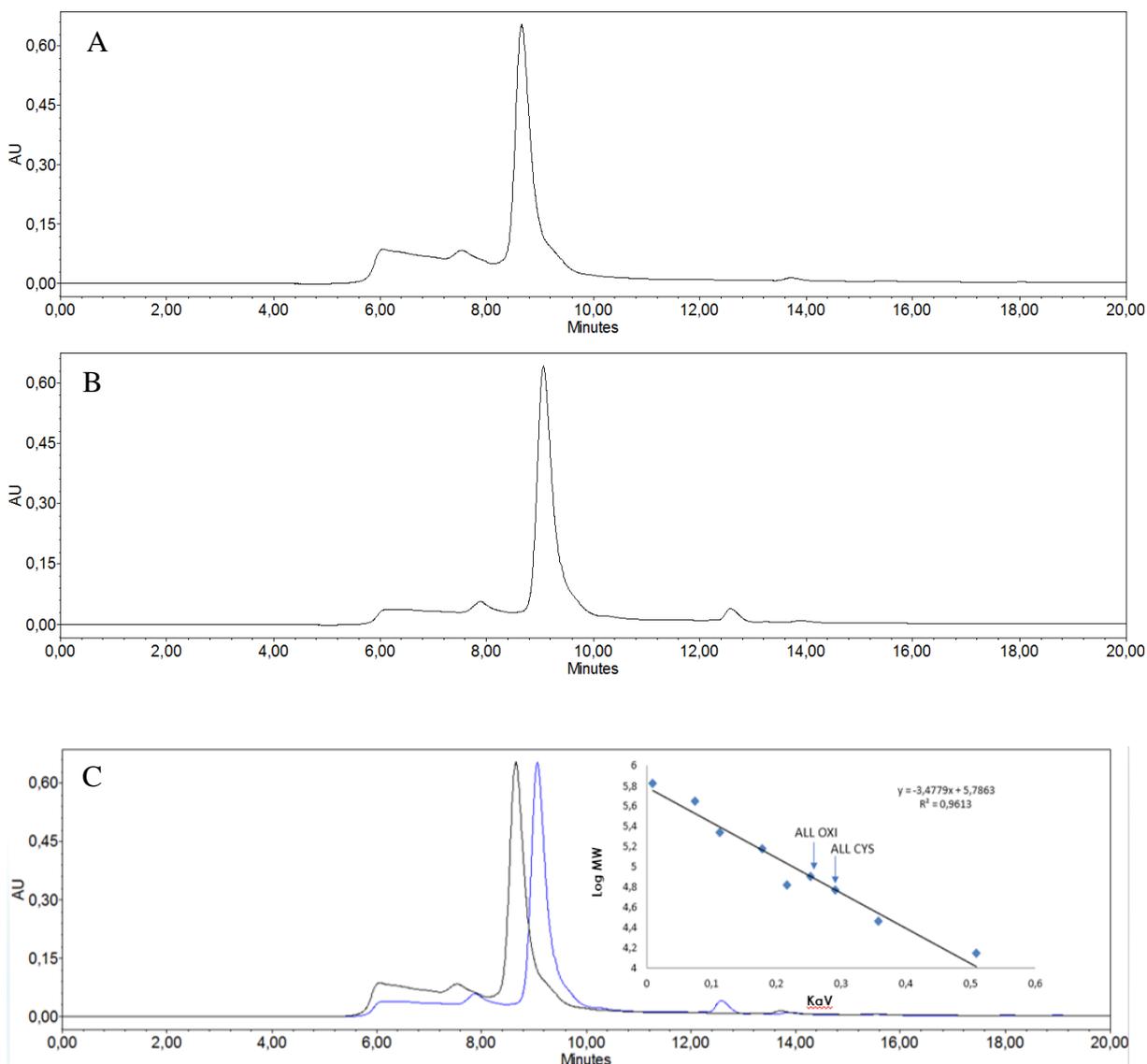
Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de ALL



Fonte: A autora. **MW**: Marcador molecular. **2 e 3**: ALL sem agente redutor (80 e 40 μ g, respectivamente). **4 e 5**: ALL na presença de agente redutor (80 e 40 μ g, respectivamente).

Em cromatografia de exclusão molecular os perfis de eluição, das amostras oxidadas (sem agentes redutores na preparação) e reduzidas, apresentaram perfis diferentes (Figura 5).

Figura 5 – Cromatografia de exclusão molecular de ALL.



Fonte: A autora. Cromatografia de exclusão molecular de ALL. Foram aplicadas 50 μL de ALL 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em coluna BEH SEC Guard Column 200 \AA , 2,5 μm , 4,6 mm x 30 mm acoplada a sistema Acquity UPLC Waters Corp. A) Exclusão molecular de ALL oxidada; B) Exclusão molecular de ALL + cisteína; C) Exclusão molecular de ALL oxidada e ALL + cisteína. Calibração da coluna: tiroglobulina bovina, 669 kDa; apoferritina, 443 kDa; β -amilase, 220 kDa; álcool desidrogenase, 150 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; lisozima, 14 kDa.

ALL oxidada apresentou, após um tempo de retenção de 8,69 minutos, um pico simétrico com massa calculada em aproximadamente 80 kDa. ALL em condições redutoras, apresentou após um tempo de retenção de 9,09 minutos, um pico simétrico com massa calculada em aproximadamente 60 kDa.

4.4 Determinação da Sequência de Aminoácidos

4.4.1 Sequência de aminoácidos do N- terminal

A sequência do N-terminal de ALL foi obtida através da degradação de Edman. Os 15 primeiros aminoácidos da proteína foram ¹DHIDLEFDVGQCIQA¹⁵. A sequência de aminoácidos do N-terminal foi confirmada por peptídeos obtidos por meio de espectrometria de massas (MS/MS) oriundos da digestão com Glu-C e Asp-N.

4.4.2 Sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)

Após realizada a digestão da proteína com as enzimas, tripsina, quimotripsina, Glu-C, Asp-N e Lys-C, foram gerados vários peptídeos, dos quais 22 foram utilizados para a determinação da sequência primária de aminoácidos de ALL-a e 26 para a determinação da estrutura primária de ALL-b.

A diferença entre alguns aminoácidos contribuiu para a determinação da estrutura primária de duas isoformas de ALL. (Tabela 7).

Tabela 6 – Sequência de peptídeos utilizados para obtenção da estrutura primária de ALL – a.

	<i>m/z</i>	Sequência	M. obs.	M.cal.	Δ (Da)
G	362.13	DHIDLE	740.18	740.33	0.15
G	647.27	IATYAYRTPVNTVSRVE	1938.78	1939.01	0.23
G	797.99	FGNSGNDVLRKLCVVYPAPS	2390.87	2391.18	0.31
T	725.33	TSVNLVSDGTVVLHVDYRK	2171.99	2172.15	0.16
T	754.62	HSGGQPSTGKPWQNLLLLNSK	2260.84	2261.19	0.35
T	745.04	TPVNTVSRVEFGNSGNDVLR	2231.10	2231.12	0.02
T	631.27	LCVVYPAPSK	1260.47	1260.63	0.10
T	486.72	DIATYAYR	971.43	971.47	0.04
K	547.91	LGGSWGTEEKVHDVK	1640.67	1640.81	0.14
K	704.32	QDADFSLELNQK	1406.6244	1406.66	0.04
D	898.24	DVGQCIEASYTAPTAGR	1794.43	1794.82	0.39
D	420.4	DGTVVLHV	838.25	838.45	0.20
D	548.17	DFSLELNQK	1092.26	1092.54	0.28
D	436.2	DYTGCKQ	870.58	870.35	0.23
D	734.64	DLATYAYRTPVNTVSRVQF	2199.94	2200.12	0.19
D	909.91	DAVLRKLCVVYPAPSK	1814.78	1814.95	0.17
Q	508.22	RKHSGGQPSTGKPW	1521.62	1521.78	0.16
Q	537.78	LLNSKLGGSW	1073.54	1073.58	0.04
Q	1057.67	GTEEKVHDVETTIVYNDY	2112.37	2110.96	1.4
Q	697.78	SIELNQKDIAT	1393.53	1393.70	0.17
Q	744.68	EDLATYTY	974.42	974.42	0.00
Q	511.27	CVVYPAPSK	1019.48	1019.51	0.03

Fonte: A autora. Peptídeos obtidos das enzimas: (G) Glu – C; (T) Trypsina; (D) Asp – N ; (Q) Quimotripsina.
m/z: massa/ carga. M. obs: massa observada. M. cal.: massa calculada. Δ : M. cal – M. obs.

Tabela 7 – Sequência de peptídeos utilizados para obtenção da estrutura primária de ALL – b.

	<i>m/z</i>	Sequência	M. obs.	M.cal.	Δ (Da)
G	362.63	DHIDLE	740.18	740.33	0.15
G	844.67	LNQKDIATYAYRTPVNTVSRVQFDDQGYD	3376.41	3376.63	0.22
T	725.33	TSVNLVASDGTVVLHVDYRK	2171.99	2172.15	0.16
T	783.84	HWGGNPSTGKPWQNILIINSK	2347.06	2346.22	0.83
T	631.27	KLCVVYPAPSK	1260.47	1260.63	0.10
T	486.72	DIATYAYR	971.43	971.47	0.04
T	624.79	SPVNTVSRVQFDDQGYDAVLKR	2494.10	2494.24	0.14
T	567.24	LCVVYPAPSK	1132.46	1132.59	0.13
T	704.32	QDADFSLELNQK	1406.62	1406.66	0.04
T	690.82	YTAPTTGRTSVNL	1379.65	1379.70	0.05
K	562.79	LVASDGTLVLH	1123.55	1123.62	0.07
K	425.89	AYRTPVNLVSR	1274.65	1274.71	0.06
K	634.27	YTAPTTGRTSVN	1266.54	1266.62	0.08
K	547.91	LGGSWGTEEKVHDVK	1640.67	1640.77	0.11
D	913.21	DVGQCIEASYTAPTGR	1824.40	1824.83	0.42
D	963.27	QASYTAPTTGRTSVNIVAS	1923.54	1922.97	0.56
D	420.4	DGTVVLHV	838.26	838.45	0.19
D	839.26	YRKHVGGNPSTGKPWQNILIINSKLGGSWG	3351.41	3350.74	0.67
D	548.17	DSFLELNQK	1092.26	1092.54	0.28
D	436.2	DYTGCKQG	870.58	870.35	0.23
D	909.91	DAVLRKLCVVYPAPSK	1814.78	1814.95	0.17
Q	537.78	LLNSKLGGSW	1073.54	1073.58	0.14
Q	1030.54	TAPTTGRTSVNLVASDGTVVL	2058.05	2058.09	0.04
Q	697.78	TVELNQKDLATY	1393.53	1393.70	0.17
Q	867.71	AYRSPVNTVSRVQFDDQGYDAVL	2599.17	2599.26	0.09
Q	511.27	CVVYPAPSK	1019.48	1019.51	0.03

Fonte: A autora. Peptídeos obtidos das enzimas: (G) Glu – C; (T) Trypsina; (D) Asp – N; (Q) Quimotripsina;
(K) Lys-C. m/z: massa/ carga. M. obs: massa observada. M. cal.: massa calculada. Δ : M. cal – M. obs.

Ambas as sequências de aminoácidos, ALL-a e ALL-b, contêm 144 aminoácidos (Figura 6), cujas somas das massas dos aminoácidos resultam em massas moleculares médias de 15736 ± 2 Da e 15985 ± 2 Da, respectivamente.

Figura 6 – Sequências de aminoácidos das isoformas de ALL- a e ALL- b.

