



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

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

FORTALEZA

2023

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

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

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas do Centro de
Ciências da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O47c Oliveira Neto, José Eduardo de.
Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* / José Eduardo de Oliveira Neto. – 2023.
54 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.
1. Esponjas marinhas. 2. Lectinas. 3. Caracterização estrutural. 4. Antibacteriano. 5. Sinergismo. I. Título.
CDD 570
-

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

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

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas do Centro de
Ciências da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

Aprovada em 11/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Msc. Renato César Farias Torres
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, em especial a minha mãe Socorro, ao meu pai Manoel e a minha tia Neuda por todo o suporte, carinho, amor e apoio em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, sou grato pela oportunidade de trabalhar e desenvolver meu projeto no Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar), além dos ensinamentos, conselhos e a sua disponibilidade para ajudar nos momentos necessários.

Aos participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio e Msc. Renato César Farias Torres, agradeço pela prontidão e gentileza em aceitar participar da banca e poder contribuir para o trabalho.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves, técnica do laboratório, por toda a ajuda desde o início da iniciação científica até o processo seletivo de pós-graduação no qual fui aprovado.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pela oportunidade de atuar no laboratório e aos ensinamentos durante a minha estadia no BioMar.

A toda a equipe do BioMar e do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), por me ajudarem, diretamente ou indiretamente, em vários momentos do meu trabalho. Muito obrigado.

À Jessica Duarte, por toda a sua paciência, orientação, ajuda e calma durante meus primeiros meses como aluno de iniciação científica. Mesmo depois do período inicial de provação e agindo como um “independente”, seus ensinamentos são muito valiosos e sou agradecido pelo que aprendi e aprendo com ela. Em outras palavras, tenho a sorte de tê-la como “mãe de laboratório”. Meu mais sincero obrigado.

Aos meus grandes amigos do laboratório, Philippe, Levi, João Marcelo e Israel, por todas as risadas, pelos momentos de descontração, pela camaradagem, pela amizade e também pelas trocas de conhecimentos. Obrigado por tudo, rapazes.

Aos meus nobres amigos que a Biologia me deu a chance de conhecer, Victor Braz, Marcos Victor, Eduardo Melo e Matheus Mordecai. Obrigado por “sobreviverem” junto comigo a graduação. Obrigados por todos os momentos leves, pelas brincadeiras, pelos

conselhos e pelas histórias que passamos as quais poderemos relembrar quando “estivermos mais velhos”. Agradeço bastante pela amizade e companheirismo de vocês.

Aos amigos que fiz pela Universidade e pelas bancadas do laboratório, Giovanna, Eva, Maurisso, Elany, Maurilio, Eduarda e Lisa, por todo carinho, apoio e diversão que vocês proporcionaram ao longo dessa jornada.

Ao meu amigo de longa data, Roger. Obrigado por mais de uma década de amizade, irmandade e a sabedoria repassada durante a construção desse trabalho. Apesar de você dizer que se inspira em mim, o contrário é o mais próximo da verdade.

A todos os professores e aos demais funcionários da Universidade que tive a chance de conversar, escutar e conhecer. Por menor que tenha sido o contato, de uma maneira ou de outra, contribuiu para minha formação como um acadêmico e para o amadurecimento como ser humano e indivíduo.

Um homem sábio deve sempre seguir os cursos trilhados por grandes homens e imitar aqueles que foram supremos, para que, se sua capacidade não se igualar à deles, pelo menos tire do que é passado. (MAQUIAVEL, 1532, p. 39)

RESUMO

As esponjas são animais pertencentes ao filo Porifera e estão entre os organismos com organização celular mais simples dentre os metazoários. Lectinas são proteínas e glicoproteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos sem alterar a estrutura dos mesmos, e são identificadas nos mais variados táxons. Em esponjas marinhas, as lectinas podem desempenhar uma diversidade de funções, como interação celular, espiculogênese e defesa. Ademais, algumas dessas proteínas demonstram elevado potencial biotecnológico devido a sua interação com carboidratos e a capacidade de reconhecer carboidratos específicos da membrana plasmática bacteriana. A determinação da sequência de aminoácidos dessas proteínas é essencial para compreender melhor suas funções, como também avaliar fatores evolutivos e filogenéticos entre as espécies. Diante disso, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização estrutural da lectina oriunda da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL) e avaliar o efeito antibacteriano da lectina em associação com antibióticos, frente a cepas de bactérias patogênicas. A AFL foi purificada através de cromatografia de afinidade em condições redutoras. A estrutura primária foi analisada por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). AFL é uma proteína que na presença de agente redutor forma um tetrâmero de 64 kDa e na ausência de agente redutor forma um trímero de 44 kDa. A massa molecular média obtida por espectrometria de massas resultou em um dímero de 31.673 Da. Os peptídeos obtidos após digestão trípica foram determinados por espectrometria de massas (MS/MS) e a soma dos aminoácidos representam 87% da massa intacta obtida por espectrometria de massas. A sequência parcial de aminoácidos da lectina foi submetida ao programa *Smart* e a ferramenta indicou um domínio de galectina para AFL. Além disso, AFL potencializou o efeito dos antibióticos ampicilina e tetraciclina frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

Palavras-chave: esponjas marinhas; lectinas; caracterização estrutural; antibacteriano; sinergismo.

ABSTRACT

Sponges are animals belonging to the phylum Porifera and are among the organisms with the simplest cellular organization among the metazoans. Lectins are proteins and glycoproteins that bind reversibly to carbohydrates without altering their structure, and are identified in many different taxa. In marine sponges, lectins can perform a variety of functions, such as cell interaction, spiculogenesis and defense. In addition, some of these proteins show high biotechnological potential due to their interaction with carbohydrates and the ability to recognize specific carbohydrates from the bacterial plasma membrane. The determination of the amino acid sequence of these proteins is essential to better understand their functions, as well as to evaluate evolutionary and phylogenetic factors among species. Therefore, the present work aimed to perform the structural characterization of the lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) and to evaluate the antibacterial effect of the lectin in association with antibiotics, against strains of pathogenic bacteria. AFL was purified by affinity chromatography under reducing conditions. The primary structure was analyzed by sequential mass spectrometry (MS/MS). AFL is a protein that in the presence of reducing agent forms a 64 kDa tetramer and in the absence of reducing agent forms a 44 kDa trimer. The average molecular mass obtained by mass spectrometry resulted in a dimer of 31,673 Da. The peptides obtained after tryptic digestion were determined by mass spectrometry (MS/MS) and the sum of the amino acids represent 87% of the intact mass obtained by mass spectrometry. The partial amino acid sequence of the lectin was submitted to the Smart program and the tool indicated a galectin domain for AFL. In addition, AFL potentiated the effect of ampicillin and tetracycline antibiotics against *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Escherichia coli* ATCC 11303.

Keywords: marine sponges; lectins; structural characterization; antibacterial; synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	16
Figura 2 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose TM – 4B	31
Figura 3 – Eletroforese em gel 12% de poliacrilamida da AFL	35
Figura 4 – Cromatografia de exclusão molecular de AFL	36
Figura 5 – Determinação da massa molecular de AFL por ESI-MS	38
Figura 6 – Mapa peptídico da lectina AFL	40
Figura 7 – Alinhamento de AFL com proteínas similares identificadas no <i>software</i> <i>BLASTp</i>	41
Figura 8 – Alinhamento de AFL com galectinas de esponjas marinhas	42
Figura 9 – Alinhamento do DRC de AFL com galectinas de esponjas marinhas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sumário de purificação da AFL	33
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante	34
Tabela 3 – Sequência de peptídeos utilizados para obtenção da estrutura primária de AFL ...	39
Tabela 4 – Efeito da lectina AFL combinada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Esponjas	14
1.1.1	<i>Classe Demospongiae</i>	15
1.1.2	<i>Família Aplysinidae</i>	16
1.2.	Lectinas	17
1.2.1	<i>Lectinas de animais</i>	18
1.2.2	<i>Lectinas de esponjas marinhas</i>	20
1.2.3	<i>Lectinas de Aplysina</i>	21
1.2.4	<i>Lectinas de Aplysina fulva</i>	22
2	OBJETIVO	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Coleta da esponja	25
3.2	Purificação da lectina	25
3.3	Atividade hemaglutinante	26
3.4	Estimativa da massa molecular	26
3.5	Determinação da massa molecular	27
3.6	Determinação da estrutura primária por ESI-MS	27
3.6.1	<i>Digestão da lectina com tripsina em gel</i>	27
3.6.2	<i>Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão</i>	28
3.6.3	<i>Análise dos dados</i>	28
3.6.4	<i>Análise da sequência de aminoácidos</i>	28
3.7	Atividade antibacteriana	29
3.7.1	<i>Microrganismos</i>	29

3.7.2	<i>Atividade da lectina com antibióticos</i>	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Purificação da lectina	31
4.2	Atividade hemaglutinante	34
4.3	Estimativa e determinação da massa molecular	35
4.4	Determinação da sequência de aminoácidos por ESI-MS	38
4.5	Domínio conservado	40
4.6	Atividade antibacteriana da lectina com antibióticos	44
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

As esponjas são animais pertencentes ao filo Porifera (do latim *porus*, “poros”; e *ferre*, “possuir”) caracterizadas por apresentarem uma organização celular basal. Elas são organismos pluricelulares sésseis com elevados níveis de totipotência celular, sendo constituídas por elementos esqueléticos compostos de carbonato de cálcio, dióxido de silício (tipicamente na forma de espículas) e/ou fibras, além de possuírem cílios e flagelos nos tecidos somáticos (BRUSCA; MOORE; SHUSTER; 2019).

Como organismos sésseis, o ciclo de vida das esponjas é centrado na estratégia ativa de filtração de grandes volumes de água através do sistema aquífero e assim adquirir nutrientes oriundos do ecossistema aquático, realizar trocas gasosas, eliminar excretas e dispersas células reprodutivas. Os orifícios situados na superfície externa das esponjas são nomeados de óstios, sendo responsáveis pela entrada de água na cavidade central – a espongiocele. As células flageladas encontradas na espongiocele são denominadas coanócitos. Tais células bombeiam o fluxo de água pelo corpo do organismo e, eventualmente, para o exterior através do ósculo (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019; MASANGKAY *et al.*, 2022).

