



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA**

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO AGLUTINANTE**  
**FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE UMA LECTINA EXTRAÍDA DA**  
**ESPONJA MARINHA *Cliona celata* (Grant, 1826).**

**FORTALEZA**

**2023**

JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO AGLUTINANTE FRENTE  
A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE UMA LECTINA EXTRAÍDA DA ESPONJA  
MARINHA *Cliona celata* (Grant, 1826).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de recursos aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre H. Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo F. 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)

---

- S58p Silva, João Marcelo de Sousa.  
Purificação parcial e avaliação do efeito aglutinante frente a bactérias patogênicas de uma lectina extraída da esponja marinha *Cliona celata* (Grant, 1826) / João Marcelo de Sousa Silva. – 2023.  
38 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.  
Coorientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
1. Esponja marinha. 2. Lectina. 3. Aglutinação bacteriana. I. Título.
- CDD 639.2
-

JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO AGLUTINANTE FRENTE  
A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE UMA LECTINA EXTRAÍDA DA ESPONJA  
MARINHA *Cliona celata* (Grant, 1826).

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento de  
Engenharia de Pesca do Centro de  
Ciências Agrárias da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial  
à obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Pesca. Área de  
concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre H.  
Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo F.  
Carneiro.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

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

A Deus.

A minha mãe Antônia Edênia de Sousa.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, que tem sido constante em sua fidelidade e propósito em minha vida. Agradeço por Ele ter me possibilitado a realização dos meus objetivos, por infundir em mim a esperança para persistir, por ser meu refúgio nos momentos de adversidade, e por me permitir vivenciar momentos de alegria mesmo em horas onde pensei que não haveria. Agradeço por sua orientação e bênçãos em minha jornada até o presente momento. Reconheço que sem Ele, nada do que alcancei seria possível e a Ele dedico toda a honra.

A minha mãe que diante de inúmeras adversidades, demonstrou uma dedicação incomparável ao meu bem-estar. Ela não apenas me amparou nos momentos de tristeza e angústia, mas também me proporcionou inúmeras alegrias. Sua fé constante em mim torna possível acreditar em minhas capacidades e alcançar meus objetivos. Sua fibra moral moldou não apenas a minha vida, mas também a minha percepção sobre o que é verdadeiramente possível e sem ela, não poderia ter chegado ao fim desta jornada acadêmica.

Ao meu orientador professor Dr. Alexandre Holanda Sampaio pelo auxílio constante, por ter paciência comigo em determinados momentos de ansiedade, por me auxiliar em situações de incerteza, e principalmente por me orientar neste período, moldando a minha trajetória acadêmica. Sempre o admirei, sua mentoria foi fundamental para a realização deste projeto. Não há palavras para descrever o quão honrado sou por ter sido seu orientando. Agradeço também pelos momentos de descontração que o senhor proporcionou durante a minha trajetória acadêmica. Além disso, tenho uma profunda admiração pelo senhor, não apenas como um professor e pesquisador de destaque, mas também como um ser humano excepcional.

Ao professor Dr. Rômulo Farias Carneiro que me concedeu a oportunidade de estagiar no laboratório BioMar no período de transição da pandemia, onde as incertezas da minha trajetória acadêmica permaneciam presentes. Além de ter sido capaz de proporcionar momentos de descontração, tenho-o como um exemplo inspirador tanto como pessoa quanto como profissional. Agradeço especialmente por ter tido um mentor extraordinário, fornecendo orientação e aconselhamento com notável paciência e atenção, especialmente em momentos que a ansiedade persistia em mim. A sua orientação foi indispensável para a execução deste trabalho, e estou verdadeiramente grato pela ajuda

fundamental que o senhor me proporcionou. Sou feliz e privilegiado por ter contado com o senhor ao longo dessa jornada acadêmica.

À doutoranda Jessica Duarte, uma presença constante desde o início da minha jornada no BioMar – Lab. Sua assistência foi fundamental, acompanhando-me de maneira incansável, especialmente nos momentos em que minhas inseguranças persistiam durante a execução deste projeto. Suas contribuições foram verdadeiramente inestimáveis para a realização desta pesquisa, e sem o seu apoio, a conclusão deste trabalho não teria sido possível. Além disso, desejo destacar a qualidade única de ter não apenas uma mentora dedicada, mas também uma amiga leal que surgiu durante este período. O profundo carinho que expresse reflete não apenas a gratidão pela orientação acadêmica, mas também a apreciação pela amizade valiosa que enriqueceu significativamente esta fase da minha vida.