ALL - a

DHIDLEFDVG QCIQASYTAP TAGRTSVNIV ASDGTVVLHV DYRKHSGGKP STGKPWQNIL IINSLGGSW
 |G^{362.13}| |-----D^{898.24}-----| |-----T^{725.33}-----| |-----T^{754.62}-----| |-----
 |-----D^{420.4}-----| |-----Q^{508.22}-----| |-----Q^{537.38}-----|

GTEEKVHDVE TTIVYNDYTG CKQDADFSLE LNQKDIATYA YRTPVNTVSR VEFNGSGNDA VLRKLCVVYP APSK
 |-----Q^{1057.67}-----| |-----D^{548.17}-----| |-----T^{486.72}-----| |-----T^{745.04}-----| |-----T^{631.27}-----|
 -K^{547.91}-----| |-----D^{436.2}-----| |-----Q^{697.78}-----| |-----Q^{744.68}-----| |-----Q^{511.27}-----|
 |-----K^{704.32}-----| |-----D^{734.64}-----| |-----D^{909.91}-----|
 |-----G^{647.27}-----| |-----G^{797.99}-----|

ALL - b

DHIDLEFDVG QCIQASYTAP TTGRTSVNIV ASDGTVVLHV DYRKHWGGNP STGKPWQNIL IINSLGGSW
 |G^{362.13}| |-----D^{913.21}-----| |-----T^{725.33}-----| |-----K^{783.84}-----| |-----
-----Q^{1030.54}-----		-----Q^{537.38}-----		
-----D^{963.27}-----		-----D^{420.4}-----		-----D^{839.26}-----
-----K^{634.27}-----		-----K^{562.79}-----		

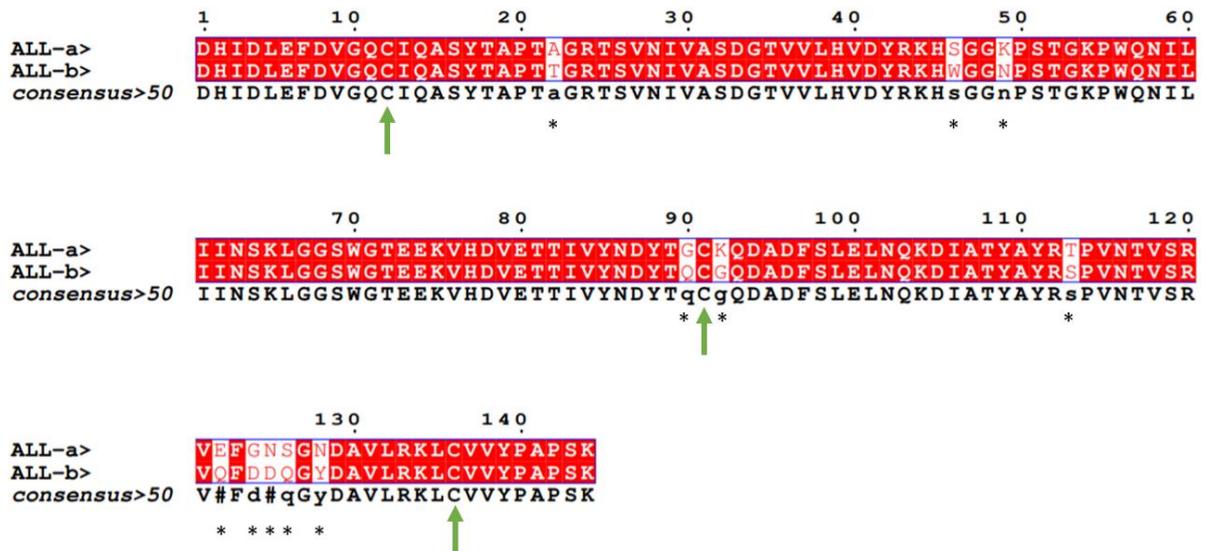
GTEEKVHDVE TTIVYNDYTQ CGQDADFSLE LNQKDIATYA YRSPVNTVSR VQFDDQGYDA VLRKLCVVYP APSK
 |-----Q^{1057.67}-----| |-----D^{548.17}-----| |-----T^{486.72}-----| |-----T^{624.79}-----| |-----T^{567.24}-----|
 -----| |-----D^{436.2}-----| |-----Q^{697.78}-----| |-----Q^{867.71}-----| |-----Q^{511.27}-----|
 -T^{547.91}-----| |-----K^{704.32}-----| |-----K^{425.89}-----| |-----D^{909.91}-----|
 |-----G^{844.67}-----|

Fonte: A autora. As duas estruturas primárias das isoformas ALL- a e ALL - b foram obtidas através da combinação dos dados por degradação de Edman e digestão enzimática com Glu -C (G), Asp – N (D), tripsina (T), Lys-C (K) e quimotripsina (Q). Os aminoácidos sublinhados foram obtidos por degradação de Edman. Os aminoácidos em vermelho representam pontos de microheterogeneidades A/T e K/H em ALL-a; S/T e K/H em ALL-b.

Neste trabalho, foram localizadas 3 cisteínas nas posições 12, 91 e 136, em ambas as cadeias (Figura 7).

Quando comparadas, ALL-a e ALL-b, é possível observar 11 pontos de variação nas seguintes posições: A/T²², S/W⁴⁶, K/N⁴⁹, T/S¹¹³, E/Q¹²², ¹²⁴GNS/DDQ¹²⁶, N/Y¹²⁸. Estas variações são responsáveis pela diferença entre as massas moleculares de ALL-a e ALL-b. Os aminoácidos A²², S⁴⁶, K⁴⁹, T¹¹³, E¹²², ¹²⁴GNS¹²⁶, N¹²⁸, estão presentes na isoforma de massa 15.737 ± 2 Da, denominada ALL-a; enquanto T²², W⁴⁶, N⁴⁹, S¹¹³, Q¹²², ¹²⁴DDQ¹²⁶, Y¹²⁸ estão presentes na isoforma de massa 15.988 ± 2 Da, denominada ALL – b (Figura 7).

Figura 7 – Alinhamento entre as isoformas ALL - a e ALL - b



Fonte: A autora. ALL – a e ALL – b (Isoformas de *Aplysina lactuca* lectin) *microheterogeneidades observadas entre as isoformas a e b da lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca*. Setas verdes representam as cisteínas.

Outras isoformas oriundas de ALL-a e ALL-b foram identificadas nos espectros obtidos por MS/MS. As microheterogeneidades foram observadas nos aminoácidos K/ H¹⁴⁴, presente nas duas sequências, e em ALL-a A/T¹¹⁰ e ALL-b T/S¹¹³ (Tabela 8).

Tabela 8 – Microheterogeneidades observadas nas isoformas de ALL

	<i>m/z</i>	Sequência	M. obs.	M.cal.	Δ (Da)
Q	867.71	AYRSPVNTVSRVQFDDQGYDAVL	2599.17	2599.26	0.09
K	425.89	AYRTPVNLVSR	1274.65	1274.719	0.06
T	486.72	DIATYAYR	971.43	971.47	0.04
Q	557.26	TYRTPVNTVSRVEF	1667.73	1667.86	0.13
T	631.27	KLCVVYPAPSK	1260.47	1260.63	0.10
T	635.87	KLCVVYPAPSH	1269.50	1269.65	0.15

Fonte: A autora. Peptídeos obtidos das enzimas: (G) Glu – C; (T) Trypsina; (D) Asp – N; (Q) Quimotripsina; (K) Lys-C. *m/z*: massa/ carga. M. obs: massa observada. M. cal.: massa calculada. Δ: M. cal – M. obs.

O ponto isoelétrico de ALL-a e ALL-b é de 5.75 e 5.01, respectivamente, indicando que ambas são proteínas ácidas associado ao elevado número de aminoácidos ácidos, principalmente ácido aspártico (D).

4.5 Domínio Conservado

A sequência de aminoácidos das isoformas de ALL foram submetidas ao programa *Smart*, um recurso *online* utilizado para a anotação de domínios de proteínas e análise de arquiteturas de domínio. A ferramenta indicou uma arquitetura de domínio do tipo galectina para ALL-a localizada entre as posições I³ e V¹³⁸ e também para ALL-b localizada entre as posições I³ e R¹³³, com e-value de 0,0031 e 0,0111, respectivamente.

O alinhamento de ALL-a e ALL-b com proteínas encontradas no programa *online BLAST* revelou os seguintes resultados: ALL-a apresentou 22% de identidade e 44% de similaridade com uma proteína não caracterizada da esponja marinha *Amphimedon queenslandica* (XP_011408566.2), 25% de identidade e 41% de similaridade com uma galectina – 4 da isoforma X2 de *Camponotus floridanus* (XP_011268276.1), uma espécie de formiga, e 25% de identidade e 51% de identidade com a galectina – 8 da isoforma X1 de *Camponotus floridanus* (XP_011268275.1) (Figura 8).

Figura 8 – Alinhamento de ALL - a com proteínas similares identificadas no programa *BLAST*.

```

1      10      20      30      40      50
ALL-a> DHIDL EFDVGCQCIQASYTAPTAGRTSVNIVASDGTVVLHVVDYRKHS G GKPSTGK P W . . QN
galectin-4 . . . . . YNVGKLIPLQFLK P TSAIILTYIPENASRFSVNLTCCKTS GNIALHFNP RLDRG
galectin-8 . . . . . NVGKLIPLQFLK P TSAIILTYIPENASRFSVNLTCCKTS GNIALHFNP RLDRG
PREDICTED: . . . . . QFSVGRAVEVRYIT P NNGRPTMDLYDAH . . . . . GNILLHVN P RWDTR
consensus>50 . . . . . efnVGkl!qlq%lkPtsaiiltnyipenasrfsvnltccktsGnialhfnPrldrg

60      70      80      90      100      110
ALL-a> ILIIN SKLGGSWGT EEKVHDEVTT . . IVNDYTG . . . CKQDA D F SLELN QKDIATYAY
galectin-4 YIVRNTRLRGSWENE EETCSPAGSSGCI FFRNSYMHLMIFCTNDA . FQIAINGEHFCSFY
galectin-8 YIVRNTRLRGSWENE EETCSPAGSSGCI FFRNSYMHLMIFCTNDA . FQIAINGEHFCSFY
PREDICTED: VLVLN TYYNKR WGH E ERPRGDFD FSSGVP I TVRVE . . . . . AHHS H F I I L V N G R I L H A Y R H
consensus>50 i i ! r N t r l r g s W e n E E t c s p a e s s g c i f v r n s y m h l m i f c t n d a . F q i a i n g e h f c s % y y

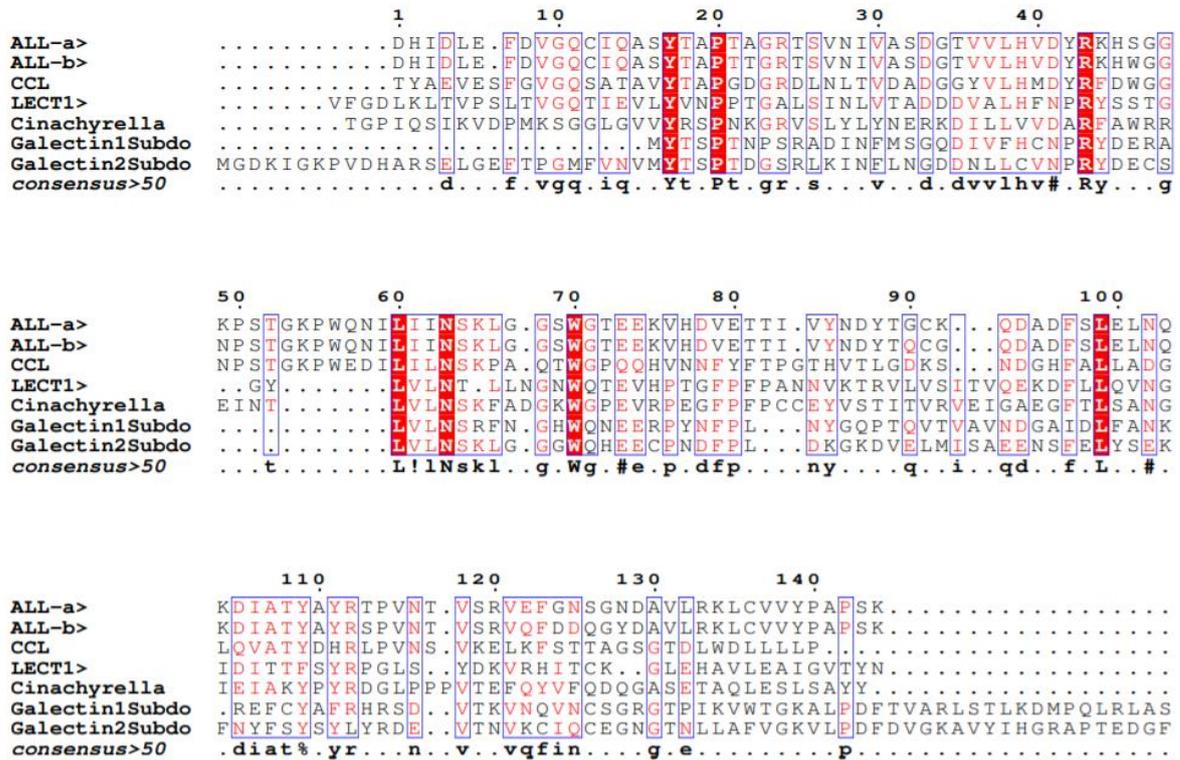
120      130      140
ALL-a> R T P V N T V S R V E F G N S G N D A V L R K L C V . V Y P A P S K
galectin-4 R L P L A D I T A L E V N G T I E D I R T R O L N L F V Y P D P N .
galectin-8 R L P L A D I T A L E V N G T I E D I R T R O L N L F V Y P D P N .
PREDICTED: R L N I N T L R N I V F W W A G S S A K P A K L I . . . . .
consensus>50 R l p v n d i t a v e v n g t i e d i r t r q l n l f v y p d p n .

```

Fonte: A autora. ALL - a (*Aplysina lactuca* lectin, isoforma a). Galectin-4 (Galectina da isoforma X2 de *Camponotus floridanus*). Galectin-8 (galectina da isoforma X1 de *Camponotus floridanus*). PREDICT. (Proteína não caracterizada de *Amphimedon queenslandica*).

ALL-b apresentou 23% de identidade e 45% de similaridade com uma proteína não caracterizada da esponja marinha *Amphimedon queenslandica* (XP_011408566.2) e 30% de identidade e 44% de similaridade com uma proteína hipotética de *Spodoptera frugiperda* (KAF9823320.1), uma espécie de lagarta que ataca cultivo de milho (Figura 9).

Figura 10 – Alinhamento de ALL - a e ALL - b com galectinas de esponjas marinhas.