As aproximadamente 9.500 espécies de poríferos já descritas, com exceção de 220 espécies de água doce, são de ambiente marinho bentônico. As esponjas apresentam variação considerável em suas dimensões, além de possuírem inúmeras tonalidades brilhantes de lilás, azul, amarelo, carmesim e branco puro. Esses organismos mantêm relações simbióticas com organismos bacterianos heterotróficos e autotróficos, nas quais as quantidades de biomassa produzidas pelos simbioses são, por vezes, superiores às biomassas das próprias esponjas. Ou seja, é perceptível um forte mutualismo entre os organismos (BRUSCA; MOORE; SHUSTER; 2019).

As classes de Porifera foram historicamente definidas pela natureza dos seus esqueletos internos. Atualmente, há quatro classes reconhecidas: Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae e Homoscleromorpha. A classe Calcarea compreende as esponjas em que as espículas do esqueleto mineral são compostas exclusivamente por carbonato de cálcio, e todos os espécimes são de habitats marinhos. A classe Hexactinellida é composta pelas esponjas-de-vidro, cujo esqueleto é constituído por inúmeras espículas silicosas e apresentam simetria com

seis raios. São esponjas com o plano corpóreo similar a um formato de vaso ou tubo, são exclusivamente marinhas e mais encontradas em águas profundas. A classe Demospongiae inclui as esponjas com espículas silicosas e/ou um esqueleto orgânico ou cálcico sólido; podem ser encontradas em ambientes marinhos, de água doce ou salobra. Homoscleromorpha é a mais recente classe proposta e é considerada um agrupamento taxonômico monofilético baseado em estudos filogenéticos, anatômicos e embriológicos. O esqueleto de esponjina das homoscleromorfias sempre está ausente, e o esqueleto rígido, quando presente, é formado de espículas siliciosas de quatro raios conhecidas como *caltrop*s; são exclusivamente de ambiente marinho (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019; GAZAVE *et al.*, 2011).

O fato de as esponjas terem a mobilidade praticamente nula se torna um elemento decisivo no sucesso evolutivo do grupo. Logo, são produzidos compostos bioativos contra predadores, na competição por nutrientes e espaço, nas relações simbióticas, proteção contra radiação UV, infecções ocasionadas por patógenos e organismos incrustadores (EBEL *et al.*, 1997; ROHDE; SCHUPP, 2011; BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019). De acordo com Blunt *et al.* (2018), os poríferos se destacam como um dos táxons mais importantes e diversos em fontes de metabólitos bioativos com potencial para a produção de fármacos.

As esponjas providenciaram os primeiros produtos naturais marinhos com a descoberta do nucleosídeo esponjouridina na década de 1950, culminando no desenvolvimento do medicamento antiviral Ara-A (Vidarabina®) (SIGWART *et al.*, 2021). Nos últimos 50 anos, mais de 30.000 Produtos Naturais Marinhos (PNMs) com aplicações biotecnológicas foram descobertos e isolados, tanto em organismos procariontes como também em organismos eucariontes. Entre os invertebrados marinhos, os filos Porifera e Cnidaria lideram as porcentagens de compostos bioativos em termos de quantidade e diversidade estrutural (PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022). Segundo Hu *et al.* (2015), a parcela de produtos naturais marinhos extraídos de poríferos e cnidários resultava em 56.89% de todos os invertebrados marinhos.

1.1.2 Classe Demospongiae

As esponjas agrupadas na classe Demospongiae compreendem cerca de 95% de todas as espécies de poríferos. As espículas das demosponjas são silicosas e/ou um esqueleto

orgânico, e podem estar ligadas umas às outras por espongina. Todos os membros da classe são leuconóides e marinhos, exceto pelos membros de água doce da família Spongillidae (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2016). As demosponjas são bastante variadas em cores e formatos. Muitas espécies apresentam uma comunidade mesofílica de Eubacteria, principalmente Proteobacteria e bactérias Gram-positivas, bem como espécies de Archaea (BRUSCA; MOORE; SHUSTER; 2019).

1.1.3 Família Aplysinidae

A família Aplysinidae, pertencente à classe Demospongiae, é constituída por esponjas que possuem esqueleto formado apenas por fibras esponjosas pontilhadas e dispostas em malha geométrica tridimensional. O gênero *Aplysina* é notoriamente mais diverso no Oceano Atlântico do que nos oceanos Pacífico e Índico. Existem 16 espécies pertencentes ao gênero *Aplysina* que estão amplamente distribuídas na costa brasileira, podendo ser mais frequentemente encontrada no Atlântico Tropical Sudoeste (PINHEIRO; HAJDU; CUSTÓDIO, 2007; SIBBR, 2023).

A espécie *Aplysina fulva* (Figura 1) foi descrita por Pallas em 1776 e está taxonomicamente inserida na Classe *Demospongiae*, Subclasse *Verongimorpha*, Ordem *Verongiida*, Família *Aplysinidae*, Gênero *Aplysina* (SISBBR, 2023).

Figura 1 – Esponja marinha *Aplysina fulva*.



1.2 Lectinas

Lectinas foram primeiramente classificadas como proteínas encontradas unicamente em extratos de plantas com a propriedade de aglutinar eritrócitos e outros tipos de células. Logo, foram designadas de fitohemaglutininas ou fitoaglutininas (SHARON; LIS, 2007).

Um dos relatos mais antigo do processo de aglutinação em eritrócitos por essas proteínas é de Hermann Stillmark, em 1888, no qual se extraiu uma hemaglutinina tóxica da semente de mamona (*Ricinus communis*) denominada ricina. Em seguida, outra hemaglutinina tóxica, a abrina, foi identificada por H. Hellin em extrato da ervilha do rosário (*Abrus precatorius*). Eis que Paul Ehrlich, em 1891, utilizou a ricina e a abrina como modelos em estudos imunológicos. Esses modelos foram mais viáveis quando comparados às toxinas bacterianas utilizadas na época. Ehrlich fundamentou alguns princípios da imunologia por meio do estudo como a especificidade da resposta do anticorpo e a imunidade humoral transferida do leite materno para a prole (SHARON; LIS, 2007).

A primeira metodologia de isolamento de uma lectina, em 1919, pertence a James B. Sumner. Utilizando extratos do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), Sumner purificou, por meio da precipitação salina, a lectina nomeada de Concanavalina A (Con A). Em 1972, Edelman e colaboradores (1972) estabeleceram a sequência primária da Concanavalina A, sendo a primeira lectina sequenciada (SHARON; LIS, 2004).

A nomenclatura lectina (do latim *legere*, “escolher” ou “selecionar”) foi proposta após ser constatado que essas proteínas apresentaram especificidades distintas aos grupos sanguíneos e aos carboidratos. Esse termo suplantou as designações anteriores e é atualmente empregado para todas as proteínas aglutinantes celulares de origem não imune (BOYD; SHARPLEIGH, 1954; SHARON; LIS, 2007).

A definição de lectina permanece sendo alterada e uma das mais recentes as contempla como proteínas e glicoproteínas ubíquas, de origem não-imunológica, caracterizadas com pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidrato. A ligação proteína-carboidrato não abrange clivagens e alterações enzimáticas (AHMMED *et al.*, 2022; GARDÉRES *et al.*, 2015).

As pesquisas bioquímicas com lectinas receberam maior atenção pela comunidade científica a partir de 1960 com o trabalho de Peter C. Nowell, no qual houve a demonstração de estímulos mitogênicos em linfócitos tratados com a lectina PHA, extraídas de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960). A descoberta impactou o campo da imunologia, uma vez em que era dado como certo que os leucócitos não eram capazes de sofrer mitose ou diferenciação celular.

As lectinas, além do escopo de aglutinação de eritrócitos, também foram modelos de estudos para a investigação de carboidratos em membranas celulares; isolamento e caracterização de glicoproteínas; análise histoquímica de células e tecidos e a detecção de mudanças que ocorrem nas superfícies celulares durante mecanismos fisiológicos, patológicos e cancerígenos (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020; SHARON; LIS, 2007; SHATZ-AZOULAY *et al.*, 2020).

Os estudos de caracterização estrutural das proteínas fornecem a possibilidade de traçar uma similaridade entre as diferentes lectinas situadas nos mais diversos bancos de dados, como também avaliar o potencial biotecnológico. Logo, a análise das semelhanças nas sequências de aminoácidos é uma ferramenta efetiva como auxílio nos estudos taxonômicos e evolutivos das espécies, assim como na identificação de famílias de lectinas com base em características bioquímicas e estruturais compartilhadas (NELSON; COX, 2019).

1.2.1 Lectinas de animais

As lectinas de animais, apesar de terem sido descobertas como proteínas aglutinantes antes de sua designação propriamente como lectinas, são conhecidas há tanto tempo quantos as lectinas de vegetais. O pesquisador S. Mitchell, em 1860, detalhou o processo de aglutinação durante estudos com o veneno da serpente *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860). De acordo com Kilpatrick (2002), a pesquisa com *C. durissus* foi a primeira observação de atividade hemaglutinante com lectinas de animais, em detrimento ao pioneirismo à tese de Herman Stillmark com a descrição da ricina.

As lectinas em animais estão interligadas às funções fisiológicas de mediações célula-célula e interações célula-matriz extracelular, uma vez que os carboidratos estão praticamente onipresentes em todas células (VASTA; AHMED, 2008). Contudo, observa-se

além das ligações com carboidratos, outras estruturas de interação como via proteína-proteína, proteína-lípido ou proteína-ácido nucleico. Além disto, as lectinas, em geral, são consideradas as principais moléculas de reconhecimento no sistema imunológico, desempenhando defesa direta contra patógenos, tráfico de células, regulação imunológica e a prevenção da autoimunidade (KILPATRICK, 2002).

As lectinas de animais podem ser agrupadas em famílias de acordo com suas funções, as propriedades bioquímicas e físico-químicas compartilhadas, a conservação de sequências de aminoácidos nos Domínios de Reconhecimentos a Carboidratos (DRC) e no requerimento por cátions bivalentes ou ambientes redutores. Em 1988, Kurt Drickamer protagonizou a iniciativa de identificar similaridades nas sequências de estrutura primárias características entre os DRCs de lectinas animais, e assim classificá-las em lectinas do tipo C e lectinas do tipo S, pois necessitam de cálcio e grupo tiol, respectivamente, para exibir a sua atividade lectínica (DRICKAMER, 1988).