Ao doutorando Renato César Farias Torres e ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano por aceitarem participar da banca, proporcionando contribuições inestimáveis para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves pelas orientações, sua notável paciência ao transmitir conhecimento, especialmente nos momentos finais da execução deste trabalho. Também destaco a amizade que foi capaz de proporcionar, oferecendo suporte e tranquilidade durante períodos de insegurança. Sua contribuição é de fundamental importância para a minha formação acadêmica. Obrigado por enriquecer minha jornada acadêmica com sua sabedoria e amizade valiosa.

Ao grupo de mestrandos e doutorandos que fazem parte do Laboratório BioMar, Levi, Eduardo, Manoel, Pedro Arthur, Gabriel, Vinícius, Jessica, Renato, Juliana, Pedro Abílio, Philippe e Andressa. Suas colaborações foram fundamentais para minha jornada como bolsista de iniciação científica no laboratório. Valorizo os momentos que me proporcionaram nesta jornada, especialmente as orientações, os momentos dedicados a esclarecer minhas dúvidas e o apoio durante a execução deste trabalho.

Ao professor Aldeney, que durante a pandemia, me apoiou nos momentos de tristeza e foi capaz de me fornecer suporte neste período delicado. Sua ajuda foi excepcional, oferecendo suporte de maneiras que poucos seriam capazes. Sua orientação foi fundamental para que eu alcançasse meus objetivos, sou extremamente grato por sua contribuição moral e acadêmica nesta minha jornada. Agradeço por ter me proporcionado valiosos ensinamentos que carregarei para sempre.

Aos meus amigos e companheiros de bancada Levi, Eduardo, Israel, Philippe e Paulo. Agradeço sinceramente por compartilharmos momentos únicos em minha vida, pela parceria, sorrisos, risadas, principalmente em dias que eu não estava bem, apoio, motivação e pela inestimável ajuda nos momentos desafiadores.

Aos meus amigos que fiz durante a faculdade, Régis Moraes, Levi Oton, Karen dos Santos, Luana Lira e Simeão Nojosa, por tudo. Sou grato por suas amizades, estarem ao meu lado em momentos de angústia, pelos sorrisos e momentos felizes que tivemos ao longo deste período, estimo demais todos os momentos que compartilhei com vocês.

Ao professor Dr. Punnadath Preetham Elumalai por disponibilizar uma cópia do livro "Lectins". A partir desse gesto generoso, ele não apenas enriqueceu, mas também engrandeceu este projeto acadêmico. Sua empatia ao atender minha solicitação para obter uma cópia deste livro foi inestimável e desempenhou um papel fundamental no avanço da minha pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) pela infraestrutura e auxílio nas análises de aglutinação bacteriana.

Ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Agradeço também ao Departamento de Engenharia de Pesca e ao Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar Lab, pela infraestrutura disponibilizada que foi fundamental para a realização deste projeto.



“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei.”

(Moisés 91:2)

## RESUMO

As esponjas são organismos pertencentes ao filo Porifera, possuem uma organização geral muito simples e são reconhecidas por serem uma fonte significativa de compostos bioativos. Lectinas são caracterizadas por serem proteínas ou glicoproteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico de ligação reversível a carboidratos, desempenhando um papel fundamental em processos biológicos, tais como adesão de células, migração celular, ativação do sistema imunológico e comunicação intercelular. As lectinas de esponjas marinhas têm despertado interesse devido à sua diversidade funcional, bem como às suas atividades biológicas, pois essas proteínas podem apresentar propriedades antibacterianas e antimicrobianas. Essas proteínas possibilitam uma compreensão aprofundada dos processos de reconhecimento celular e imunidade, o que pode contribuir para um entendimento mais detalhado, especialmente considerando seu alto potencial biotecnológico. Portanto, o presente trabalho foi desenvolvido com foco em purificar, caracterizar e avaliar o efeito aglutinante de uma lectina isolada da esponja marinha *Cliona celata* contra bactérias patogênicas. A lectina foi parcialmente isolada a partir da combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica e exclusão molecular. A proteína exibiu atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho. A atividade hemaglutinante do extrato de *C. celata* foi inibida apenas pelas glicoproteínas asialofetuína, fetuína bovina e tiroglobulina suína. A atividade hemaglutinante do extrato de *Cliona celata* mostrou ser independente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Em SDS-PAGE a lectina revelou uma banda majoritária de aproximadamente 45 kDa, além disso, foi capaz de aglutinar bactérias das cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*.