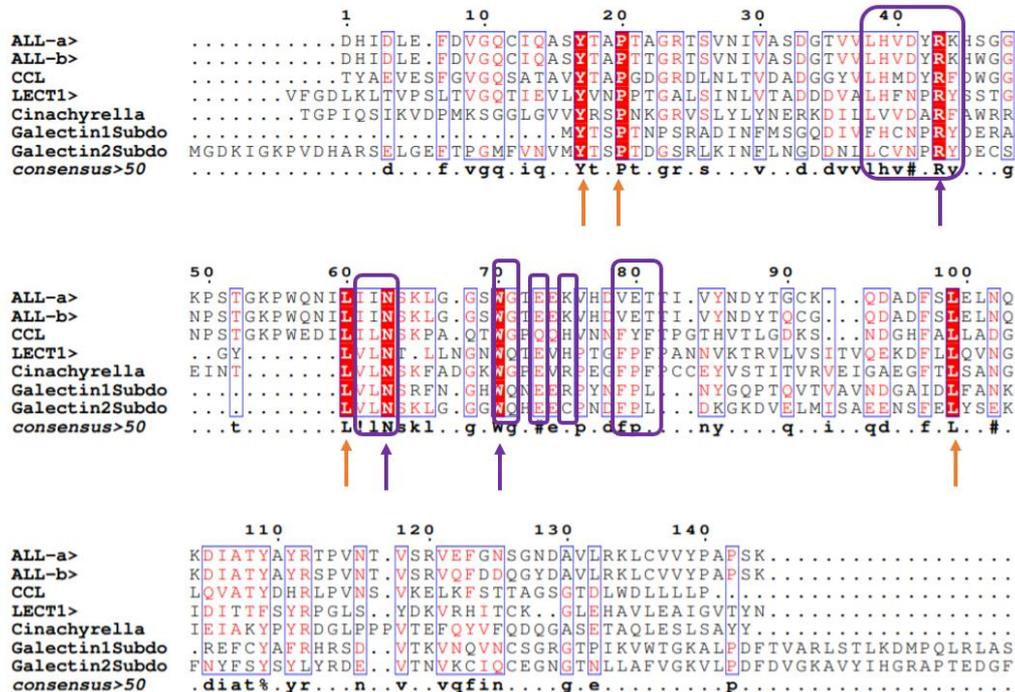
Fonte: Autora. ALL- a e ALL - b (*Aplysina lactuca* lectin, isoformas a e b, respectivamente). CCL (galectina de *Chondrilla caribensis*). LECT1 (Gene que codifica as 3 isolectinas de *Geodia cydonium*). Cinachyrella (Galectina de *Cinachyrella* sp.). Galectin1Subdo e Galectin2Subdo (Galectinas 1 e 2 de *Suberites domuncula*). Quadros vermelhos indicam os resíduos de aminoácidos que permaneceram idênticos nas diferentes sequências.

O domínio altamente conservado em galectinas foi identificado em ambas as isoformas de ALL: ³⁹LHFNPRF⁴⁵, ⁶²VLN⁶⁴, ⁷¹WG⁷², E⁷⁴R⁷⁶, ⁸⁰FPF⁸² e G⁸⁵ (HIRABAYASHI; KASAI, 1993; SOUSA *et al.*, 2021), com modificações.

Em ALL-a e ALL-b os resíduos do heptapeptídeo principal ³⁹LHFNPRF⁴⁵, foram alterados para ³⁸LHVDYRK⁴⁴. O Tripeptídeo ⁶²VLN⁶⁴ foi modificado para ⁶¹IIN⁶³. O dipeptídeo ⁷¹WG⁷² está localizado na posição ⁷⁰WG⁷¹, e o resíduo E⁷⁴ está localizado na posição E⁷³ em ALL-a e ALL-b. O R⁷⁶ foi alterado para K⁷⁵ em ambas as isoformas. O trípeptídeo ⁸⁰FPF⁸² foi substituído por ⁷⁹VET⁸¹ na sequência de ambas as isoformas (Figura 11).

Apesar de não estarem inseridos no domínio típico de galectina, os resíduos de aminoácidos Y¹⁷, P²⁰, L⁶⁰ e L⁹⁹ permaneceram idênticos em todas as galectinas de esponja (Figura 11).

Figura 11 – Alinhamento do DRC de ALL com outras galectinas de esponja



Fonte: Autora. ALL- a e ALL – b (*Aplysina lactuca* lectin, isoformas a e b, respectivamente). CCL (galectina de *Chondrilla caribensis*). LECT1 (Gene que codifica as 3 isolectinas de *Geodia cydonium*). Cinachyrella (Galectina de *Cinachyrella sp.*). Galectin1Subdo e Galectin2Subdo (Galectinas 1 e 2 de *Suberites domuncula*). Retângulo roxo identifica a posição do domínio de reconhecimento a carboidratos. Setas roxas: resíduos idênticos do DRC em todas as galectinas de esponja. Setas laranjas: resíduos de aminoácidos idênticos nas galectinas de esponja não envolvidos na ligação ao carboidrato.

ALL possui um único DRC, o alinhamento das sequências de aminoácidos das isolectinas (ALL-a e ALL-b) com as galectinas da subfamília prototipo: da esponja marinha *Chondrilla caribensis lectin* (SOUSA *et al.*, 2021) resultou na identidade de 38%, para ambas as lectinas e na similaridade de 72% e 73% para ALL-a e ALL-b, respectivamente, e com galectina 1 de *Homo sapiens* (NP_002296) 20% de identidade para ALL-a e ALL-b, e na similaridade de 64% para ambas as isoformas. Além disso, os resíduos de aminoácidos da estrutura primária típicos de galectinas se mantiveram conservados em todas as quatro sequências nas posições: L³⁸ H³⁹, R⁴³, N⁶³, ⁷⁰WG⁷¹ (Figura 12).

Figura 12 – Alinhamento de ALL -a e ALL -b com galectinas prototipo.

```

      1      10      20      30      40      50
ALL-a>  ... DHIDLE.FDVGQCIQASYTAPTAGRTSVNIVASDGT.VVLHVDYRKHSGGKPSTGK
ALL-b>  ... DHIDLE.FDVGQCIQASYTAPTGRTSVNIVASDGT.VVLHVDYRKHWGGNPSTGK
CCL     ... TYAEVES.FGVGQSATAVYTAPGDGRDLNLTVDADGG.YVLHMDYRFDWGGNPSTGK
Gallhomo> MACGLVASNLNLKPGECLRVRGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANT...
consensus>50 ... dhidle.fdvG#ciqasytaptdgrtsvlivasDgt.vvLHv#yRfdwgGnpsTgk
                                     **  *

      60      70      80      90      100      110
ALL-a>  PWQNILIIINSKLGGSWGTEEKVHDVETTI.VYNDYTGCKQDADFSLELNQKDIATYAYRT
ALL-b>  PWQNILIIINSKLGGSWGTEEKVHDVETTI.VYNDYTQCGQDADFSLELNQKDIATYAYRS
CCL     PWEDILIILNSKPAQTWGPQHVNNFYFTPGTHVTLGDKSNDGHFALLADGLQVATYDHRRL
Gallhomo> ... IVCNSKDGGAWGTEQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPDGYEFKFPNRL
consensus>50 pwqnil!iNSKlggsWGt##kvhdveftigvyndytqc.##adfslelnqkdiat%ayRl
                                     *  **

      120      130      140
ALL-a>  PVNTVSRVEFGNSGNDAVLRKLCVVPAPSK
ALL-b>  PVNTVSRVQFDDQGYDAVLRKLCVVPAPSK
CCL     PVNSVKELKFSTTAGSGTDLWDLLLLP...
Gallhomo> NLEAINYMAADGDFKIKCVAFD.....
consensus>50 pv#t!srvefdnqg.davlrklcvvypapsk

```

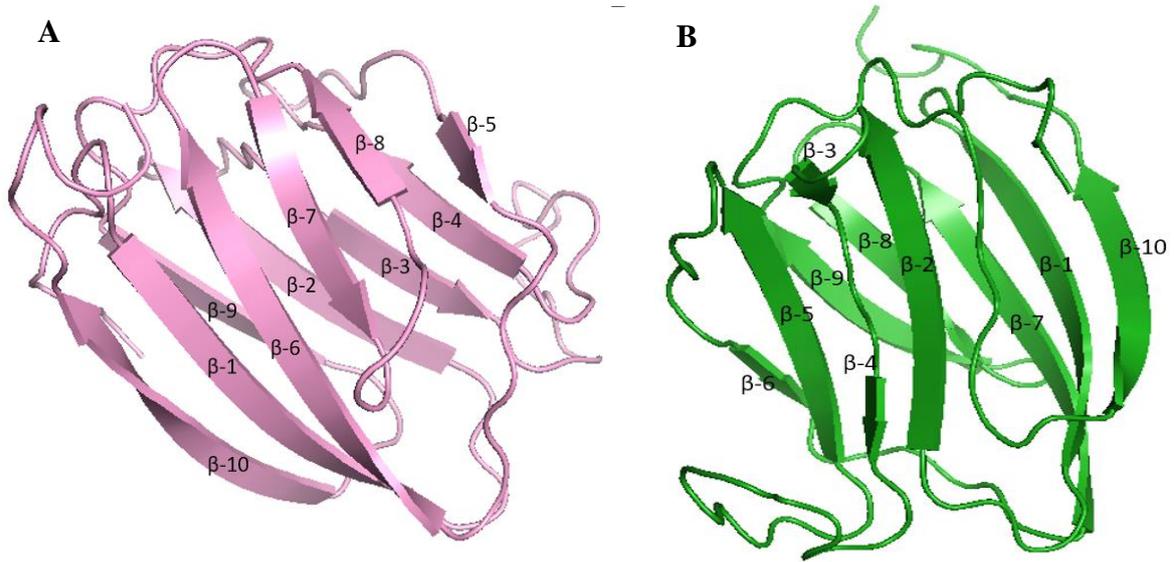
Fonte: Autora. ALL- a e ALL – b (*Aplysina lactuca* lectin, isoformas a e b, respectivamente). CCL (galectina de *Chondrilla caribensis*). Gal (Galectina – 1 humana de *homo sapiens*). * resíduos de aminoácidos conservados do DRC das galectinas.

4.6 Modelagem molecular e predição do local de ligação ao carboidrato

A estrutura tridimensional de ALL-a e ALL-b foi obtida utilizando o programa I-TASSER. O melhor modelo gerado para ALL-a apresentou os seguintes parâmetros: C- score de -0.19 , Tm-score de: 0.69 ± 0.12 e RMSD de $5.1 \pm 3.3 \text{ \AA}$, enquanto o modelo de ALL-b mostrou C-score de -0.48 , Tm- score de 0.65 ± 0.13 e RMSD de $5.7 \pm 3.6 \text{ \AA}$. O C-score possui valor entre $(-5 \text{ e } 2)$, onde quanto maior o valor maior será a qualidade do modelo. Dessa forma os modelos tiveram uma boa topologia global. Os valores de Tm-score e RMSD indicam que as estruturas tiveram um excelente alinhamento por homologia com os modelos utilizados.

Os modelos estruturais de ALL-a e ALL-b possuem arranjo do tipo β -sanduíche, formado por 2 folhas β antiparalelas (Figura 13a e 13b).

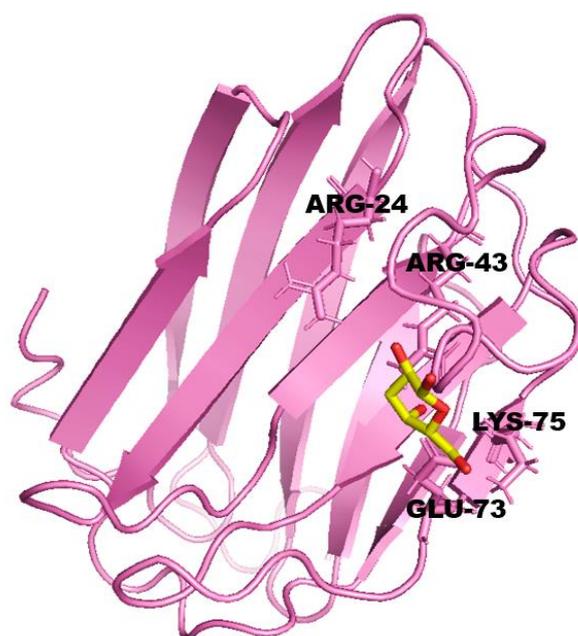
Figura 13 – Estrutura tridimensional prevista de ALL – a e ALL – b.



Fonte: A autora. **A)** Estrutura tridimensional de ALL-a. **B)** Estrutura tridimensional de ALL-b.

Através do programa COACH foi possível prever o sítio de ligação em ambas as isolectinas. Em ALL-a foi previsto a ligação com o monossacarídeo galactose, os resíduos envolvidos na ligação previsto pelo programa foram: R²⁴, R⁴³, E⁷³ e K⁷⁵ (Figura14). Ainda de acordo com o programa as estruturas das galectinas: -1 de *homo sapiens* e a Galectina – 9 do camundongo *Mus musculo* mostraram maior analogia com a estrutura prevista de ALL-a.