A classificação das lectinas animais pode ser agrupada em cinco principais categorias. A primeira categoria é caracterizada por ser uma superfamília de proteínas dependentes de Ca^{2+} ou lectinas do tipo-C. Entretanto, esse grupo é atualmente composto por lectinas que contêm o domínio CTLD (*C-type lectin like domain*). A segunda categoria é constituída por galectinas, anteriormente denominadas de lectinas do tipo S. A terceira categoria é composta pelos receptores de manose-6-fosfato conhecidos como tipo P. A quarta categoria é constituída por SigLecs (*sialic acid-binding-type lectins*) e outras lectinas do tipo imunoglobulina ligantes de ácido siálico (tipo I). A quinta categoria é composta por lectinas animais relacionadas às lectinas de leguminosas vegetais (tipo L) (TAYLOR *et al.*, 2022; VASTA; AHMED, 2008).

As galectinas são uma família de lectinas que se ligam a β -galactosídeos e apresentam uma similaridade significativa em sua sequência de aminoácidos com uma identidade moderadamente alta. Além disso, os resíduos de aminoácidos que desempenham o papel na interação com carboidratos são altamente conservados. As galectinas são sintetizadas no citoplasma, encontradas tanto no ambiente intra como no extracelular e secretadas de forma não convencional, pois não possuem peptídeo sinal (VASTA, 2016; WANG, 2020; BERTUZZI *et al.*, 2020).

Os resíduos de cisteína presentes nessas proteínas estão normalmente livres, sem ligações dissulfetos intramoleculares. O desempenho da função biológica das galectinas está

interligada à presença de tióis livres. 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, glutathiona reduzida ou L-cisteína (GO, Y.; JONES, D.P., 2013; STOWELL *et al.*, 2015).

1.2.2 Lectinas de esponjas marinhas

As lectinas estudadas pela primeira vez em esponjas marinhas foram descritas por Dodd e colaboradores em 1968. Foi observado na ocasião que os extratos de duas espécies de esponjas, *Cliona celata* e *Axinella* sp., apresentaram atividade hemaglutinante (DODD; MACLENNAN; HAWKINS, 1968).

Uma miríade de funções desempenhadas pelas lectinas de esponjas marinhas com aplicações biotecnológicas pode ser exemplificada. A CvL, uma lectina extraída da esponja marinha *Cliona varians*, exibiu atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas patogênicas e aglutinação em formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, uma ferramenta útil na compreensão dos ciclos de vida dos inúmeros parasitas (MOURA *et al.*, 2006).

A lectina HOL-18 isolada da *Halichondria okadai* demonstrou atividade antimicrobiana e efeito citotóxico de maneira dose-dependente em cultura de células cancerígenas (HASAN; OZEKI, 2019). A CCL, lectina isolada de *Chondrilla caribensis*, aglutinou cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, e foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme bacteriano (MARQUES *et al.*, 2018).

A lectina extraída da esponja marinha *Haliclona caerulea* (H3) induziu a apoptose de células cancerígenas (MCF7) causadoras de câncer de mama em humanos (CARNEIRO *et al.*, 2013; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018).

Baseando-se no potencial biotecnológico já relatado de lectinas de esponjas marinhas e, assim como, a quantidade de pesquisas insuficientes acerca de suas estruturas primárias, fica evidenciado a necessidade de mais estudos em torno dessas biomoléculas.

1.2.3 Lectinas de *Aplysina*

Acerca de lectinas de espécies do gênero *Aplysina*, há cinco espécies em que as proteínas foram purificadas e isoladas até o presente momento. As espécies são: *A. archeri*, *A. lacunosa*, *A. lactuca*, *A. fulva*, *A. fistularis* e *A. cauliformis* (MARIONS; FRESNO, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2019; VIANA, 2021; ANDRADE, 2022).

As lectinas identificadas em *Aplysina archeri lectin* (AAL) e a *A. lacunosa lectin* (AIL) foram isoladas através de combinação de cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Ambas demonstraram afinidade por resíduos de galactosídeos não redutores. Por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE, a massa molecular das duas proteínas foi estimada em 16 kDa, tanto na presença como na ausência de agentes redutores, e sua forma homotetramérica foi relacionada ao estado nativo com massa molecular de 63 kDa (MARIONS; FRESNO, 2000).

A *Aplysina lactuca lectin* (ALL) foi isolada por meio de precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de afinidade em matriz de goma guar. ALL mostrou atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho e humanos (A, B e O), tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. A inibição da atividade hemaglutinante foi efetivada por α -lactose, lactulose e pela glicoproteína mucina estomacal suína. A lectina mostrou massa molecular média de 31.810 ± 2 Da. ALL causou redução significativa de biofilmes bacterianos e reduziu o número de células viáveis das bactérias avaliadas (*S. aureus* e *E. coli*) em todas as concentrações testadas (CARNEIRO *et al.*, 2017). Posteriormente, foi verificado que ALL possui sequências de aminoácidos contendo resíduos conservados típicos da família das galectinas. ALL também é uma proteína com potencial antibacteriano, quando em associação com a ampicilina a lectina potencializou seu efeito antibiótico (DUARTE, 2022).

A *Aplysina cauliformis lectin* (ACL) foi purificada por meio de combinação de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão molecular. Em eletroforese em gel de SDS-PAGE, ACL apresentou uma banda de aproximadamente 66 kDa em condições não redutoras e duas bandas de aproximadamente 35 kDa em condições redutoras. Por cromatografia de exclusão molecular foi possível detectar e separar duas lectinas, ACL-1 e ACL-2 com massas nativas de 145 kDa e 120 kDa, respectivamente. Além disso, ACL foi capaz de aglutinar bactérias *E. coli* (VIANA, 2021).

A *Aplysina fistularis lectin* (AfiL) foi purificada em matriz de Sepharose™ e demonstrou inibição da atividade hemaglutinante por derivados de galactose com ligação do tipo Galβ1→4 e PSM. A lectina mostrou-se ativa em pH alcalino, resistente a temperaturas de até 80°C, massa estimada de 224 kDa na conformação nativa, e apresentou estrutura secundária predominante de conformação β e estruturas desordenadas. AfiL inibiu a formação do biofilme de cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e causou também efeito bacteriostático em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e tetraciclina (ANDRADE, 2022).

1.2.4 Lectina de *Aplysina fulva*

A *Aplysina fulva lectin* (AFL) foi purificada através de cromatografia de afinidade em matriz Sepharose™. A atividade hemaglutinante foi apresentada em todos os eritrócitos de coelho e humano (A, B, O), e independe da presença de íons divalentes. A inibição da atividade hemaglutinante da AFL foi protagonizada pelos seguintes carboidratos: galactose, L-ramnose, lactose e lactulose. Além dos carboidratos citados, a mucina do estômago suíno foi um efetivo agente inibidor (CARNEIRO *et al.*, 2019).

A análise por espectrometria de massa demonstrou que a massa média da lectina é de $31,652 \pm 5$ Da. Os quinze primeiros resíduos de aminoácidos de AFL foram determinadas, e não se constatou nenhuma similaridade estrutural com qualquer proteína conhecida. A estrutura secundária de AFL é majoritariamente constituída por folhas-β estáveis em diferentes gradientes de temperatura e pH (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Ainda de acordo com Carneiro *et al.* (2019), AFL não foi capaz de inibir o crescimento planctônico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Contudo, a lectina reduziu a biomassa do biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*.

Acerca de outros trabalhos sobre AFL, foram relatadas atividades biológicas diferentes das mencionadas por Carneiro e colaboradores (2019). De acordo com Filho (2014), AFL foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*, e mostrou-se hábil em aglutinar formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* através do reconhecimento de galactose em sua superfície. A lectina AFL também apresentou atividade mitogênica para monócitos e linfócitos, e atividade imunomoduladora

através da produção de IFN- γ e da diferenciação de células T para uma resposta imune celular do tipo Th1 (SANTOS, 2015).

Embora o potencial biotecnológico de AFL tenha sido destacado na literatura científica por meio desses trabalhos, pouco foi explorado sobre a caracterização de sua estrutura primária. Portanto, fica claro a necessidade de estudá-la estruturalmente com o intuito de melhor esclarecer suas propriedades bioquímicas e atividades biológicas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Purificar a lectina de *Aplysina fulva* em condições redutoras, determinar sua estrutura primária e avaliar seu potencial antimicrobiano em associação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina frente a cepas bacterianas patogênicas.

2.2 Objetivos específicos

- Purificação da lectina AFL – *Aplysina fulva lectin* – em condições redutoras.
- Avaliar a atividade hemaglutinante de AFL com eritrócitos humanos, sob condições redutoras.
- Estimar a massa molecular nativa de AFL em diferentes condições.
- Determinar a estrutura primária de AFL através da sobreposição de peptídeos obtidos e determinar a massa molecular média da lectina por espectrometria de massas (*MS/MS*).
- Avaliar o potencial antibacteriano da lectina em associação aos antibióticos comerciais ampicilina e tetraciclina.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta da esponja

Espécimes de *Aplysina fulva* foram coletadas através de mergulho autônomo no Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio, Fortaleza, Ceará. A coleta e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados e regulados pelos órgãos competentes (SISBIO ID: 33913-8 e SISGEN ID:A1792FE).

3.2 Purificação da lectina

A lectina presente no extrato da esponja marinha *A. fulva* foi obtida seguindo o protocolo previamente estabelecido por Carneiro e colaboradores (2019), com modificações. As esponjas foram pesadas, cortadas em pedaços pequenos, maceradas e homogeneizadas em tampão TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM) com adição de L-cisteína (Cys) 5 mM, 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 x g, por 20 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 x g, 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 SepharoseTM 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 5 mM. As frações eluídas foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizada.

3.3 Atividade hemaglutinante

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

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em condições redutoras (adição de cisteína) e condições não-redutoras, segundo o método estabelecido por Sampaio e colaboradores (1998). Nessa metodologia, 50 μ L de TBS foram adicionados em poços de placas de microtitulação de fundo V, seguidos de 50 μ L da amostra a ser analisada. Com a adição da amostra, foi realizado a diluição seriada em cada fileira de poços e, por fim, foram adicionados 50 μ L 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.

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

3.4 Estimativa da massa molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foi conduzida com o objetivo de estimar a massa molecular aparente, assim como avaliar a homogeneidade da lectina purificada. A lectina purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a massa molecular média da lectina foi estimada por comparação com a massa molecular conhecidas de proteínas (lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa) e corada com Coomassie Brilliant Blue.

Para a estimativa da massa molecular da lectina, a proteína foi solubilizada em tampão TBS/Cys ou TBS e submetida à cromatografia de exclusão molecular em condições redutoras e não redutoras, respectivamente. Ambas as amostras foram centrifugadas e aplicadas

em uma coluna BEH SEC guard Column 200 Å 2,5 µm (4,6 mm x 30 mm) acoplada a sistema Acquity UPLC 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 massa molecular

A massa molecular média de AFL foi determinada por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.), através de Ionização por Nano Eletrospray (nESI). As soluções proteicas (10 pmol µL⁻¹) em 50% de acetonitrila (ACN), contendo de 0,1% ácido fórmico foram diretamente infundidas no espectrômetro com um fluxo de 1 µL min⁻¹ e os dados foram adquiridos com o auxílio do software Mass Lynx 4.1.

3.6 Determinação da estrutura primária por espectrometria de massas (MS/MS)

3.6.1. Digestão da lectina em gel com tripsina

As bandas obtidas da eletroforese foram excisadas em cubos (1 mm x 1 mm) e descoradas com a adição de 1 mL de acetonitrila 100% e 100 µL de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo acetonitrila 50%. Em seguida, as amostras foram reduzidas com a adição de uma solução de 50 µL de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo ditioneitol 10 mM (DTT) e alquiladas com a adição de uma solução de 50 µL de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo iodacetamida (IAA). A digestão da proteína ocorreu com a adição de 10 µL de tripsina (Promega), diluídas em 50 mM bicarbonato de amônio na proporção 1:50 p/p

(enzima/substrato). Todas as digestões foram realizadas a 37°C por 16 horas seguindo o protocolo estabelecido por Shevchenko *et al.* (2007).

3.6.2 Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão

Os peptídeos obtidos da digestão em gel foram injetados numa 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 nanoelectrospray (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 interpretadas 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.

3.6.3 Análise dos dados

Os espectros adquiridos foram analisados pelos *softwares* MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corporation). Os espectros de fragmentação foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters).

3.6.4 Análise da sequência de aminoácidos

A similaridade e a identidade 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 *online* SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi usada

para determinar a arquitetura de domínio da lectina. O alinhamento das sequências foi realizado com o *software online* ESPript (<https://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

3.7 Atividade antibacteriana

3.7.1 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA; H IMEDIA, Índia) e incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após o crescimento no meio sólido, algumas colônias isoladas foram removidas, inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37 °C, por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação a 9000 x g, durante 10 minutos e 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 620 nm.

3.7.2 Atividade antibacteriana da lectina combinada a antibióticos

A avaliação do efeito de AFL combinada 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 Concentrações Inibitórias Mínimas (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 AFL com os antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra), contra todas as cepas bacterianas descritas no item 2.6.1. 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, $1/2 \times$ CIM, $1/4 \times$ CIM, $1/8 \times$ CIM e $1/16 \times$ CIM, e a lectina na concentração constante de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 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 $50 \mu\text{L}$ do antibiótico, $50 \mu\text{L}$ da lectina e $100 \mu\text{L}$ 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.

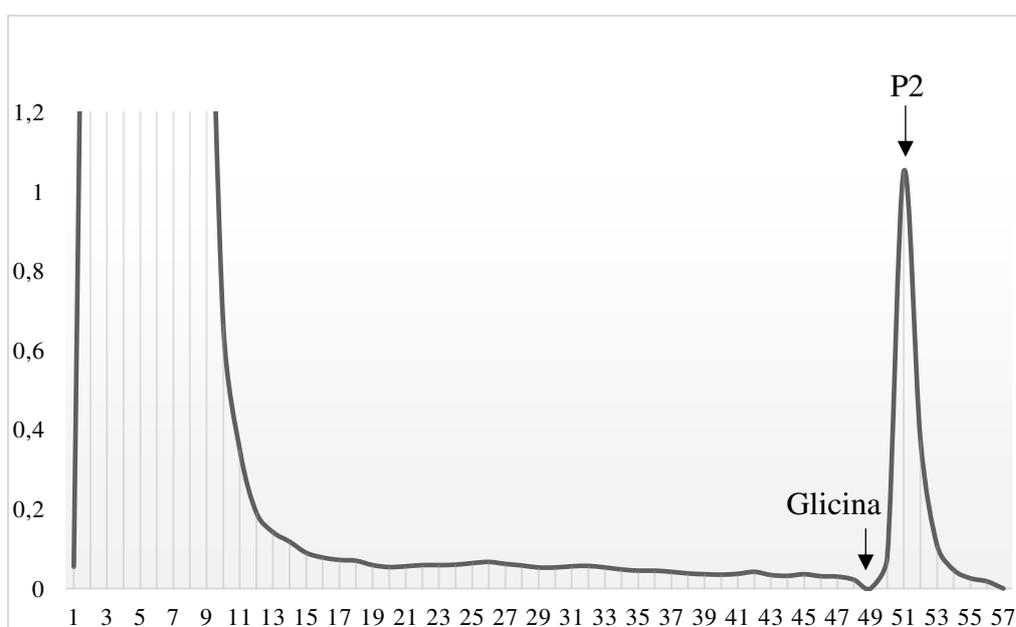
Com a montagem das placas concluída, as próprias foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas. Para a determinação da nova CIM em combinação, a D.O foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (Spectramax). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1 ou a $1/2$ foram interpretados como efeito aditivo; valores entre $1/4$ a $1/16$ foram considerados como efeito sinérgico e valores iguais a 2 ou a 4 foram considerados como efeito antagônico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina

AFL foi purificada a partir do extrato da esponja *A. fulva* seguindo o protocolo estabelecido por Carneiro *et al.* (2019), com modificações. O pico contendo atividade hemaglutinante foi eluído com Glicina 50 mM em pH 2,6, contendo NaCl 150 mM e L-cisteína (Cys) 5 mM (Figura 2).

Figura 2 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose™ – 4B



Fonte: O autor. Cromatografia de afinidade em coluna Sepharose™ - 4B equilibrada com Tris 50 mM, NaCl 150 mM, L-cisteína 5mM e pH 7,6. A coluna foi eluída com glicina 50 mM, NaCl 150 mM, Cisteína 5 mM e pH 2,6. No pico de absorbância designado de “P2”, referente à lectina, foram coletadas frações contendo 2 mL correspondentes aos tubos 51 ao 53. O fluxo foi mantido a 2 mL.min⁻¹.

A quantificação de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) revelou uma concentração no extrato bruto de 0,636 mg.mL⁻¹. No fracionamento com sulfato de amônio, a concentração de proteínas foi de 1,855 mg.mL⁻¹. Já para a fração coletada da

cromatografia de afinidade, a concentração de proteínas foi de $0,083 \text{ mg.mL}^{-1}$. Valores da concentração de proteínas e do título hemaglutinante estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sumário de purificação da AFL.

Fração	Volume (mL)	[Proteínas] (mg/mL)	Proteínas totais (mg)	Título (HU/mL)	Atividade hemaglutinante total (HU)	Atividade específica (HU/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato bruto	90	0,636	57,24	128	11.520	201,26	1	100
0-70	29	1,855	53,8	1024	29.440	552,02	2,7	256
AFL	8	0,083	0,664	512	4.096	6.168,67	30	36

Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos humanos tipo O.

Após a constatação de que a AFL pertence à família das galectinas (ver a frente), o processo de purificação de AFL foi modificado por meio da adição de L-cisteína ao tampão de extração. Algumas galectinas necessitam de resíduos de tióis livres para desempenhar sua função. A oxidação de resíduos de aminoácidos nas galectinas frequentemente reflete a formação das ligações dissulfeto, que pode inativar estas proteínas. A L-cisteína, um agente redutor, promove a formação de grupo sulfidrilas livres (SH), agindo de modo oposto aos agentes oxidantes. Logo, evita-se a formação de pontes dissulfeto intra e intermoleculares em proteínas (STOWELL *et al.*, 2015).

4.2 Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da AFL foi realizada com eritrócitos humanos do tipo O, em condições redutoras e não redutoras. As amostras coletadas da cromatografia de afinidade apresentaram 512 U.H.mL⁻¹ e 256 U.H.mL⁻¹, respectivamente, em ambiente redutor e em ambiente não redutor (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante.

Amostra	U. H. mL ⁻¹	U. H. mg ⁻¹
AFL + CYS	512	1024
AFL Oxi	256	512

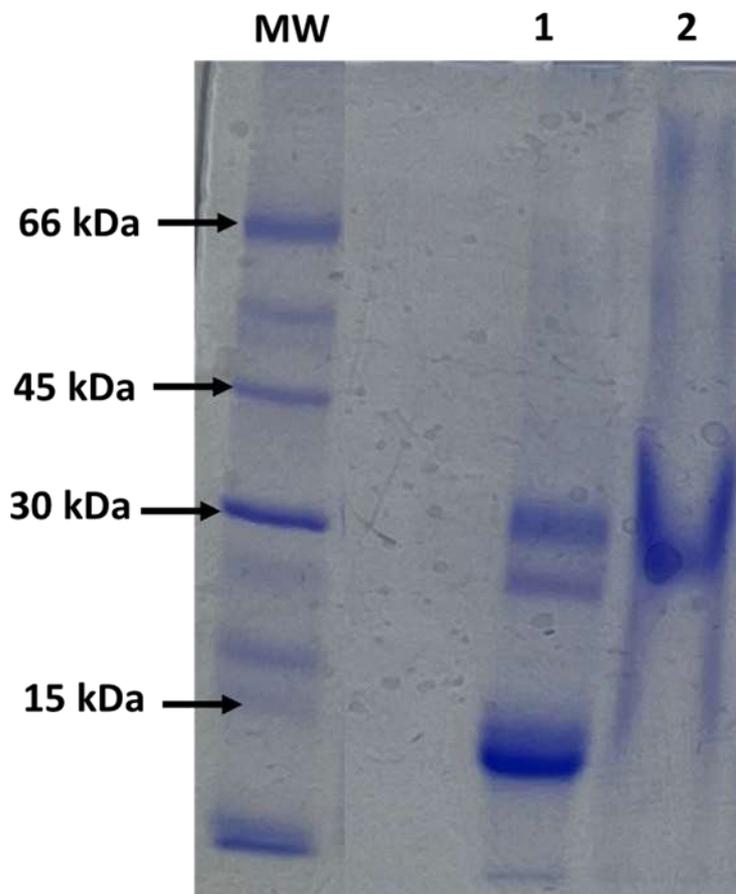
Fonte: O autor. A concentração da lectina é de 500 µg. mL⁻¹. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos humanos tipo O.