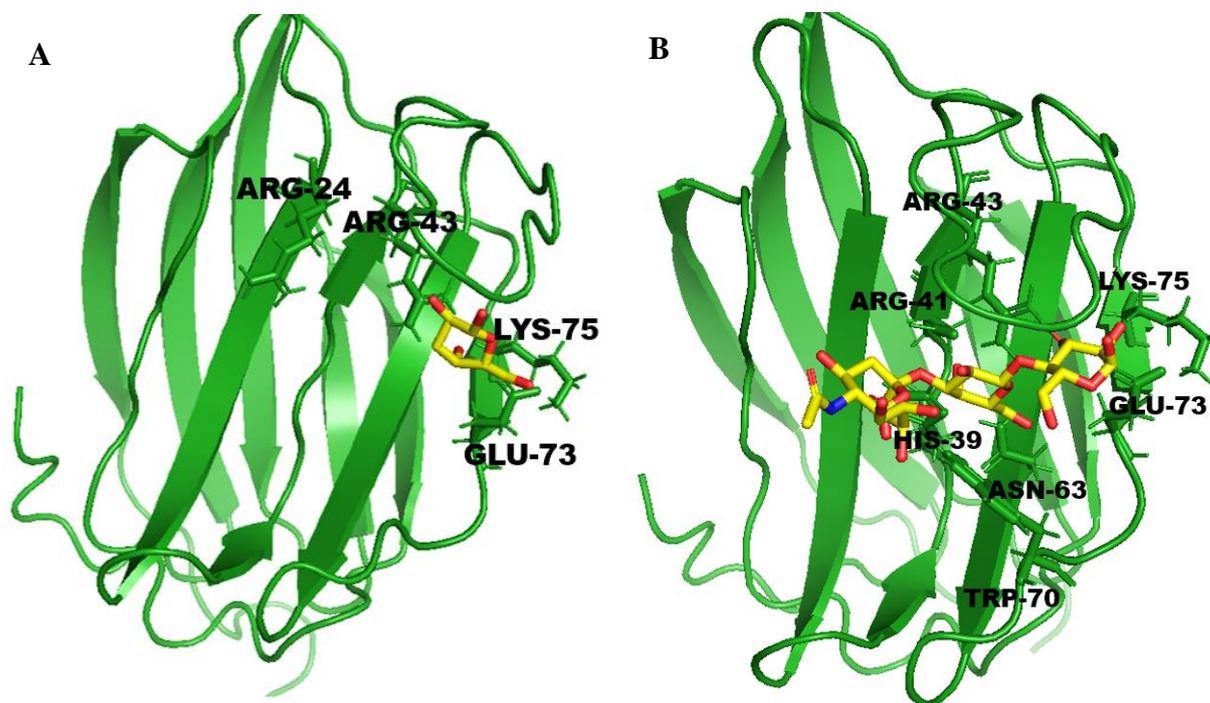
Figura 14 – Estrutura 3D prevista de ALL-a complexada com galactose.



Fonte: A autora. Em rosa: Estrutura tridimensional de ALL-a. Bastões amarelo e vermelho: galactose (Bastões vermelho: oxigênio; Bastões amarelo: carbono). Os resíduos do DRC que interagem com a galactose e são mostrados na representação em bastão rosa.

Em ALL-b foi prevista a ligação com galactose e o trissacarídeo contendo lactose e ácido siálico. Assim como ALL-a, os resíduos envolvidos na ligação com a galactose previsto pelo programa foram: R²⁴, R⁴³, E⁷³ e K⁷⁵ (Figura 15a). A previsão do sítio de ligação com o composto lactose-ácido siálico mostrou que os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação foram: R²⁴, H³⁹, D⁴¹, R⁴³, N⁶³, W⁷⁰, E⁷³ (Figura 15b). Ainda de acordo com o programa as estruturas das galectinas-8 de *Homo sapiens* e galectina-9 do camundongo *Mus musculus* mostraram maior analogia com as estruturas previstas de ALL-a e ALL-b, respectivamente.

Figura 15 – Estrutura 3D prevista de ALL-b complexada com galactose e lactose-ácido siálico.



Fonte: A autora. **A)** Em verde: Estrutura tridimensional de ALL-b. Bastões amarelo e vermelho: galactose (Bastões vermelhos: oxigênio; Bastões amarelos: Carbono). **B)** Em verde: Estrutura tridimensional de ALL-b. Bastões amarelo, vermelho e azul: lactose- ácido siálico (Bastões vermelhos: oxigênio; Bastões amarelos: Carbono; Bastões azuis: Nitrogênio). Os resíduos do DRC que interagem com a galactose e com o lactose-ácido são mostrados na representação em bastões verdes.

4.7 Atividade Antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana foi realizado contra as cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303, e avaliado a CIM, observou-se que ALL não apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas testadas.

4.8 Atividade da lectina combinada a antibióticos

Visto que ALL não inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações testadas, foi avaliado se a combinação lectina- antibiótico teria a capacidade de modificar o efeito ampicilina ou tetraciclina contra as cepas testadas.

A concentração de 125 µg/mL da lectina foi utilizada para realização do efeito da lectina em combinação com o antibiótico. Os resultados da associação dos antibióticos ampicilina e tetraciclina obtidos para ALL e CAM-ALL contra as cepas bacterianas testadas mostraram valores idênticos (Tabela 9).

No CIM individual da ampicilina foi verificada uma redução considerável quando combinada com a lectina contra a bactérias *S.aureus* ATCC 25923, que apresentou para esse antibiótico CIM individual de 0,097 µg.mL⁻¹, quando combinada com a lectina, esse valor foi reduzido para 0,012 (1/8 da CIM). Com relação a *S. aureus* ATCC 700698, uma cepa considerada mais resistente, o CIM individual do antibiótico de 50 µg.mL⁻¹. Quando combinado com ALL ou CAM- ALL foi reduzido para 12,5 µg.mL⁻¹ (1/8 da CIM). *S. epidermidis* ATCC 12228, apresentou para ampicilina CIM individual de 1,56 µg.mL⁻¹, e quando combinada com a lectina, esse valor foi reduzido para 0,195 µg.mL⁻¹ (1/8 da CIM). O efeito da combinação do antibiótico com a lectina foi mais intensificado quando submetido o tratamento com *S. epidermidis* ATCC 35984, que apresentou CIM individual de 1000 µg.mL⁻¹, e quando combinada com a lectina reduziu para 62,5 µg.mL⁻¹ (1/16 da CIM). Para a bactéria gram negativa *E. coli* o CIM individual do antibiótico foi de 0,390 µg.mL⁻¹, e em associação com a lectina, reduziu para 0,097 µg.mL⁻¹ (1/4 da CIM). O antibiótico associado à lectina resultou em sinergismo para todas as cepas testadas (Tabela 9).

Em associação com a tetraciclina foi observado apenas efeito aditivo em todas as cepas, reduzindo o CIM individual de 0,390 µg.mL⁻¹ para 0,195 µg.mL⁻¹ quando associado com a lectina para *S.aureus* ATCC 25923, enquanto para *S. aureus* ATCC 700698, o CIM individual, passou de 100 µg.mL⁻¹ para 50 µg.mL⁻¹. Esse efeito foi também observado para as cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228, onde o CIM individual do antibiótico de 0,390 µg.mL⁻¹ reduziu para 0,190 µg.mL⁻¹ e em *S. epidermidis* ATCC 35984, o CMI individual do fármaco passou de 0,190 µg.mL⁻¹ para 0,095 µg.mL⁻¹. Para *E. coli* ATCC 11303 o CIM individual da tetraciclina de 0,390 µg.mL⁻¹ foi reduziu para 0,195 µg.mL⁻¹ quando associado com a lectina. Dessa forma, a relação entre CMI individual do antibiótico associado com a lectina para todas as cepas resultou em apenas 1/2 da CIM (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito da lectina ALL combinada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina sobre *Staphylococcus* spp. e *E. coli*.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO			EFEITO	ANTIBIÓTICO			EFEITO
	Ampicilina				Tetraciclina			
	CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs		CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,097	0,012	1/8	Sinergismo	0,390	0,195	1/2	Aditivo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	50	12,5	1/4	Sinergismo	100	50	1/2	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,56	0,195	1/8	Sinergismo	0,390	0,195	1/2	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	1.000	62,5	1/16	Sinergismo	0,190	0,095	1/2	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	0,390	0,097	1/4	Sinergismo	0,390	0,195	1/2	Aditivo

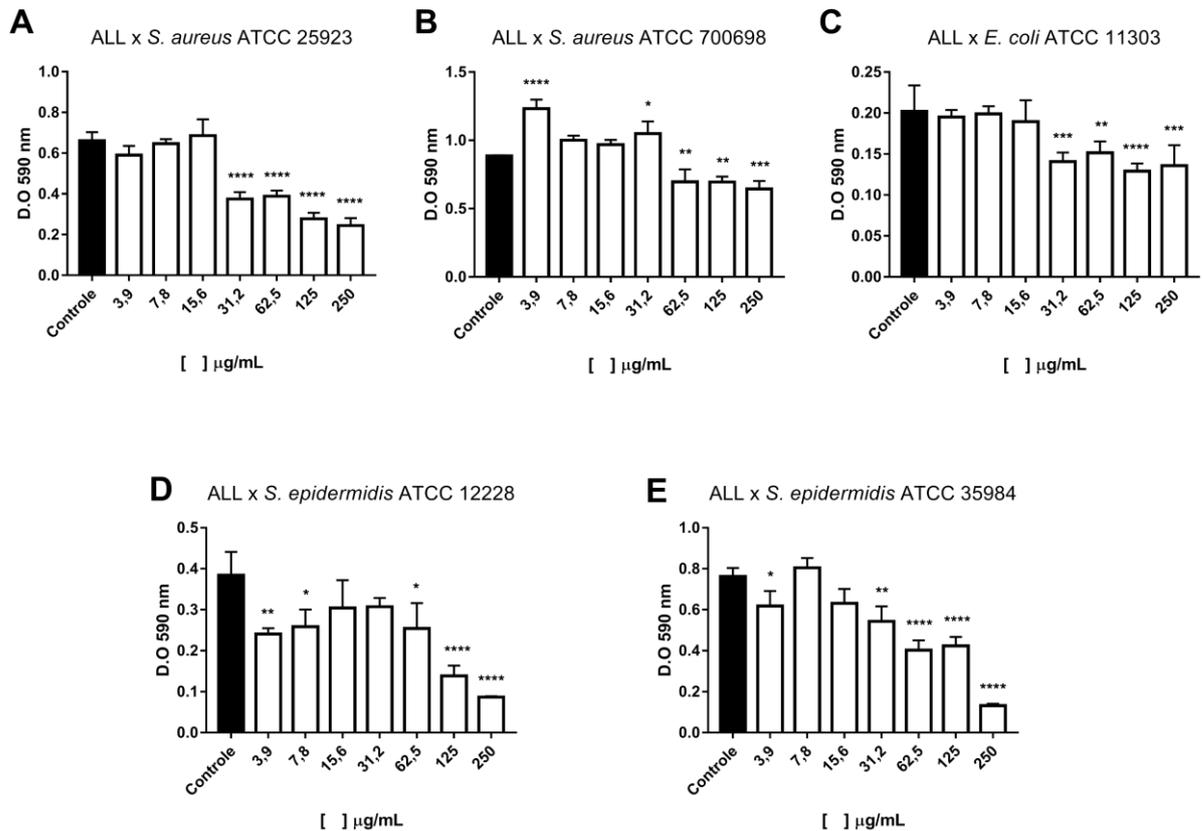
Fonte: A autora. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina ALL, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 0,096 a 1.000 µg/mL para ampicilina e de 0,190 a 100 µg/mL para tetraciclina. A concentração de ALL se manteve constante (125 µg/mL). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico.

4.9 Ação das lectinas sobre a formação dos biofilmes

Para avaliar o efeito do estado de oxidação da lectina sobre seu efeito antibiofilme foram testadas duas amostras da lectina em solução: ALL e CAM-ALL.

O efeito de ALL e CAM-ALL na prevenção da formação de biofilmes foi avaliado por dois ensaios diferentes: determinação da massa de biofilme quantificado pelo método colorimétrico CV (Cristal de Violeta) e enumeração de células viáveis de biofilmes, pelo método de contagem de UFCs.

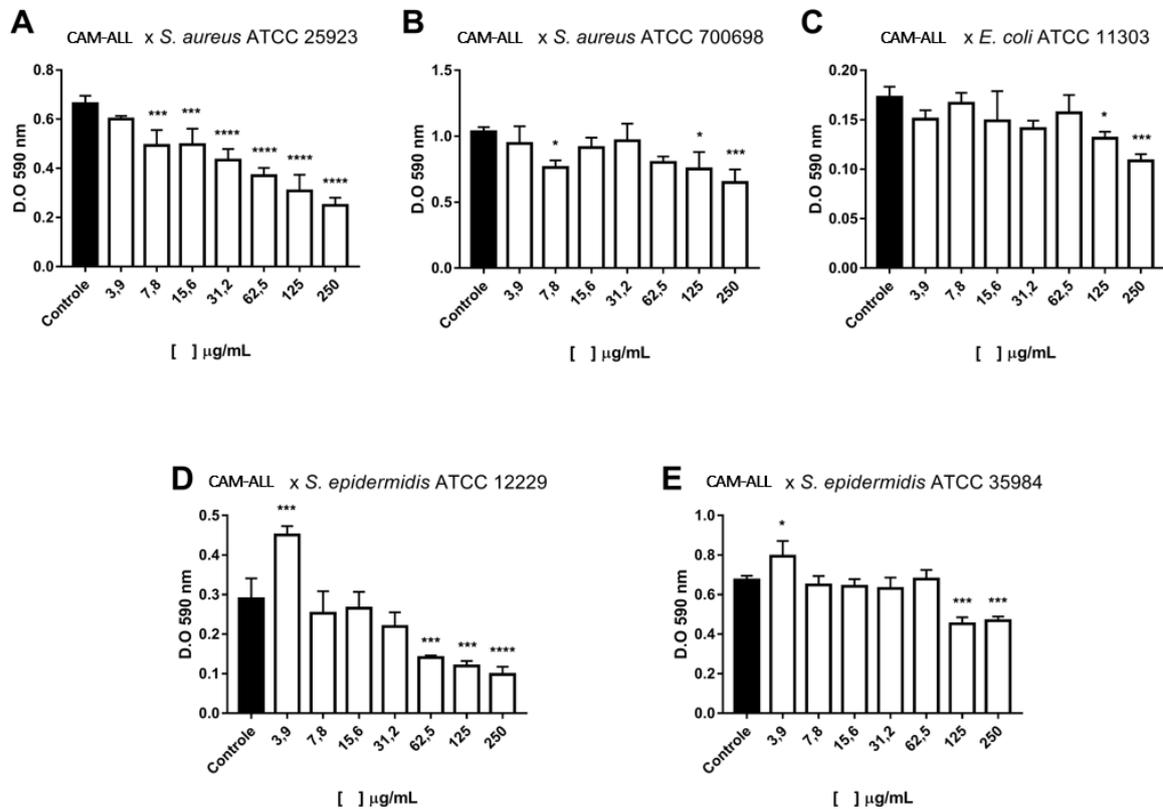
O tratamento do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com ALL reduziu a biomassa nas concentrações de 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16 A). Para *S. aureus* ATCC 700698 com ALL, a redução do biofilme foi observada nas concentrações 3,9, 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16 B). O tratamento do biofilme de *Escherichia coli* ATCC 11303 com ALL reduziu a biomassa nas concentrações de 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16C). Para *S. epidermidis* ATCC 12228 o tratamento com ALL promoveu a redução do biofilme nas concentrações 3,9, 7,8, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16D), enquanto que a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 a redução ocorreu nas concentrações de 3,9, 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16E).