AFL apresentou atividade hemaglutinante em ambas as condições, contudo o título de hemaglutinação foi mais elevado na presença do agente redutor L-cisteína. Assim como no processo de purificação da AFL, também foi utilizado agente redutor no isolamento e na purificação da lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL) (DUARTE, 2022) e da lectina da esponja marinha *Cinachyrella alloclada* (CaLL) (MARQUES, 2021). Tanto em ALL como CaLL, a condição de ambiente redutor provou ser mais favorável para a atividade hemaglutinante otimizada.

4.3 Estimativa e determinação da massa molecular

A massa molecular estimada de AFL observada por SDS-PAGE 12% em condições não-redutoras foi de aproximadamente 30 kDa. Na presença de agentes redutores, a lectina apresentou massa molecular estimada de 15 kDa (Figura 3).

Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de AFL.



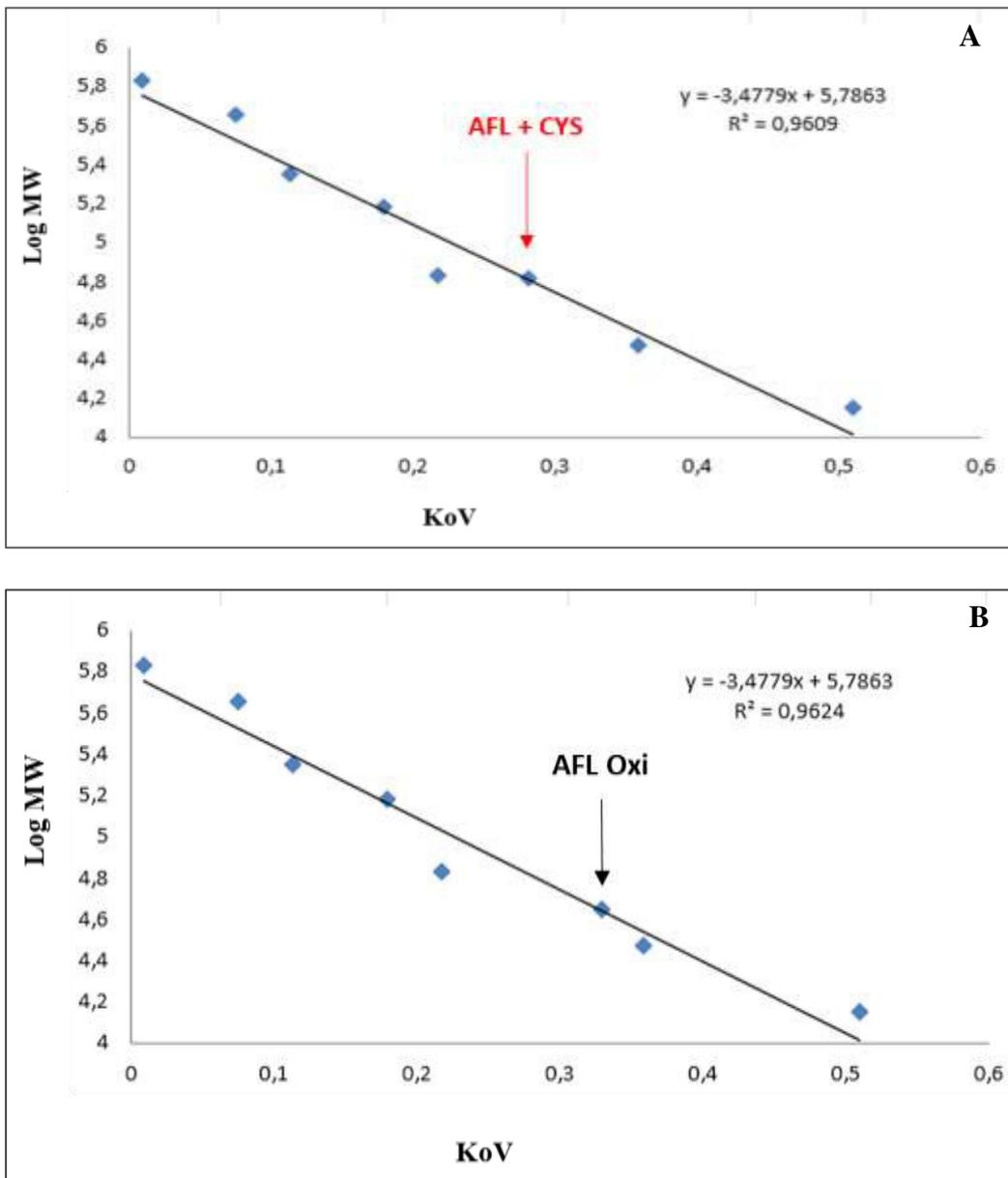
Fonte: O autor. **MW**: Marcador molecular: lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa. **1**: AFL com agente redutor β -mercaptoetanol (28 μ g). **2**: AFL sem agente redutor (28 μ g).

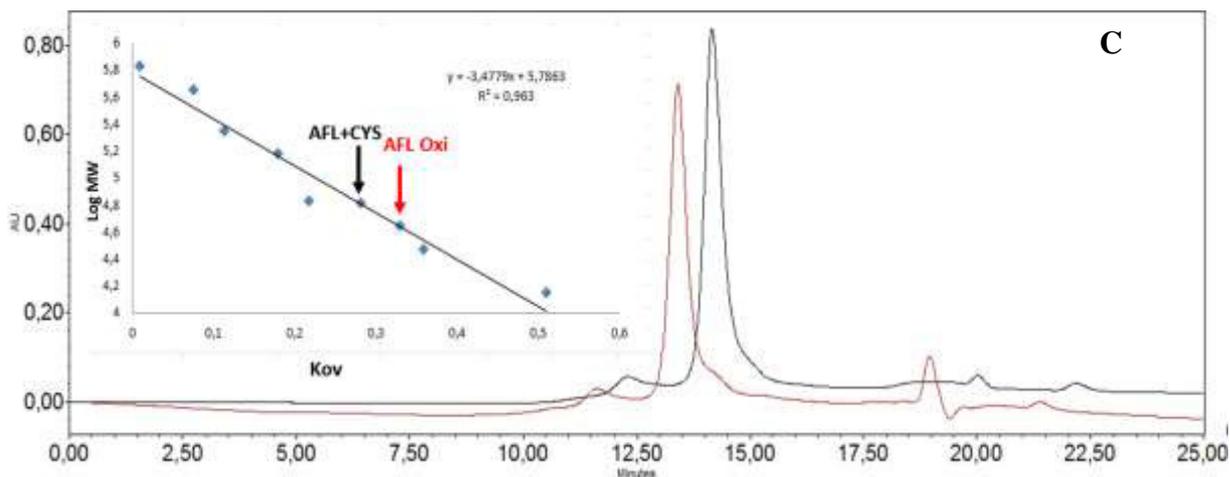
A massa molecular da proteína estimada em SDS-PAGE com adição do agente redutor β -mercaptoetanol foi de aproximadamente 15 kDa. Assim, há concordância com o que foi observado por Carneiro e colaboradores (2019) em SDS-PAGE em condições redutoras:

AFL demonstrou uma banda principal de aproximadamente 15 kDa, bem como duas bandas em torno de 30 kDa. Quando dialisada e liofilizada, a lectina voltou a formar pontes dissulfeto intermoleculares ou intramoleculares, que resultaram na massa molecular de aproximadamente 30 kDa estimada no SDS-PAGE, corroborando com dados obtidos por Carneiro e colaboradores (2019), quando não adicionado o agente redutor β -mercaptoetanol.

Em cromatografia de exclusão molecular, a amostra em condições redutoras e amostra oxidada (sem agentes redutores na preparação) apresentaram perfis de eluição divergentes (Figura 4).

Figura 4 – Cromatografia de exclusão molecular de AFL.





Fonte: O autor. Cromatografia de exclusão molecular de AFL. Foram aplicadas 50 μL de AFL 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 AFL + cisteína; B) Exclusão molecular de AFL oxidada; C) Exclusão molecular de AFL + cisteína e AFL oxidada. 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.

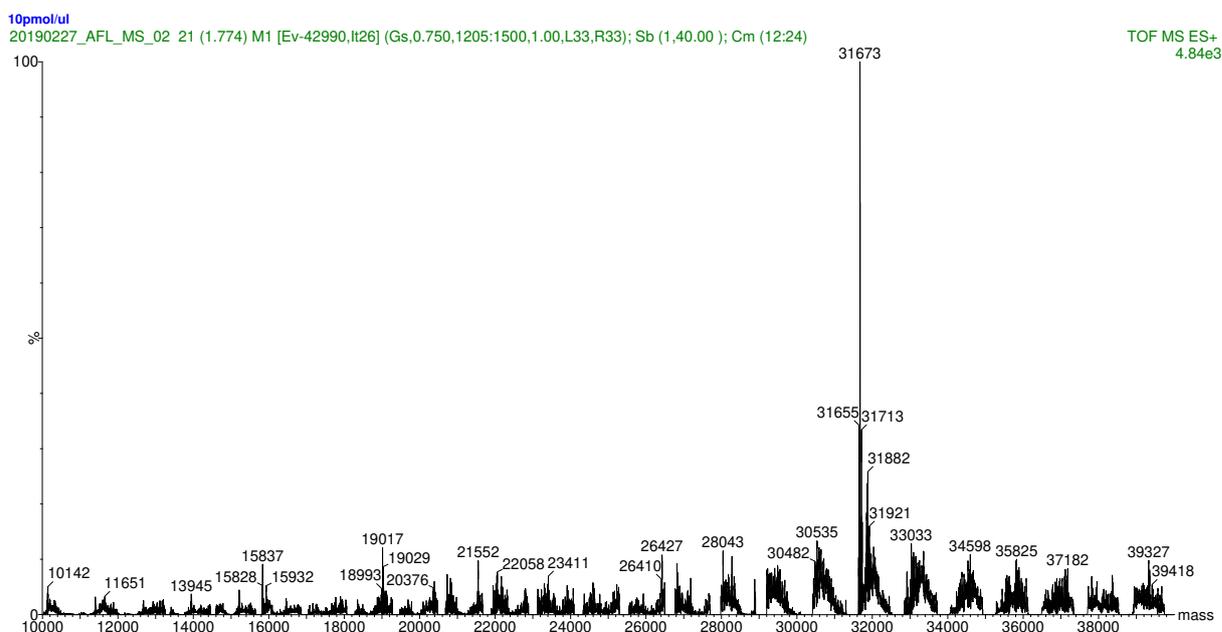
AFL em condições redutoras apresentou, após um tempo de retenção de 13,47 minutos, um pico simétrico com massa calculada em aproximadamente 64 kDa. Já a AFL oxidada, demonstrou após um tempo de retenção de 14,23 minutos, um pico simétrico com massa calculada em aproximadamente 44 kDa.