Figura 16 - Efeito de ALL sobre biofilmes de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*

Fonte: A autora. **A e B**: Atividade antibiofilme bacteriano de ALL contra *S. aureus*. **C**: Atividade antibiofilme bacteriano de ALL *E. coli*. **D e E**: Atividade antibiofilme bacteriano de ALL contra *S. epidermidis*. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,001$ em relação ao controle. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

O tratamento do biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 com CAM-ALL mostrou redução quando testados nas concentrações de 7,8, 15,6, 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 17A). Em relação a *S. aureus* ATCC 700698 com CAM-ALL, a redução do biofilme foi observada nas concentrações de 7,8, 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 17B). O tratamento do biofilme de *E. coli* ATCC 11303 com CAM-ALL promoveu a redução o biofilme bacteriano nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 17C). Para *S. epidermidis* ATCC 12228 o tratamento com CAM-ALL mostrou redução nas concentrações de 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 17D), enquanto que o tratamento de CAM-ALL com a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, a redução do biofilme foi evidenciada nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 17E).

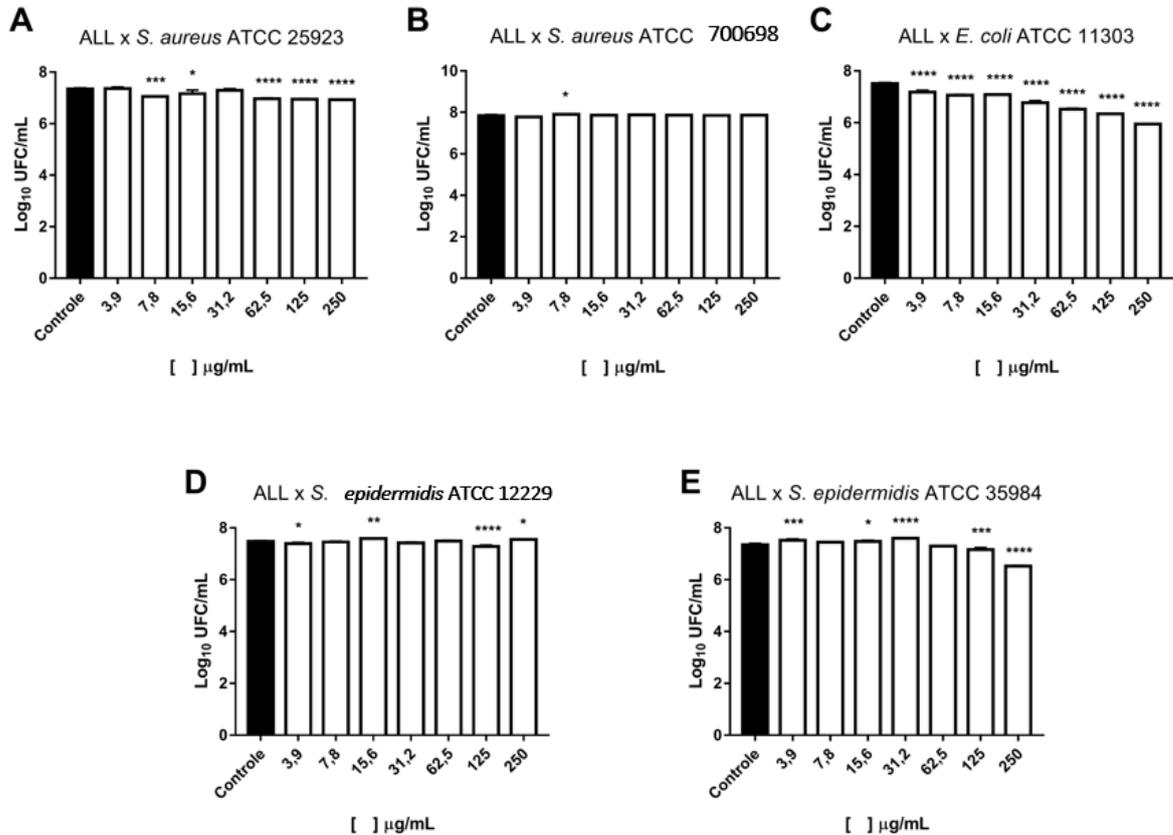
Figura 17 – Efeito de CAM-ALL sobre biofilmes de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*



Fonte: A autora. **A e B**: Atividade antibiofilme bacteriano de CAM-ALL contra *S. aureus*. **C**: Atividade antibiofilme bacteriano de CAM-ALL *E. coli*. **D e E**: Atividade antibiofilme bacteriano de CAM-ALL contra *S. epidermidis*. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,001$ em relação ao controle. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Em relação ao número de células viáveis de *S. aureus* ATCC 25923, ALL mostrou poder redutor nas concentrações de 7,8, 15,6, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 18A). Para *S. aureus* ATCC 700698 não foi observada redução (Figura 18B). ALL reduziu o número de células viáveis de *E. coli* ATCC 11303 em todas as concentrações testadas (Figura 18C) e para *S. epidermidis* ATCC 12229, o tratamento com ALL reduziu o número de células viáveis nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 18D). Com a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 a redução das células viáveis foi observada nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 18E). Entretanto, não houve diferença significativa em todos os tratamentos.

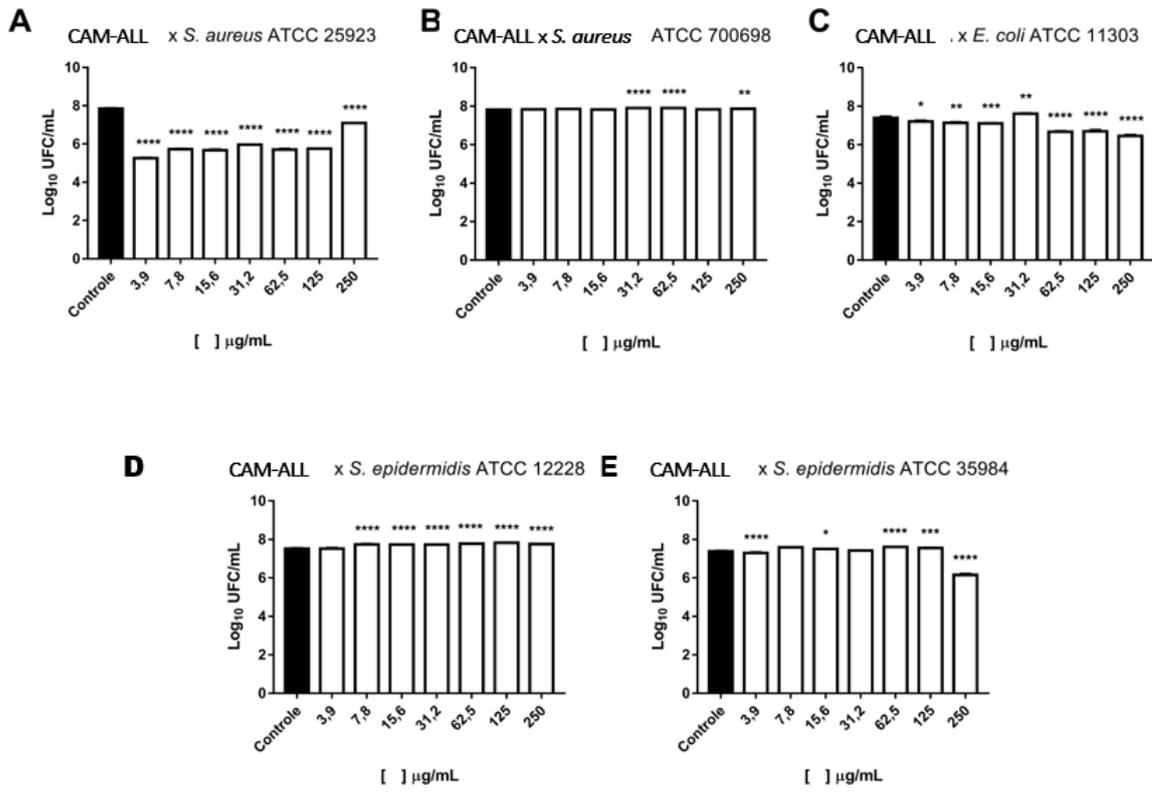
Figura 18 – Número de células viáveis de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis* com ALL



Fonte: A autora. **A e B**: Enumeração de células viáveis de *S. aureus* contra ALL. **C**: Enumeração de células viáveis de *E. coli* contra ALL. **D e E**: Enumeração de células viáveis de *S. epidermidis* contra ALL. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,001$ em relação ao controle. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

CAM-ALL reduziu *S. aureus* ATCC 25923 em todas as concentrações testadas, com mais eficiência na concentração de $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 19A), enquanto *E. coli* reduziu o número de células viáveis nas concentrações de $62,5$, 125 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura C) e *S. epidermidis* ATCC 35984 na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 19 E). Para as outras cepas não houve diferença significativa (Figura 19 B e D).

Figura 19 - Número de células viáveis de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis* com CAM-ALL



Fonte: A autora. **A e B**: Enumeração de células viáveis de *S. aureus* contra CAM-ALL. **C**: Enumeração de células viáveis de *E. coli* contra CAM-ALL. **D e E**: Enumeração de células viáveis de *S. epidermidis* contra CAM-ALL. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,001$ em relação ao controle. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Proteínas inseridas na família das galectinas são sintetizadas no citosol, onde podem ser secretadas para o espaço extracelular. Na matriz extracelular, essas proteínas interagem com os carboidratos que elas possuem especificidade, estes sacarídeos parecem reduzir a inativação oxidativa, permitindo que as galectinas participem de diversas atividades biológicas, desde a regulação de atividades celulares até o fornecimento direto de imunidade inata. Essas lectinas são independentes de cálcio, porém necessitam de resíduos de tióis livres para cumprir sua função lectínica. A oxidação de galectinas frequentemente reflete a formação da ligação dissulfeto, que pode ser facilmente revertida após a inclusão de agentes redutores de tiol livres como: β ME, DTT, glutatona reduzida ou L-cisteína (GO, Y.; JONES, D.P., 2013; STOWELL *et al.*, 2015).

Após a observação de que se trata de uma galectina, e esta ter formado pontes dissulfeto entre duas subunidades como observada por Carneiro e colaboradores (2017), o processo de purificação de ALL foi modificado e foi adicionado L-cisteína ou DTT aos tampões. Até o momento não há relato de alteração de forma, e também do perfil da atividade hemaglutinante de galectinas de esponja em ambiente reduzido e oxidado. ALL mostrou atividade hemaglutinante em ambos os ambientes, porém o título de hemaglutinação foi mais elevado para ALL na presença dos agentes redutores: L-cisteína ou DTT, o que reforça que o ambiente redutor é mais favorável para a atividade hemaglutinante da proteína (Tabela 5).

Assim como observado em ALL, uma galectina da esponja marinha *Cinachyrella allocada* (CaL), foi isolada utilizando L-cisteína no tampão de extração (MARQUES, 2020). A L-cisteína atua como um agente redutor, a adição desse composto promove a formação de grupo sulfidrilas livres (SH), agindo de modo oposto aos agentes oxidantes. Esse reagente evita a formação de pontes dissulfeto intra e intermoleculares em proteínas, pois promove o rompimento ou bloqueio dessas interações (SONG; ZHENG, 2007).

Eletrolectin, uma galectina isolada de *Electrophorus electricus*, mesmo sem possuir cisteína em sua cadeia peptídica, perdeu atividade na presença do oxigênio atmosférico, devido a oxidação de um único resíduo de triptofano da molécula. A atividade hemaglutinante foi recuperada quando a lectina foi exposta ao agente redutor 2-mercaptoetanol (LEVI; TEICHBERG; 1981).

Pace e colaboradores (2003) relataram o uso de DTT para purificação de GAL-1, uma das galectinas humanas mais estudadas, que possui 6 resíduos de cisteína em sua cadeia peptídica. A utilização do agente redutor foi para evitar a inativação oxidativa devido a

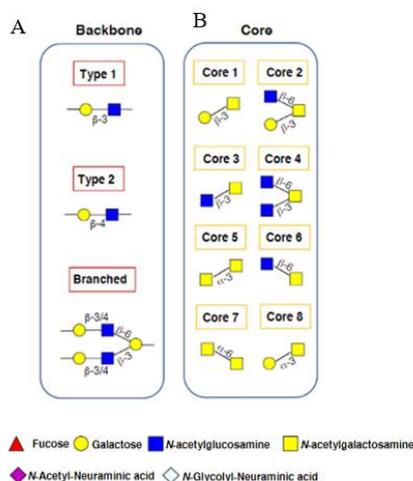
formação de pontes dissulfeto intramolecular. Em outro estudo, GAL-1 apresentou ausência de atividade lectínica quando oxidada, embora tenha exibido atividade de regeneração axonal do nervo periférico, levantando a hipótese de que, em ambiente redutor, a galectina forma interações entre os resíduos de cisteína, possibilitando a formação de pontes dissulfeto intramoleculares que alteram a estrutura da proteína e confere a atividade regenerativa (HORIE *et al.*, 2005).

Carneiro e colaboradores (2017) relataram a inibição de ALL pelos carboidratos: α - D-lactose, β - D-lactose e D-lactulose e pela glicoproteína PSM tipo II, porém não foi relatado inibição por outras glicoproteínas.

A atividade hemaglutinante de ALL foi inibida pelas glicoproteínas fetuína, PSM III, asialo fetuína e BSM. ALL mostrou ter forte afinidade por BSM com CIM de $3,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e por fetuína com CIM de $3,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$. ALL também exibiu afinidade por mucina estomacal suína tipo III na concentração mínima de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para asialofetuína (Tabela 5).

Mucinas são glicoproteínas que possuem alto peso molecular e altamente glicosiladas, chegando a possuir mais de 50% do seu peso molecular composto por cadeias de O-glicanos, os quais são principalmente constituídos por resíduos GalNAc ligados aos aminoácidos Ser/Thr da cadeia peptídica. As estruturas centrais podem ser glicosiladas por cadeias lineares ou ramificadas e suas extremidades possuem diferentes sequências que são frequentemente fucosiladas, sialiladas e/ou sulfatadas (Figura 20) (LI; WENGANG, 2019).

Figura 20 – Representação esquemática dos elementos estruturais O-glicanos de mucina.



Fonte: LI; WENGANG, 2019. A) Backbone: cadeias lineares (tipo 1 e 2) e cadeia ramificada em O-glicanos de mucina. B) Core: estruturas centrais identificadas em O-glicanos de mucinas.

Os carboidratos que compõem a porção glicosídica central nas mucinas de glândulas submaxilar de bovinos são: estruturas core 1 (Gal-GalNAc), core 2 (GlcNAc-(Gal)-GalNAc, semelhantes a mucinas humanas, core 3 (GlcNAc-GalNAc), core 4 (GlcNAc-(GlcNAc)-GalNAc) e core 5 (GalNAc-GalNAc), que são menos comuns em outras mucinas. Além disso, os *O*-glicanos de BSM são formados por di- a octassacarídeos, sendo que os di- a hexassacarídeos são sialilados com Neu5Ac ou Neu5Gc (KIM *et al.*, 2020). Na PSM a glicosilação é distinta e diversa, sendo os carboidratos presentes na glicoproteína composto por GalNAc, galactose, GlcNAc, fucose e ácido sialico (KARLSSON *et al.*, 1997; NORDMAN *et al.*, 1997; VIANA, 2021).

Fetuína, a principal proteína encontrada no plasma fetal bovino, possui carboidratos *O*-ligados bem caracterizados, incluindo NeuAc α 2-3Gal β 1-4(NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2) Man α 1-6 (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc (BAENZIGER; FIETE, 1979). Enquanto asialofetuína, que é análoga a fetuína, diferente desta por não possuir o derivado *N*-acetilado do ácido neuramínico, ou seja, ácido siálico nas extremidades do glicano (ČERNOCKÁ; ŘÍMÁNKOVÁ; OSTATNÁ, 2021).

Além de ALL outras lectinas de esponjas marinhas apresentaram afinidade por *O*-glicanos, como observado com a lectina de *Chondrilla caribensis* que exibiu afinidade por BSM, fetuína e PSM (MARQUES *et al.*, 2018). Uma lectina do gênero *Aplysina*, ACL de *Aplysina cauliformis*, apresentou afinidade por BSM e PSM (VIANA, 2021) e AfL, de *Aplysina fulva*, por PSM (CARNEIRO *et al.*, 2019).

A massa molecular da proteína estimada em SDS-PAGE foi de aproximadamente 15 kDa, após cromatografia utilizando L-cisteína ou DTT (Figura 4). Carneiro e colaboradores (2017) observaram dois íons principais de 15.737 ± 2 Da e 15.990 ± 2 Da, quando a proteína foi reduzida e alquilada, correspondentes as isoformas da lectina (CARNEIRO *et al.*, 2017), corroborando com a massa molecular de 15 kDa estimada por eletroforese.

Quando dialisada e liofilizada, a lectina voltou a formar interações intermoleculares ou intramoleculares, que resultaram na massa molecular de aproximadamente 30 kDa estimada no SDS – PAGE (Figura 4), corroborando com dados obtidos por Carneiro e colaboradores (2017), quando não adicionado o agente redutor β -mercaptoetanol.

De fato, a ausência de L-cisteína ou DTT nos tampões utilizados para a purificação de ALL, influenciaram na formação de pontes dissulfeto entre as subunidades da

lectina. A massa molecular nativa de ALL, em tampão contendo cisteína, estimada por cromatografia de exclusão molecular foi de aproximadamente 60 kDa (Figura 5C), indicando que ALL se oligomeriza formando um tetrâmero com as subunidades unidas por interações fracas.

Em ambiente oxidativo (sem agentes redutores), ALL apresentou massa molecular de 80 kDa (Figura 5C), que pode ser resultado de interações intra ou intermoleculares através de pontes dissulfeto. Horie e colaboradores (2005) observaram a alteração na estrutura de Gal-1 em ambiente oxidativo também pela formação de pontes dissulfeto intra e intercadeias.

Assim como ALL, a forma homotetrâmera foi também observada nas galectinas das esponjas marinhas *Cinachyrella sp.*, onde suas isoformas se agregam formando um tetrâmero estável (UEDA *et al.*, 2012). Na galectina de *Geodia cydonium* foi observada a formação de um tetrâmero de 60 kDa com subunidades de 15 kDa (WAGNER-HÜLSMANN *et al.*, 1996). Já em CCL, as subunidades de 15 kDa se oligomerizam por interações fracas formando um tetrâmero de 54 kDa (MARQUES *et al.*, 2018). Esse perfil de oligomerização também foi observado com as lectinas de *Aplysina archeri* (AaL) e *A. lacunosa* (AIL), que após filtração em gel formaram um tetrâmero de 63 kDa, com subunidades de 16 kDa (MIARONS; FRESNO, 2000).

A estrutura primária de ALL foi completamente determinada por espectrometria de massas (MS/MS) em associação com degradação de Edman. A diferença entre alguns aminoácidos observados nos peptídeos sequenciados confirmou a presença de isoformas, contribuindo para determinação da estrutura primária das isoformas de ALL (Figura 6). Ambas as isolectinas possuem 144 aminoácidos e massa molecular média calculada de 15736 ± 2 Da e 15985 ± 2 Da, o que corrobora com as massas das CAM- ALL (15908 e 16159 Da) observadas por Carneiro e colaboradores (2017) sendo que as diferenças de massas de 171 Da correspondem a 3 cisteínas carbamidometiladas. (Figura 7).

Nos últimos vinte anos, a espectrometria de massas tem sido uma ferramenta útil na análise de características estruturais de lectinas e outras proteínas. No entanto, alguns obstáculos impedem a determinação de estruturas primárias por meio de MS/MS, tais como: decodificação de espectros de massa, sobreposição incompleta da faixa de peptídeos obtidos e baixa intensidade de íons fragmentados (CARNEIRO *et al.*, 2013).

Assim como ALL, as lectinas das esponjas marinhas *Haliclona caerulea* e *Chondrila caribensis* tiveram sua estrutura primária totalmente determinada por espectrometria de massas (CARNEIRO *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2021).

O ponto isoelétrico previsto de ALL classifica essa proteína como ácida. Algumas lectinas de esponjas marinhas também apresentaram o ponto em que a carga líquida é nula em pH ácido, como: GCGs de *Geodia cydonium* com pI de 4.4, Hol – 30 de *Halichondria okadai* com pI de 6.7, PsL de *Pellina semitubulosa* com pI de 6.1, AcL 1 de *Axinella corrugata* com pI de 6.3, ApL 1 de *Axinella polypoides* com pI de 3.9, Hol 1 e 2 de *Halichondria okadai* com pI de 4.5 e CCL de *Chondrilla caribensis* com pI de 4.5 (GÁRDERES *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2021).

A sequência de aminoácidos das isoformas de ALL resultou na arquitetura de domínio tipo galectina indicada pela ferramenta online *SMART*, o e-value para ambas as lectinas confirma o domínio. Quanto mais próximo de zero for o e-value, mais confiável é o alinhamento, portanto as isolectinas possuem um domínio confiável de galectina (LETUNICK; KHEDKAR; BORK, 2021).

O programa *BLAST* mostrou similaridade entre a sequência das ALLs com uma proteína não caracterizada da esponja marinha *Amphimedon queenslandica* (XP_011408566.2). Os resíduos de aminoácidos presentes no DRC de galectinas foi observado nas posições: ³⁸LH³⁹, R⁴³, N⁶³, ⁷⁰WG⁷¹ e E⁷³ na proteína não caracterizada de *Amphimedon queenslandica*. A lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* também mostrou similaridade da sequência de aminoácidos com a proteína de *Amphimedon queenslandica* (SOUSA *et al.*, 2021), indicando que a proteína não caracterizada de *Amphimedon queenslandica* pode ser uma galectina de esponja.

A identidade de sequência de aminoácidos das galectinas é moderadamente alta, e os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com o carboidrato são altamente conservados (BERTUZZI *et al.*, 2020). O DRC identificado nas galectinas tbm foi identificado nas duas isoformas de ALL nas posições: ³⁸LHVDYRK⁴⁴, ⁶¹IIN⁶³, ⁷⁰WG⁷¹, E⁷³, K⁷⁵ e ⁷⁹VET⁸¹ (Figura 11). As variações de ligações com diferentes tipos de carboidratos ou glicoproteínas observados em galectinas pode ser resultado das alterações dos resíduos de aminoácidos da sequência primária dessas proteínas (FREYMANN *et al.*, 2012).

Dos resíduos de aminoácidos altamente conservados em galectinas de esponjas marinhas: R⁴⁴, L⁶³, N⁶⁴, W⁷¹ e F⁸⁰ (SOUSA *et al.*, 2021) apenas o F⁸⁰ não foi observado nas isoformas de ALL (Figura 11).

No alinhamento de ALL com as galectinas das esponjas marinhas *Chondrilla caribensis* (SOUSA *et al.*, 2021), *Geodia cydonium* (PFEIFER *et al.*, 1993), *Cinachyrella sp.* (UEDA *et al.*, 2012) e galectina 1 e 2 de *Suberites domuncula* (WIENS *et al.*, 2013; SCHRÖDER *et al.*, 2006) pôde-se observar a semelhança entre o domínio galectínico. O

alinhamento de ALL entre todas as galectinas de esponja demonstrou que os resíduos que se mantiveram conservados em todas as sequências de aminoácidos dessas proteínas foram: R⁴⁴, I⁶³, N⁶⁴, W⁷¹ (Figura 11).

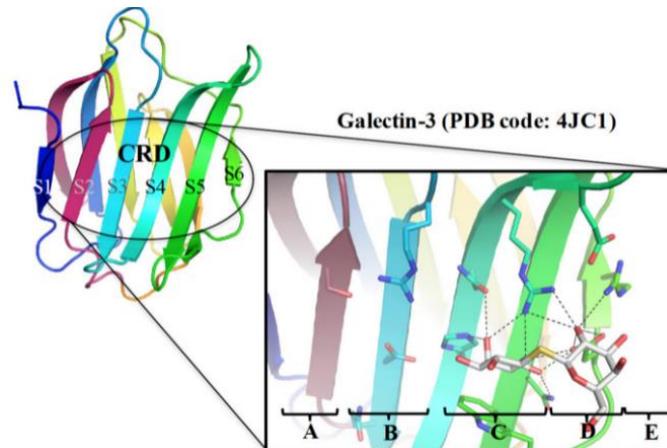
As galectinas são proteínas evolutivamente conservadas encontradas em vertebrados e invertebrados e que são divididas em famílias de acordo com a arquitetura estrutural: proto, quimera e tandem (BERTUZZI *et al.*, 2021; VASTA, 2016; XU *et al.*, 2021). A ausência de dois ou quatro domínios de reconhecimento a carboidratos, como observado em galectinas de invertebrados, exclui a ALL do domínio tandem. Também não foi observado a presença de um N-terminal rico em prolina e lisina, que a classificaria como uma quimera. A presença de um único DRC na estrutura primária de ALL, a similaridade com as protogalectinas, incluindo CCL de *Chondrilla caribensis* (SOUSA *et al.*, 2021) e galectina 1 de *Homo sapiens* (NO_002296), e a conservação do DRC observado no alinhamento entre CCL e galectina 1 humana, tornam evidentes a classificação de ALL como uma galectina inserida na subfamília protótipo (Figura 12).