A massa molecular nativa da AFL, em ambiente redutor, estimada pela cromatografia de exclusão molecular foi de aproximadamente 64 kDa (Figura 4A), indicando a formação de um tetrâmero com as subunidades unidas por interações fracas. Assim como AFL, a formação tetrâmera também foi observada na galectina da esponja marinha *A. lactuca* (ALL) (DUARTE, 2021). Já em *Chondrilla caribensis* (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 *Aplysina lacunosa* (AIL), no qual um tetrâmero de 63 kDa com subunidades de 16 kDa foi formado após a cromatografia de exclusão molecular (MIARONS; FRESNO, 2000).

Em ambiente oxidativo (sem agentes redutores), AFL apresentou massa molecular de 44 kDa (Figura 4B), 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.

A determinação da massa média de AFL por ESI-MS evidenciou um íon de m/z 31.673 (Figura 5).

Figura 5 - Determinação da massa molecular de AFL por ESI-MS.



Fonte: O autor. Os espectros de massa de AFL. A lectina ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) foi dissolvida numa solução de ACN 50% contendo 0,2% de FA e infundida na fonte NanoESI acoplada a um espectrômetro de massa ESI-Q-ToF.

A massa molecular da AFL estimada em SDS-PAGE foi de aproximadamente 15 kDa, após cromatografia de afinidade utilizando L-cisteína (Figura 3). Em ESI-MS foi observado a massa dimérica da proteína, a qual foi determinada em 31.673 Da, e conseqüentemente, a massa monomérica equivale a 15.836 ± 2 Da. Estes valores corroboram com os dados obtidos por CARNEIRO *et al.*, (2019) através de MALDI-ToF. A massa determinada está também em bom acordo com aquela estimada por eletroforese (15 kDa).

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

A sequência de aminoácidos da AFL foi parcialmente determinada por *bottom up*, isto é digestão proteica seguida por análise de peptídeos por espectrometria de massas. Os nove

peptídeos trípticos da banda excisada de 15 kDa que possibilitaram a elucidação estrutural estão inseridos na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequência de peptídeos utilizados para obtenção parcial da estrutura primária de AFL.

	<i>m/z</i>	Sequência	M. obs.	M. cal.	Δ (Da)
T	1003.58	FYVGEICIEAAYTAPTSAR	2004.47	2004.92	0.45
T	725.45	TSVNLVASDGTVVLHVDYRK	2172.32	2172.15	-0.17
T	1174.69	HWGGNPSTGKPWQNILIINSK	2346.36	2346.22	-0.14
T	545.75	LGGSWGTEKR	1089.46	1089.55	0.09
T	618.31	DQDFSLVLNGK	1234.59	1234.61	0.02
T	509.81	ELATYTYR	1015.54	1015.49	-0.05
T	437.25	TPVNTVSR	872.49	872.47	-0.02
T	713.40	VQFGNSGYDAVLR	1424.77	1424.70	-0.07
T	631.86	KLCVVYPAPSK	1260.66	1260.69	0.03

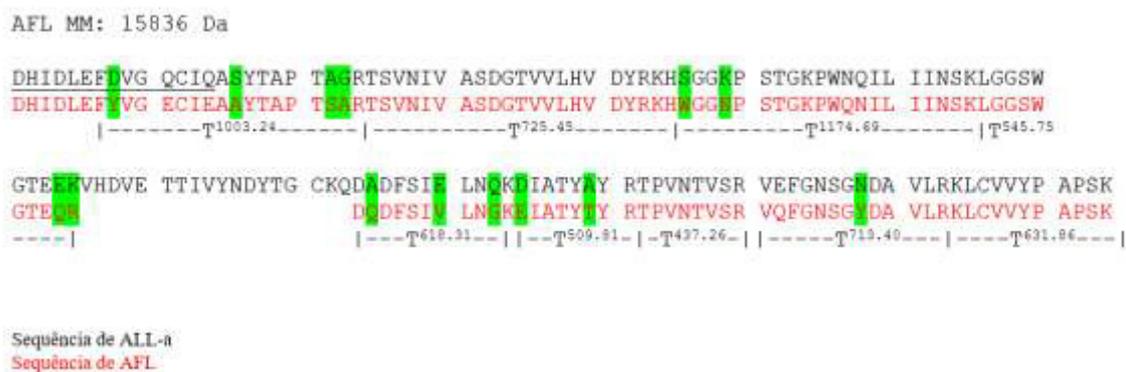
Fonte: O autor. T: peptídeos obtidos da enzima tripsina; *m/z*: massa/carga; M. obs.: massa observada; M. cal.: massa calculada; Δ : M. cal. – M. obs.

A sequência parcial de AFL apresentou um total de 126 aminoácidos identificados, cuja a soma das massas dos aminoácidos resultou numa massa molecular média de 13.777 Da. Logo, a soma das massas dos aminoácidos resultante corresponde a 87% da massa molecular de AFL obtida por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).

Dentre os sete peptídeos obtidos, referentes a banda de 15 kD do SDS-PAGE, utilizados por Carneiro e colaboradores (2019), os peptídeos de *m/z* 437.25 e *m/z* 713.39 são comuns entre os dois trabalhos. Ainda de acordo com Carneiro *et al.* (2019), quatro dos sete peptídeos com as seguintes *m/z* demonstraram similaridade com ALL de *Aplysina lactuca*: 763.38; 720.41; 713.39; 689.38 e 565.82. Em contrapartida, todos os nove peptídeos apresentados nesse trabalho possuem similaridade com a ALL.

Os peptídeos de AFL supracitados foram alinhados com a sequência de ALL-a (Figura 6), uma isoforma da galectina obtida da esponja marinha *Aplysina lactuca* (DUARTE, 2022).

Figura 6 – Mapa peptídico da lectina AFL.



Fonte: O autor. A sequência de aminoácidos na cor preta representa ALL-a; a sequência de aminoácidos na cor vermelha representa AFL. Aminoácidos sublinhados: N-terminal determinado por degradação de Edman. Regiões marcadas em verde: heterogeneidades observadas entre as sequências de ALL-a e AFL.

Quando comparadas, ALL-a e AFL apresentam 14 pontos de variação nas seguintes posições: D/Y⁸, S/A¹⁶, A/S²², G/A²³, S/W⁴⁶, K/N⁴⁹, E/Q⁷⁴, K/R⁷⁵, A/Q⁹⁵, E/V¹⁰⁰, Q/G¹⁰³, D/E¹⁰⁵, A/T¹⁰⁹ e N/Y¹²⁸.

4.5 Domínio Conservado

A sequência parcial de aminoácidos de AFL foi submetida ao programa *Smart*, um *software 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 AFL localizada entre as posições I³ e V¹²⁰ com *e-value* de 0.00247. Quanto mais próximo de zero for o *e-value*, mais confiável é o alinhamento, portanto a AFL possui um domínio confiável de galectina (LETUNICK; KHEDKAR; BORK, 2021).

O alinhamento de AFL com proteínas depositadas no banco de dados *online BLASTp* resultou nos seguintes dados: AFL apresentou 74% de identidade e 79% de similaridade com a isoforma ALL-a da galectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (DUARTE, 2022) (C0HM19.1); 75% de identidade e 81% de similaridade com a isoforma ALL-b da galectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (DUARTE, 2022) (C0HM20.1); 42%

de identidade e 57% de similaridade com a galectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (SOUSA *et al.*, 2021) (C0HLX7.1) e 29% de identidade e 47% de similaridade com a galectina do peixe ósseo *Polyodon spathula* (XP_041093869.1) (Figura 7).