A estrutura de ALL prevista pelo programa I-TASSER é o β sanduíche comumente identificado em galectinas. O DRC de galectinas consiste em aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos que se dobram em duas folhas β antiparalelas de seis (S1-S6) e cinco (F1-F5) fitas, formando conjuntamente um modelo estrutural β sanduíche (BERTUZZI *et al.*, 2020).

O programa COACH previu, por analogia de estruturas já depositadas no Protein Data Bank (PDB), para ALL-a e ALL-b a ligação ao carboidrato galactose e os resíduos presentes no DRC típico de galectinas, que envolveram o carboidrato presente em ambas as isoformas foram: R²⁴, R⁴³, E⁷³ e K⁷⁵ (Figura 14 e 15A). Além disso, em concordância com dados obtidos na inibição da atividade hemaglutinante de ALL, o programa apresentou resultados da ligação de ALL-b com o composto lactose-ácido siálico, onde os resíduos presentes no DRC de galectinas que envolveram o composto nessa previsão foram: H³⁹, D⁴¹, R⁴³, N⁶³, W⁷⁰, E⁷³ e K⁷⁵ (Figura 15B). Por ser mais complexo, a interação com lactose-ácido siálico envolveu mais resíduos em sua ligação com a lectina.

O local de ligação a carboidrato forma uma superfície côncava e é dividido em subsítios de A-E para melhor compreensão da interação ao carboidrato. O subsítio C abriga a β -galactose, enquanto o subsítio D, menos conservado, acomoda o resíduo de açúcar (por exemplo, glicose na lactose) próximo à β -galactose (CHAN *et al.*, 2018) (Figura 21). Esse perfil de ligação foi observado na previsão do sitio de ligação das isoformas de ALL com os carboidratos galactose e lactose-ácido siálico.

Figura 21 - Subsítio do DRC das galectinas



Fonte: CHAN *et al.*, 2018. Estrutura do DRC das Galectinas com cinco subsítios (A–E) onde os tiodigalactosídeos se ligam, interagindo com os subsítios C e D de maneira semelhante à lactose ou *N*-acetilglicosamina. Galectina 3 é usada como exemplo.

Atualmente, infecções bacterianas por cepas resistentes é um sério problema, visto que essa resistência é causada principalmente pela adaptação dos microrganismos aos antimicrobianos convencionalmente utilizados e também pelo uso excessivo desses medicamentos, além da falta de programas que visam o controle de infecções (SILVA *et al.*, 2019). Dessa forma, se faz necessário pesquisar moléculas capazes de aumentar a eficácia dos antibióticos.

ALL potencializou a atividade dos antibióticos tetraciclina e ampicilina, quando complexados com estes, contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*. ALL em combinação com a tetraciclina apresentou efeito aditivo, ou seja, houve um leve aumento na inibição do antibiótico, e em combinação com ampicilina, apresentou efeito sinérgico, exibindo um aumento significativo na ação do antibiótico (Tabela 9).

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, sendo capaz de agir sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação desse fármaco ocorre através da ligação ao ribossomo bacteriano, impedindo a síntese de proteínas, causando a interrupção do crescimento celular. A resistência das bactérias a tetraciclina pode ocorrer por vários mecanismos, como: efluxo ativo da droga pela célula; produção de proteínas de proteção ribossomal; diminuição da permeabilidade do fármaco; mutação no ribossomo e degradação enzimática dos antibióticos (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2009).

A ampicilina é um antibiótico β -lactâmico que possui uma característica estrutural central (um anel β -lactâmico) e age inibindo a síntese da parede celular microbiana. A resistência a antibióticos β -lactâmicos envolve a produção da enzima β -lactamase, que cliva o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico, além de outros mecanismos, como os citados para a tetraciclina, também estão associados a resistência dos microrganismos a ampicilina (LODE, 2008).

A associação de produtos naturais pode ser considerada uma alternativa ao uso combinado de diferentes classes de antibióticos em um único medicamento. Além disso, essa associação é uma estratégia promissora no combate à resistência bacteriana

Até o presente momento não há relatos de estudos sobre lectinas de esponjas marinhas associadas a algum antibiótico, porém alguns autores já descreveram o sinergismo de lectinas vegetais com fármacos antibacterianos. A lectina da romã *Punica granatum* (PgTel) apresentou efeito sinérgico contra *E. coli* quando associada aos antibióticos ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, cefalexina e cefuroxima (DA SILVA *et al.*, 2019). A lectina de *Parkia platycephala* (PPL), quando associada a gentamicina, mostrou que o MIC do fármaco reduziu em 61% contra cepas de *S. aureus* e 32% contra cepas de *E. coli*, (SILVA *et al.*, 2019). A lectina de *Dioclea violacea* em sinergismo com gentamicina aumentou a atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* (SANTOS *et al.*, 2020). Os autores relacionam o aumento da ação do antibiótico contra as cepas multirresistentes a interação deste com o DRC da lectina, pela ação da proteína reconhecer o carboidrato presente na membrana celular e facilitando a entrada do fármaco. Outra hipótese é que as lectinas podem interagir com glicanos presentes nas bombas de efluxo, e bloqueando ou modificando sua conformação estrutural (SILVA *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2020). No entanto, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de atuação das lectinas com os medicamentos.

Para avaliar se o ambiente reduzido interferia na atividade antibiofilme bacteriano de ALL, foi adicionado IAA à solução da lectina após purificação, porém não houve diferença significativa da atividade antibiofilme entre ALL e CAM-ALL. Ambas as soluções inibiram o biofilme bacteriano e também o número de células viáveis das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e a Gram-negativa (*E. coli*), porém CAM-ALL obteve melhores resultados que ALL quando comparadas ao controle (Figuras 16 e 17).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é formada por lipopolissacarídeos (LPS) e peptídeoglicanos (PNG) e de bactérias Gram-positiva possuem peptídeoglicanos (PNG) mais espesso (FONSECA *et al.*, 2022). Paiva e colaboradores (2010)

relataram que os efeitos antimicrobianos das lectinas podem envolver sua interação com componentes da parede celular microbiana, que pode ser composta por ácidos teicóicos, teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos. Possivelmente, ALL tem afinidade por esses glicanos estando de acordo com os resultados da atividade da lectina contra esses patógenos.

Os biofilmes são comunidades bacterianas agregadas associadas a superfícies ou a interfaces que formam uma película composta de polissacarídeos e proteínas extracelulares, relacionados à resistência a drogas e disseminação da infecção. As células que formam o biofilme são designadas de sésseis e as dispersas e livres na fase aquosa são chamadas de planctônica. A resistência do biofilme é de supostamente 10 a 1000 vezes maior quando comparada com células planctônicas, devido a proteção conferida por polímeros da matriz do biofilme (MARQUES *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2022).

Além do efeito inibitório de ALL contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*, observado por Carneiro e colaboradores (2017), foi observado no presente estudo, adicionamos cepas resistentes e também foi observado a redução de biofilmes de *S. epidermidis* (Figura 16 E e 17 E).

Outras lectinas de esponja também já foram capazes de inibir o crescimento de biofilmes bacterianos. CCL de *Chondrilla caribensis* e AfL de *Aplysina fulva*, que são proteínas ligantes de β – galactosídeos, mostraram uma redução significativa da biomassa total nos biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (CARNEIRO *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

A lectina de *Aplysina lactuca* (ALL) foi purificada em condições redutoras, exibindo melhor atividade hemaglutinante nessas condições por ser uma proteína citoplasmática, porém não houve perda de função em ambiente oxidado. ALL foi caracterizada estruturalmente, a estrutura primária da lectina mostrou alta similaridade com lectinas pertencentes a família das galectinas.

A análise realizada através de bioinformática revelou uma estrutura tridimensional tipo β -sanduíche, formado por 2 folhas β antiparalelas, e a previsão do sítio de ligação a carboidratos revelou a interação da lectina com galactosídeos, ambos resultados são típicos de galectinas.

Além disso, potencializou o efeito dos antibióticos ampicilina e tetraciclina, e inibiu a formação de biofilmes mostrando elevado potencial biotecnológico, tendo em vista que as bactérias estão cada vez mais resistentes aos medicamentos presentes no mercado. No entanto, estudos complementares são necessários para melhor resolução estrutural e compreensão da função da proteína.

REFERÊNCIAS

- ANGTHONG, P.; ROYTRAKUL, S.; JARAYABHAND, P.; JIRAVANICHPAISAL, P. Involvement of a tachylectin-like gene and its protein in pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the shrimp, *Penaeus monodon*, **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l.], v.76, p. 239-237, 2017.
- AZEVEDO, L. G.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; FILGUEIRA, D.M.V.B.; BOYLE, R.T.; RAMOS, D.F.; SOARES, A. D.; LERNER, C.; SILVA, P.A.; TRINDADE, G.S. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 147, n.1, p. 36-42, 2008.
- BAENZIGER, J. U.; FIETE, D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 254, n. 3, p. 789–795, 1979.
- BERGQUIST, P.R.; DE COOK, S.C. Order Verongida Bergquist, 1978. In: Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M., Willenz P. (eds) *Systema Porifera*. **Springer**, Boston, MA. 2002.
- BERTUZZI, S.; quintanda, J.; ARDÁ, A.; GIMENO, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Targeting Galectins With Glycomimetics. **Frontiers in Chemistry**, [s.l.], v. 8, p. 1–17, 2020.
- BOYD, W.C.; SHARPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [s.l.], v. 119, p. 419, 1954.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROWN, G.D.; WILLMENT, J.A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. **Nat Rev Immunol**, [s.l.], v.18, p.374–389, 2018.
- CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; MOURA, R.M.; CHAVES, R.P.; SOUSA, B.L.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, S.S.; LIMA, J.P.M.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013.
- CARNEIRO, R.F.; LIMA, P.H.P.; CHAVES, R.P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A.L.; VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 99, p. 213–222, 2017.
- CARNEIRO, R. F. **Purificação e caracterização bioquímica de lectinas ligantes de galactose isoladas de invertebrados marinhos**. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará. 2017.

CARNEIRO, R.F. VIANA, J.T.; TORRES, R.C.F.; SILVA, L.T.; ANDRADE, A.L.; VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l], v. 662, p. 169–176, 2019.

CESÁRIO, H.P.S.F.; SILVA, F.C.O; FERREIRA, M.K.A.; MENEZES, J.E.S.A.; SANTOS, H.S.; NOGUEIRA, C.E.S.; SILVA, K. S. B. L; HAJDU, E.E.; SILVEIRA, E. R.; OTÍLIA DEUSDÊNIA L. PESSOA, O. D. L. Anxiolytic-like effect of brominated compounds from the marine sponge *Aplysina fulva* on adult zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of the GABAergic system, **Neurochemistry International**, [s.l], v. 146, 2021.

ČERNOCKÁ, H.; ŘÍMÁNKOVÁ, L.; OSTATNÁ, V. Fetuin and asialofetuin at charged surfaces: Influence of sialic acid presence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s.l], v. 902, 2021.

CHAN, Y.; LIN,H.; TU,Z.; KUO,Y.; HSU,S.; LIN,C. Dissecting the structure–Activity relationship of galectin–Ligand interactions. **International Journal of Molecular Sciences**,[s.l], v. 19, n. 2, p. 1–20, 2018.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. J. *Fusarium sp.* growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochim Biophys Acta**, [s.l], v.1428, n (3 - 4), 1999.

CUMMINGS, R.D. Stuck on sugars – how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling. **Glycoconj Journal**, [s.l], v.36, p. 241–257, 2019.

DA SILVA, P. M. *et al.* Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 135, p. 931–939, 2019.

DE VOS, L; RÜTZLER, K; BOURY-ESNAULT, N; DONADEY, C; VACELET J. Atlas of sponge morphology. **Atlas de morphologie des éponges**, Washington & London: Smithsonian Institution Press. p.117, 1991.

DIAS, ANNE SHYRLEY FERREIRA. **Lectina da esponja marinha *Tedania ignis***. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, [s.l], v. 11, n. 5, p. 71R-9R, 2001.

EHRlich, H., ILAN, M., MALDONADO, M., MURICY, G., BAVESTRELLO, G., KLJAJIC, Z., BRUNNER, E. Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l] v.47, n. 2, p.132–140, 2010.

EL-BAWAB, F. *Phylum Porifera. Invertebrate Embryology and Reproduction*, [s.l], p.106-169, 2020.

ELUMALAI, P.; RUBEENA, A.S.; AROCKIARAJ, J.; WONGPANYA, R.; CAMMARATA, M.; RINGO, E.; VASEEHARAN, B. The Role of Lectins in Finfish: A Review. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, [s.l] v. 27, n. 2, p. 152-169, 2019.

FONSECA, V. J. A.; BRAGA, A.L.; FILHO, R. J.; TEIXEIRA, C. S.; HORA, G. C. A.; MORAIS-BRAGA, M. F.B. A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l] v. 195, n. November 2021, p. 163–178, 2022.

FREYMANN, D.M.; NAKAMURA, Y.; FOCIA, P. J.; SAKAI, R.; SWANSON, G. T. Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, [s.l], v. 68, p. 1163-1174, 2012.

GARDÈRES, J.; KONDRACKI, M.L.B.; HAMER, B.; BATEL, R.; SCHRÖDER, H.C.; MÜLLER, W.E.G. Porifera Lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine drugs**, [s.l], v.13, p.5059-5101, 2015.

GAZAVE, E., LAPEBIE, P., ERESKOVSKY, A.V., VACELET, J., RENARD, E., CARDENAS, P., BORCHIellini, C. No longer Demospongiae : *Homoscleromorpha* formal nomination as a fourth class of Porifera. **Hydrobiologia**, [s.l], v.687, p. 3–10, 2012.