Figura 7 – Alinhamento de AFL com proteínas similares identificadas no *software BLASTp*.

```

      1      10      20      30      40      50
AFL>    ....DHIDLE.FYVGCIEEA.YTAPTSARTSVNIVASDCTVVIHVDYRKHWSGKPSGK
ALL-a>    ....DHIDLE.FDVGOCIQAS.YTAPTAGRTSVNIVASDGTVVIHVDYRKHWSGKPSGK
ALL-b>    ....DHIDLE.FDVGOCIQAS.YTAPITGRTSVNIVASDGTVVIHVDYRKHWSGKPSGK
CCL>    ....TYAEVSRFGVGSATAV.YTAPGDGRDLNITIDADGGYVIEHMDYRFDWGKPSGK
PSL>    MSSKLYIKNEERAPGVVLKIKGLIEPQTKSFVFNVGRSDDEFSLRFNPRFDEHGDTNT..
consensus>50  ....dhidle.f.vG#ciqa..ytaPt.grtsvniwasDgtvvlHv#yRkhwgGnpsTgk

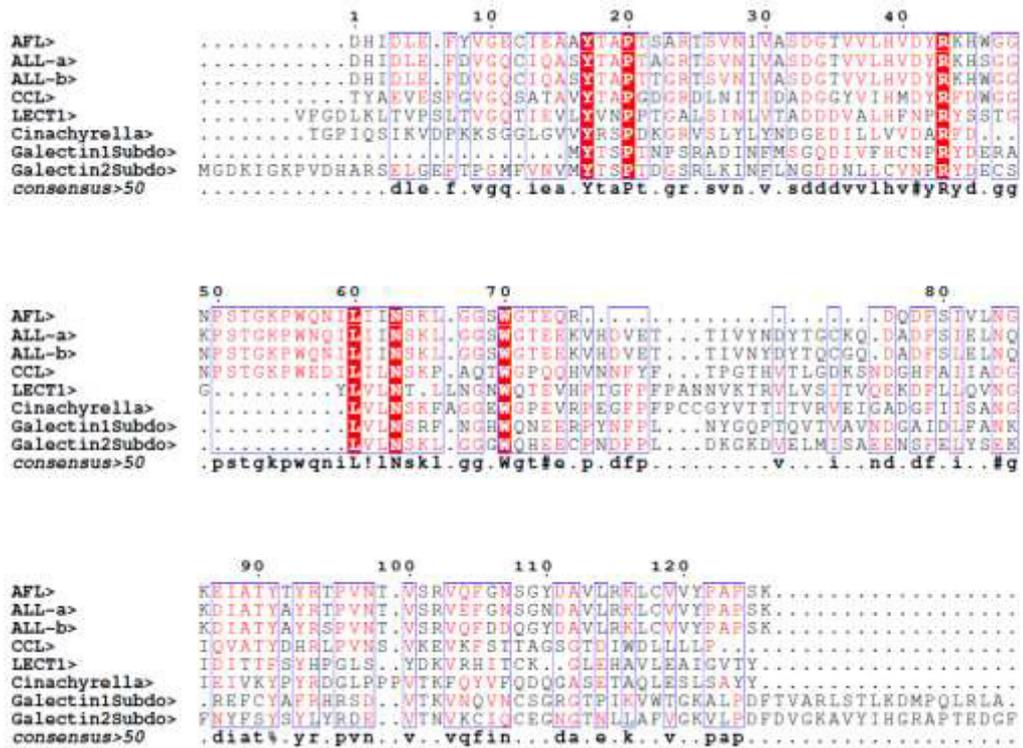
      60      70      80      90
AFL>    PWQNILIIINSKLGSSWGTEER.....DQDFSIVLNGKEIATYIIRI
ALL-a>    PWNQILIIINSKLGSSWGTEEKVHDVETIIVYNDYTGCKQ.DADFSIELNQKDIATYAVRT
ALL-b>    PWQNILIIINSKLGSSWGTEEKVHDVETIIVNYDYTCGQ.DADFSIELNQKDIATYAVRS
CCL>    PWEDILIIINSKPAQTWGPQCHVNNFYETPGTHVTLGDKSMGHTAIIADGIQVATYDHRLL
PSL>    .....IVCNSRVCCAWGAEQRDHAFFPFGHGEEVKVFIYYKEDSDEVKVFDESLLKFPINRC
consensus>50  pwqnil!INSklggsWGt##.vhd...t.....d.dFsi.lnqkdiat%.yR.

      100     110     120
AFL>    PVNTVSRVQFCNSGYDAVLRKLCVVYPAPSK
ALL-a>    PVNTVSRVEFCNSGNDAVLRKLCVVYPAPSK
ALL-b>    PVNTVSRVQFDDQGYDAVLRKLCVVYPAPSK
CCL>    PVNSVKEVKFSTTAGSGTDIWDLLLLP....
PSL>    GDQKLAFLCY.GGERVYSEFKVQ.....
consensus>50  pv#tvsrvqf.n.gydavlrklcgvypapsk
  
```

Fonte: O autor. AFL (*Aplysina fulva lectin*). ALL-a (*Aplysina lactuca lectin*, isoforma a). ALL-b (*Aplysina lactuca lectin*, isoforma b). CCL (*Chondrilla caribensis lectin*). PSL (*Polyodon spathula*).

Ao alinhar a sequência de AFL com as seguintes galectinas identificadas de esponjas marinhas, obteve-se: 74% de identidade e 79% de similaridade com a isoforma ALL-a de *Aplysina lactuca* (C0HM19.1); 75% de identidade e 81% de similaridade com a isoforma ALL-b de *Aplysina lactuca* (C0HM20.1); 42% de identidade e 57% de similaridade com a galectina de *Chondrilla caribensis* (C0HLX7.1); 22% de identidade e 63% de similaridade com a galectina de *Cinachyrella* sp. (BAM09153.1); 23% de identidade e 64% de similaridade com a galectina de *Geogia cydonium* (CAA63818.1); 9% de identidade e 56% de similaridade com a galectina 1 de *Suberites domuncula* (CAD37940.1) e 11% de identidade e 57% de similaridade com a galectina 2 de *Suberites domuncula* (CAJ43112.1) (Figura 8).

Figura 8 – Alinhamento de AFL com galectinas de esponjas marinhas.



Fonte: O autor. AFL (*Aplysina fulva lectin*); ALL-a (*Aplysina lactuca lectin*, isoforma a); ALL-b (*Aplysina lactuca lectin*, isoforma b); CCL (*Chondrilla caribensis lectin*); Cinachyrella (galectina de *Cinachyrella* sp.); LECT1 (gene que codifica as 3 isolectinas de *Geodia cydonium*). Galectin1Subdo e Galectin2Subdo (galectinas 1 e 2 de *Suberites domuncula*, respectivamente). Quadros vermelhos indicam os resíduos de aminoácidos que permaneceram idênticos nas diferentes sequências.

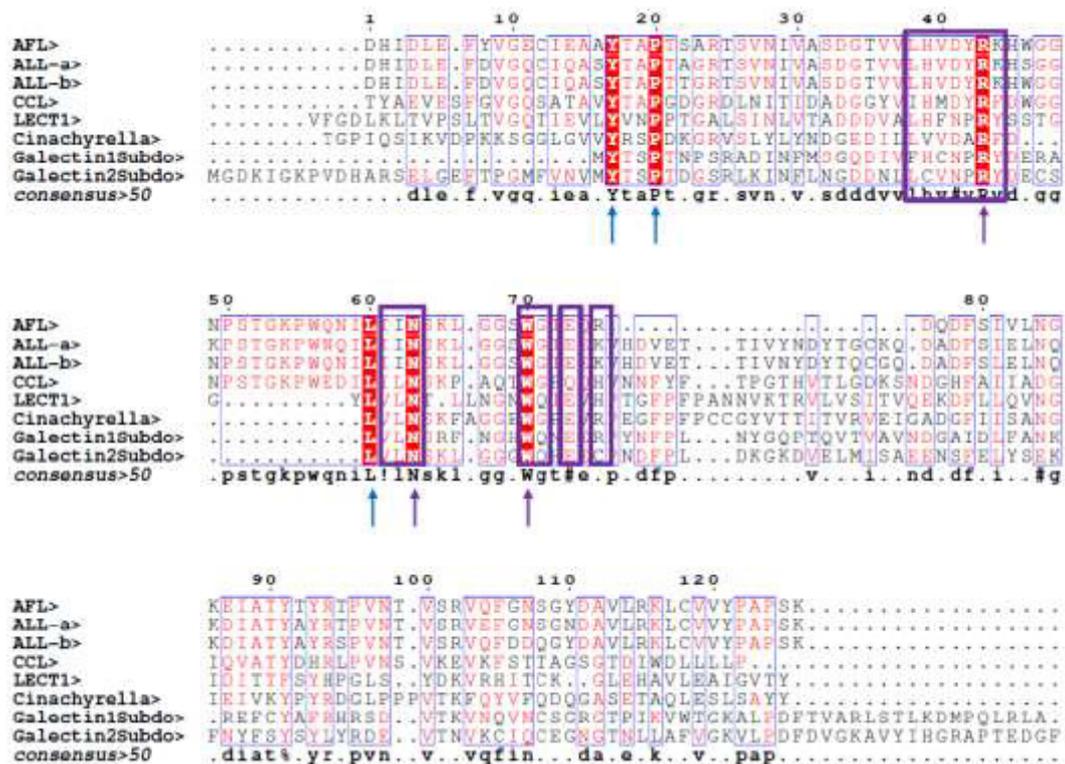
As galectinas representam uma família de lectinas que se ligam a β -galactosídeos, nestas proteínas os resíduos de cisteína estão normalmente livres, sem ligações dissulfetos intramoleculares (VASTA, 2011; VASTA; WANG, 2020). As galectinas apresentam uma similaridade significativa em sua sequência de aminoácidos, com uma identidade moderadamente alta. Além disso, os resíduos de aminoácidos que desempenham um papel na interação com carboidratos são altamente conservados. (BERTUZZI *et al.*, 2020).

O domínio altamente conservado em galectinas foi identificado na sequência de AFL: ³⁹LHFNPRF⁴⁵, ⁶²VLN⁶⁴, ⁷¹WG⁷², E⁷⁴ e R⁷⁶ (HIRABAYASHI; KASAI, 1993), com modificações. Em AFL, 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. O resíduo E⁷⁴ está localizado na posição E⁷³. O resíduo R⁷⁶ foi modificado para R⁷⁵ (Figura 8). 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).

Apesar de não estarem inseridos no domínio típico de galectina, os resíduos de aminoácidos Y¹⁷, P²⁰ e L⁶⁰ permaneceram idênticos em todas as galectinas de esponja (Figura 9).

Figura 9 – Alinhamento do DRC de AFL com galectinas de esponjas marinhas.



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

No alinhamento de AFL com as galectinas das esponjas marinhas *Aplysina lactuca* (DUARTE, 2022); *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* (SCHRÖDER *et al.*, 2006) pôde-se observar a semelhança entre o domínio das galectinas. O alinhamento de AFL entre todas as galectinas de esponja demonstrou que os resíduos que se mantiveram conservados em todas as sequências de aminoácidos dessas proteínas foram: R⁴³, L⁶⁰, N⁶³ e W⁷⁰ (Figura 8).

4.6 Atividade antimicrobiana da lectina em combinação com antibióticos

A avaliação da interação lectina-antibiótico foi realizada com o intuito de testar a capacidade de modificar o efeito da ampicilina ou tetraciclina contra as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

A concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AFL foi utilizada para os ensaios de combinação. Os resultados da associação dos antibióticos ampicilina e tetraciclina obtidos para AFL contra as cepas bacterianas testadas mostraram valores distintos (Tabela 4).

Na Concentração Inibitória Mínima (CIM) individual da ampicilina foi verificada uma redução considerável quando combinada com a lectina contra a bactérias *S.aureus* ATCC 700698, uma cepa considerada mais resistente a ação antibiótica. Com o CIM individual de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, esse valor foi reduzido para 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1/2 da CIM) em associação com lectina.

O efeito da combinação do antibiótico com a lectina foi mais intensificado no tratamento com *S. epidermidis* ATCC 35984, que apresentou CIM individual de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e quando combinada com a lectina reduziu para 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1/16 da CIM). Para a bactéria Gram negativa *E. coli* ATCC 11303, o CIM individual do antibiótico foi de 0,390 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando em combinação com o antibiótico (4 vezes o valor da CIM).

Em associação com a tetraciclina foi observado efeito aditivo e sinergismo em todas as cepas. O CIM individual de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi reduzido para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (1/2 da CIM) quando associado com a lectina para *S. aureus* ATCC 700698. O mesmo efeito aditivo foi também observado para as cepas de *S. epidermidis* ATCC 35984, onde o CIM individual do antibiótico de 0,190 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ se manteve com o mesmo valor quando em associação com a AFL. O

sinergismo foi observado em *E. coli* ATCC 11303 no instante em que o CIM individual da tetraciclina de $0,780 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu para $0,190 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1/16 da CIM) quando associado com a lectina (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da lectina AFL combinada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina *S. aureus*, *S. epidermidis* 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 700698	50	25	1/2	Aditivo	100	50	1/2	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	1.000	62,5	1/16	Sinergismo	0,190	0,190	1	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	0,390	1,56	4	Antagônico	0,780	0,190	1/16	Sinergismo

Fonte: O autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina AFL, 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 AFL se manteve constante (125 µg/mL). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1 ou a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico. Valores iguais a 2 ou a 4 foram considerados como efeito antagônico.

No cenário atual, a propagação da resistência bacteriana aos medicamentos tem constituído uma grave ameaça para a saúde pública a nível mundial e os reveses econômicos atrelados. A utilização de antibióticos de maneira desenfreada possibilitou a transferência rápida e generalizada de genes de resistência aos antibióticos convencionalmente utilizados entre bactérias de todo o mundo (SILVA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2023). Diante disso, a busca por biomoléculas capazes de aumentar a eficácia dos antibióticos é imprescindível.

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

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro que possui a capacidade de afetar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Seu mecanismo de ação ocorre através da ligação ao ribossomo bacteriano, o que impede a síntese de proteínas e resulta na interrupção do crescimento celular bacteriano. No entanto, bactérias podem desenvolver resistência à tetraciclina por meio de diversos mecanismos, tais 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, 2010).

A ampicilina é um antibiótico β -lactâmico que contém um anel β -lactâmico em sua estrutura molecular, e atua inibindo a síntese da parede celular dos microrganismos. A hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência a essa classe de agentes antibacterianos em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes. A enzima β -lactamase tem a capacidade de clivar o anel β -lactâmico presente na estrutura da ampicilina e de outros antibióticos β -lactâmicos, inativando-os e tornando-os ineficazes contra os microrganismos (BUSH; JACOBY, 2010).

Na literatura científica há a descrição predominante de lectinas vegetais em associação com antibióticos estabelecidos comercialmente, e a observação do sinergismo resultante da combinação. A lectina da romã *Punica granatum* (PgTel) apresentou atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli* em sinergismo com os fármacos ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, cefalexina e cefuroxima (DA SILVA *et al.*, 2019). A lectina da leguminosa olho-de-boi *Dioclea violacea* (DVL) exibiu a capacidade de modulação da

atividade antimicrobiana da gentamicina e na redução da nefrotoxicidade induzida por este fármaco (SANTOS *et al.*, 2020). A lectina da fava-de-bolota *Parkia platycephala* (PPL), quando foi combinada com a gentamicina, observou-se um aumento significativo da atividade antibiótica contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli* (SILVA *et al.*, 2019).

Os autores dos trabalhos citados supõem que o aumento da ação do antibiótico contra as cepas multirresistentes estão relacionados aos seguintes preceitos: as interações entre as lectinas com os componentes da membrana celular bacteriana (ácidos teicóicos, peptidoglicano e lipopolissacarídeos) podem levar à inibição do crescimento, às alterações na permeabilidade celular e às interações com receptores de membrana que desencadeiam respostas intracelulares (COELHO *et al.*, 2018).

Outro mecanismo abordado é interação dos antibióticos com o DRC, ou seja, entregando o medicamento às células-alvo por meio do reconhecimento de carboidratos da membrana. Conseqüentemente, ocorrerá a liberação do fármaco e facilitará a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano. Outra ideia é interação das lectinas com os glicanos presentes nas bombas de efluxo, e bloqueando ou modificando sua estrutura conformacional (DA SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020). No entanto, são necessários mais estudos detalhados para comprovar esse mecanismo de ação.

Em relação aos trabalhos com lectinas de esponjas marinhas em associação a antibióticos, a ALL de *Aplysina lactuca* quando em associação com a ampicilina e tetraciclina potencializou o efeito antibiótico dos fármacos (DUARTE, 2022). Embora os estudos com lectinas de esponjas marinhas associadas a algum antibiótico sejam ainda escassos, a associação de biomoléculas como as lectinas com diferentes classes de antibióticos pode ser uma alternativa eficaz no combate à resistência bacteriana adquirida.

5 CONCLUSÃO

A lectina de *Aplysina fulva* (AFL) foi purificada em condições redutoras, e exibiu atividade hemaglutinante superior nessas condições por ser uma proteína citoplasmática, como ficou constatado com a redução da atividade hemaglutinante em ambiente oxidado. AFL foi caracterizada estruturalmente e sua estrutura primária mostrou alta similaridade com lectinas pertencentes a família das galectinas.

A lectina também potencializou o efeito dos antibióticos ampicilina e tetraciclina frente a cepas de bactérias patogênicas. Estudos complementares são necessários para completar os dados estruturais e elucidar o mecanismo de ação da proteína junto ao antibiótico.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. K. *et al.* An Update of Lectins from Marine Organisms: characterization, extraction methodology, and potential biofunctional applications. **Marine Drugs**, v. 20, n. 7, p. 430, 29 jun. 2022.
- ANDRADE, F. R. N. **Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis***. 2022. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- BERTUZZI, S. *et al.* Targeting Galectins With Glycomimetics. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. August, p. 1–17, 2020.
- BOYD, W.C.; SHARPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BUSH, K; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β Lactmases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, mar. 2010.
- BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. **Natural product reports**, v. 35, n. 1, p. 8–53, 2018.
- 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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 213–222, 2017.

CARNEIRO, R.F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 662, n. October 2018, p. 169–176, 2019.

COELHO, L.C. B. B. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 26 ago. 2018.

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**, v. 135, p. 931–939, 2019.

DODD, R.Y.; MACLENNAN, A.P.; HAWKINS, D.C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, v. 15, n. 5, p. 386-391, 1968.

DUARTE, J. de A. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca***. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2022.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, jul. 1988.

EBEL, R. *et al.* Wound Activation of Protoxins in Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 23, n. 5, p. 1451-1462, 1997.

EDELMAN, G. M. *et al.* The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, v. 69, n. 9, p. 2580-2584, set. 1972.

FILHO, S. M. G. **Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

FREYMANN, D.M. *et al.* Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, v. 68, p. 1163-1174, 2012.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera Lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.

GAZAVE, E. *et al.* No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of porifera. **Hydrobiologia**, v. 687, n. 1, p. 3-10, 12 ago. 2011.

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

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

HICKMAN, C.P; ROBERTS, L.S; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

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

HORIE, H. *et al.* Oxidized galectin-1 is an essential factor for peripheral nerve regeneration. **Curr Drug Targets**. v.4, p.385-394, 2005.

HU, Y. *et al.* Statistical Research on the Bioactivity of New Marine Natural Products Discovered during the 28 Years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 202-221, 7 jan. 2015.

KILPATRICK, D. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 19 set. 2002.

LECHARTIER, B.; HARTKOONR, R. C.; COLE, S. T. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012.

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

LI, T. *et al.* Bacterial resistance to antibacterial agents: mechanisms, control strategies, and implications for global health. **Science of The Total Environment**, v. 860, p. 160461, fev. 2023.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5th ed. New York: Williams & Willkins, 2005.

MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301, abr. 2018.

MARQUES, J. S. N. **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.

MASANGKAY, F. R. *et al.* Sponges (Porifera: spongillida) as ecological indicators for parasitic protozoans cryptosporidium and giardia infective stages in freshwater ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 139, p. 108895, jun. 2022.

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

MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson. Contrib. Knowl.** p.89-90, 1860.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523, dez. 2006.

NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* 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**, v. 18, n. 4, p. 521-528, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, 462–466, 1960.

PAPON, N.; COPP, B. R.; COURDAVAULT, V. Marine drugs: biology, pipelines, current and future prospects for production. **Biotechnology Advances**, v. 54, p. 107871, jan. 2022.

PFEIFER, K. *et al.* 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**, v.3, p.179–184, 1993.

PIETRZYK-BRZEZINSKA, A. J.; BUJACZ, A. H-type lectins – Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 735-747, jun. 2020.

PINHEIRO, U. S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M. R. *Aplysina* Nardo (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, v. 1609, n. 1, p. 33-35, 8 out. 2007.

ROHDE, S.; SCHUPP, P. J. Allocation of chemical and structural defenses in the sponge *Melophlus sarasinorum*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 399, n. 1, p. 76-83, mar. 2011.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765–769, 1998.

SANTOS, P. I. M. **Purificação, caracterização de uma nova lectina com atividade imunomoduladora da esponja *Aplysina fulva***. 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

SANTOS, V. F.; *et al.* *Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 841–852, 2020.

SIGWART, J. D. *et al.* Unlocking the potential of marine biodiscovery. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 7, p. 1235-1242, 2021.

SILVA, R. R. S. *et al.* *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, n. July, p. 103629, 2019.

SISBBR. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/164973#classification>> Acesso em: 27 de junho de 2023.

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**, v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.

SCHRÖDER, H.C. *et al.* 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**, v. 281, p.12001–12009, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 2nd edition. The Netherlands: Springer, 2007.

SHARON, N; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 30 jun. 2004.

SHATZ-AZOULAY, H. *et al.* The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 30 abr. 2020.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.

STOWELL, S. R. *et al.* Alkylation of galectin-1 with iodoacetamide and mass spectrometric mapping of the sites of incorporation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1207, p. 51–62, 2015.

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

TAYLOR, M. *et al.* Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. **Essentials of Glycobiology**, 4th edition, p. 1-4, 2022.

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

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. **ResearchGate**. 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.

WANG, W.-H. *et al.* The role of galectins in virus infection - A systemic literature review, **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 6, 2020.