GO, Y. M.; JONES, D. P. Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l], v. 48, n. 2, p. 173–181, 2013.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent β -galactoside binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, [s.l] v. 3, n. 4, p. 297- 304, 1993.

HOOPER, J. N., VAN SOEST, R.W. *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, New York, p. 1718, 2002.

HOOPER, J.N.A; SOEST, R. W. M. VAN.; SOEST, R.W.M. *Systema Porifera: a guide to the supraspecific classification of the phylum Porifera*. **Kluwer Academic Plenum Publishers**, New York. Capítulo 7, p. 15-18. 2002.

HORIE, H; KADOYA, T; SANGO, K; HASEGAWA, M. Oxidized galectin-1 is an essential factor for peripheral nerve regeneration. **Curr Drug Targets**, [s.l] v.4, p.385-394, 2005.

HUNG, L. D.; LY B.M.; HAO, V.T.; TRUNG, D.T.; TRANG, V. T. D.; TRINH, P., T., H.; NGOC, N.T.D.; QUANG, T.M. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961) **Journal Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, [s.l] v.216, p. 32- 38, 2018.

ICMBIO. Estado de conservação da fauna Brasileira. **Porifera**. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/4914-porifera> Acesso em: 09 Jul. 2021.

- KAJAZANJIAN, A.; FARIÑAS, M. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: *Aplysinidae*). **Revista de biología tropical**, [s.l], vol.54, n.3, p.189-200, 2006.
- KARLSSON, N. G.; NORDMAN, H.; KARLSSON, H.; CARLSTED, I.; HANSSON, G. C. Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: A comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. **Biochemical Journal**, [s.l], v. 326, n. 3, p. 911–917, 1997.
- KANZAKI, H.; SAITOH, H.; TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; ITO, A.; KAMOUN, S.; TERAUCHI, R. NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. **Planta**, [s.l], v. 228, n.6, p.977–987, 2008.
- KELLY, S.R.; GARO, E.; JESEN, P.R.; FENICAL, W.; PAWLIK, J.R. Effects of Caribbean sponge secondary metabolites on bacterial surface colonization, **Aquatic Microbiology Ecologic**, [s.l], v.40, p. 191 – 203, 2005.
- KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l], v. 1572, p. 187-197, 2002.
- KIM, J.; RYU, C.; HA, J.; LEE, J.; KIM, D.; JI, M.; PARC, C.; LEE, J.; KIM, D.; KIM, H. Structural and quantitative characterization of mucin-type O-glycans and the identification of Oglycosylation sites in bovine submaxillary mucin. **Biomolecules**, [s.l] v. 10, n. 4, p. 10–11, 2020.
- KOHN, T.; WIEGAND, S.; BOEDEKER, C.; RAST,P.; HEUER,A.; JETTEN, M.S.M.; SCHÜLER, M.; BECKER,S.; ROHDE,C.; MÜLLER, R.-W.; BRÜMMER, F.; ROHDE, M.; ENGELHARDT, H.; JOGLER, M.; JOGLER,C. *Planctopirus ephydatiae*, a novel Planctomycete isolated from a freshwater sponge, **Systematic and Applied Microbiology**, [s.l], v. 43, n. 1, 2020.
- LACERDA, R.B. Alcalóides marinhos bromopirrólicos. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, v.7, n. 2, p.713 – 729, 2014. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v7n2a12.pdf>Acesso em: 02 Ago. 2021.
- LECHARTIER, B.; HARTKOONR, R. C.; COLE, S. T. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l], v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012.
- 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.
- LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, [s.l], v. 49, n. D1, p. D458-D460, 2021.
- LEVI, G.; TEICHBERG, V. I. Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l] v. 256, n. 11, p. 5735–5740, 1981.
- LODE, H. M. Rational antibiotic therapy and the position of ampicillin/sulbactam.

International Journal of Antimicrobial Agents, [s.l], v. 32, n. 1, p. 10–28, 2008.

MARQUES, D. N.; ALMEIDA, A.; SOUSA, A.; PEREIRA, R.; ANDRADE, A.; CHAVES, R.; CARNEIRO, R.; VASCONCELOS, M.; NASCIMENTO-NETO, L.; PINHEIRO, U.; VIDEIRA, P.; TEIXEIRA, E.; NAGANO, C.; SAMPAIO, A. 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.

MARQUES, JULIANA SAMPAIO NOGUEIRA. **Purificação, caracterização físico – química e estrutural de uma lectina da esponja marinha *Cinachyrella alloclada***. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2021.

MARUSZEWSKA-CHERUIYOT, M.; STEAR, M.; DONSKOW-ŁYSONIEWSKA, K. Galectins - Important players of the immune response to CNS parasitic infection. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, [s.l], v. 13, p. 100221, 2021.

MCMURRAY, S.E.; BLUM, J.E.; PAWLIK J.R. Redwood of the reef: growth and age of the giant barrel sponge *Xestospongia muta* in the Florida Keys. **Mar Biol**, [s.l], v.155, p.159–171, 2008.

MEHBUB, M.F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, [s.l], v. 12, p. 4539–4577, 2014.

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

MÜLLER, W. E. G.; MÜLLER, I. M. Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. In: *Sponges (Porifera)*. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 1-33, 2003.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; CABRA, M. G.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, Z.; ARRUDA, F.V.S.; NAGANO, C.S.; FERNANDES, A.R.; SAMPAIO, A.H.; TEIXEIRA, E.H.; VIDEIRA, P.A. Halilectin-3, a lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*, induces apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF7 cells through Caspase-9 pathway and LC3-II protein expression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 18, n. 4, p. 521-528, 2018.

LEHNINGER; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6.ed. São Paulo: Sarver, p.269. 2014.

LORIAN, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. New Yourk. Williams & Willkins. 851p, 2005.

NIGAM, M.; SULERIA, H.A.R.; FARZAEI, M.H.; MISHRA, A.P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l], v. 27, p. 491-515, 2019.

- NONAKA, Y.; OGAWA, T.; SHOJI, H.; NISHI, N.; KAMITORI, S.; NAKAMURA, T.; WANG-DONG XU, W.D; HUANG, Q.; HUANG, A.-F. Emerging role of galectin family in inflammatory autoimmune diseases, **Autoimmunity Reviews**, [s.l], v. 20, n. 7, 2021.
- OGAWA, T., WATANABE, M., NAGANUMA, T.; MURAMOTO, K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. **Journal of Amino Acids**, [s.l], 2011.
- PACE, K. E.; HAHN, H. P.; BAUM, L. G. Preparation of recombinant human Galectin-1 and use in T-cell death assays. **Methods in Enzymology**, [s.l], v. 363, n. 2001, p. 499–518, 2003.
- PANGGABEAN, J.A.; ADIGUNA, S.P.; MURNIASIH, T.; RAHMAWATI, S.; BAYU, A.; PUTRA, M.Y. Structure-activity relationship of cytotoxic natural products from Indonesian marine sponges. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v. 7, p. 1-27, 2022.
- PAIVA, P.M.G; F.S. GOMES, F.S; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants A. Mendez-Villas (Ed.), **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology**, [s.l], p. 396-406, 2010.
- PFEIFER, K.; HAASEMANN, M.; GAMULIN, V.; BRETTING, H.; FAHRENHOLZ, F.; MÜLLER, W.E.G. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. **Glycobiology**, [s.l], v.3, p.179–184, 1993.
- PINHEIRO, U.S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M.R. *Aplysina* Nardo (Porifera, *Verongida*, *Aplysinidae*) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, [s.l], v.1609, n.1-5, p. 33-35, 2007.
- PUYANA, M.; PAWLIK, J.; BLUM, J.; FENICAL, W. Metabolite variability in Caribbean sponges of the genus *Aplysina*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v.25, n. 6, p. 592-599, 2015.
- RABELO, L.; MONTEIRO, N.; SERQUIZ, R.; SANTOS, P.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, A.; ROCHA, H.; MORAIS, A. H.; UCHOA, A.; SANTOS, E. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. **Marine Drugs**, [s.l], v. 10, p. 727-743, 2012.
- RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue antigens**, [s.l], v.64, n.1, p.1–12. 2004.
- 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.
- SANTOS, V. F.; ARAUJO, A.; SILVA, A.; ALMEIDA, D.; FREITAS, P.; SANTOS, A.; ROCHA, B.; GARCIA, W.; LEME, A.; BONDAN, E.; BORGES, F.; CUTRIM, B.; SILVA, L.; COUTINHO, H.; TEIXEIRA, C. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l] v. 146, p. 841–852, 2020.

SARÀ, M. Sponge. **Encyclopedia Britannica**, Disponível em:

<https://www.britannica.com/animal/sponge-animal> . Acesso em: 13 Jul. 2021.

SCHRÖDER, H.C.; BOREIKO, A.; KORZHEV, M.; TAHIR, M.N.; TREMEL, W.; ECKERT, C.; USHIJIMA, H.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l], v. 281, p.12001–12009, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell – agglutination and sugar – specific proteins. **Science**, Washington, DC, v.177, p. 949 – 959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. 2nd ed. **Kluwer Academic Publishers**, [s.l] p. 454, 2003.

SHARON, 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.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s.l], v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.

SIGWART JD, BLASIAK R, JASPARS M, JOUFFRAY JB, TASDEMIR D. Unlocking the potential of marine biodiscovery. **Natural Product Reports**, [s.l], v. 38, n. 7, p. 1235-1242, 2021.

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

SISBR. **Catalogo Taxonomico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020**.

Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/196269#classification> Acesso em: 09 jul. 2021.

SONG I.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], 5p.1-7, 2007.

SOUSA, Andressa Rocha de Oliveira Sousa. **Caracterização estrutural da lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis***. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2021.

SOUSA, A. R. DE O. *et al.* Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l], v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, [s.l] p. 175-179, 2000.

STOWELL, S. R.; ARTHUR, C.; CUMMINGS, R.; FAESLEY, C. Alkylation of galectin-1 with iodoacetamide and mass spectrometric mapping of the sites of incorporation. **Methods in Molecular Biology**, [s.l], v. 1207, p. 51–62, 2015.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s.l], v. 67, n. 3, p. 419–431, 2010.

TRAUTMAN, D.A.; HINDE, R. Sponge/algal symbioses: A Diversity of Associations. Seckbach J. (eds) *Symbiosis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Springer, [s.l], v.4, 2001

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E.J.M. 130 years of Plant Lectin research. **Glycoconjugate Journal**, [s.l], v.37, p. 533–551, 2020.

UEDA, T.; NAKAMURA, Y.; SMITH, C.; COPITS, B.; INOUE, A.; OJIMA, T.; MATSUNAGA, S.; SWANSON, G.; SAKAI, R. 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.

VAN SOEST, R.W.M., BOURY-ESNAULT N., VACELET J., DOHRMANN M., ERPENBECK D., *et al.* **Global Diversity of Sponges (Porifera)** **Global Diversity of Sponges (Porifera)**, 2012.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; SILVA, H. C.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E. H.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **Biomed Res Int**, [s.l], 2014.

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. **Animal Lectins**, [s.l] n. July 2017, p. 2–10, 2008.

VASTA, G. R. **Lectins as Innate Immune Recognition Factors: Structural, Functional, and Evolutionary Aspects**. Elsevier Inc., 2016.

VIANA, L. A. A. PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE UMA LECTINA DA ESPONJA MARINHA *APLYSINA CAULIFORMIS*, 2021. Dissertação (mestrado em biotecnologia de recursos naturais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

WAGNER-HÜLSMANN, C.; BACHINSKI, N.; DIEHL-SEIFERT, B.; BLUMBACH, B.; STEFFEN, R.; PANCER, Z.; MÜLLER, W.E.G. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. **Glycobiology**, [s.l], v. 6, n. 8, p. 785-793, 1996.

WANG, W.-H.; LIN, C.-Y.; CHANG, M.R.; URBINA, A.U.; ASSAVALAPSAKUL, W.; THITITHANYANONT, A.; CHEN, Y.-H.; LIU, F.-T.; WANG, S.-F. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review, **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [s.l], v. 53, n. 6, 2020.

WIENS, M.; MANGONI, A.; D'ESPOSITO, M.; FATTORUSSO, E.; KORCHAGINA, N.; SCHRÖDER, H.C.; GREBENJUK, V.A.; KRASKO, A.; BATEL, R.; MÜLLER, I.M.; MULLER, W.E.G. The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: Extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges. **Journal of Molecular Evolution**, [s.l], v. 57, p. 60–75, 2003.

XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l], v. 143, n. 1, p. 9-16, 2006.

XU, H.; LIU, H.; LIU, C.; SHANGGUAN, X.; CHENG, X.; ZHANG, R.; LU, Y.; LI, P.; CAI, Y. Molecular characterization and antibacterial ability of galectin-3 and galectin-9 in *Onychostoma macrolepis*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l], v. 128, n. September 2021, p. 104333, 2021.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, [s.l], v. 29, n. 20, p. 2588-2595, 2013.

ZHANG, L.; BERA, H.; WANG, H.; WANG, J.; GUO, Y.; SHIL,C.; CUN,D.; MOUSER, C; HOIBY,N.; YANG,M. Combination and nanotechnology based pharmaceutical strategies for combating respiratory bacterial biofilm infections. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l], v. 616, n. 103, p. 121507, 2022.

ZHENG, W.; ZHANG, C.; BELL, E. W.; ZHANG, Y. I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE, **Future Generation Computer Systems**, [s.l], v. 99, 2019.