**Palavras-chave:** esponja marinha; lectina; aglutinação bacteriana.

## ABSTRACT

Sponges are organisms belonging to the phylum Porifera, have a very simple general organization and are recognized for being a significant source of bioactive compounds. Lectins are characterized by being proteins or glycoproteins that have at least one non-catalytic reversible carbohydrate-binding domain, playing a fundamental role in biological processes, such as cell adhesion, cell migration, activation of the immune system and intercellular communication. Lectins from marine sponges have aroused interest due to their functional diversity, as well as their biological activities, as these proteins may have antibacterial and antimicrobial properties. These proteins enable an in-depth understanding of cellular recognition and immunity processes, which can contribute to a more detailed understanding, especially considering their high biotechnological potential. Therefore, the present work was developed with a focus on purifying, characterizing and evaluating the agglutinating effect of a lectin isolated from the marine sponge *Cliona celata* against pathogenic bacteria. The lectin was partially isolated from the combination of ammonium sulfate precipitation and ion exchange and molecular exclusion chromatography. The protein exhibited hemagglutinating activity against rabbit erythrocytes. The hemagglutinating activity of the *C.celata* extract was inhibited only by the glycoproteins asialofetuin, fetuin bovine and porcine thyroglobulin. The hemagglutinating activity of *Cliona celata* extract was shown to be independent of  $\text{Ca}^{+2}$ . In SDS-PAGE, the lectin revealed a majority band of approximately 45 kDa, in addition, it was able to agglutinate bacteria from *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* strains.

**Keywords:** marine sponge; lectin; bacterial agglutination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esponja marinha <i>Cliona celata</i> .....	18
Figura 2 - Estrutura modular das galectinas. ....	20
Figura 3 - Cromatografia de troca iônica da fração 0-70 do extrato de <i>Cliona celata</i> ... 31	
Figura 4 - Cromatografia de exclusão molecular do P3 da <i>Cliona celata</i> .....	32
Figura 5 - Eletroforese em gel SDS-PAGE do P3 na ausência de agente redutor. ....	33
Figura 6 - Efeito aglutinante nas cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303, <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e ATCC 700698.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Família de lectinas de esponjas marinhas.....	21
Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante de extrato de <i>Cliona celata</i> . ....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Esponjas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 Gênero <i>Cliona</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.3 <i>Cliona celata</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Lectinas</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.1 Lectinas de esponjas</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.2 Lectinas de esponjas com ação antibacteriana</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.3 Lectinas do gênero <i>Cliona</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Coleta da esponja</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Purificação da lectina</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Atividade hemaglutinante e inibição</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4 Efeito de íons divalente na atividade hemaglutinante</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Avaliação da pureza da lectina</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6 Estimativa da massa molecular</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Ensaio de aglutinação bacteriana</b> .....	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante do extrato de <i>Cliona celata</i></b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Efeito de íons divalente na atividade hemaglutinante do extrato de <i>Cliona celata</i></b> .....	<b>29</b>
<b>4.3 Purificação parcial da lectina de <i>Cliona celata</i></b> .....	<b>30</b>
<b>4.4 Estimativa da massa molecular</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5 Aglutinação de bactérias <i>E. coli</i>, <i>S. epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>33</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esponjas

As esponjas são reconhecidas por serem o grupo mais primitivo de metazoários vivos. A organização geral e morfologia desses organismos provaram ser extremamente adaptáveis, permitindo-lhes sobreviverem a alterações significativas no ambiente e competir com outras formas de vida (DAHIHANDE; THAKUR, 2021; HOOPER J. N. A.; VAN SOEST, 2002). Esse conjunto de organismos habitam o meio aquático, pertencem ao filo Porifera (do latim *porus*, “poros”; e *ferre*, “possuir”) e estão inseridos em ambientes marinhos e de água doce, desde zonas entre marés até em profundidades abissais (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019).

São organismos aquáticos multicelulares que possuem um sistema composto por corpos porosos com canais que permitem a circulação da água, filtração e captura de forma eficaz de partículas de alimentos (MASANGKAY, F. R. *et al.*, 2022; THOMPSON, F.; THOMPSON, C., 2020). Esse sistema é impulsionado por uma camada de células flageladas conhecidas como coanócitos, que bombeiam a água de maneira contínua. Dentro desses corpos, há uma população de células altamente móveis, com a notável capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, um fenômeno chamado de totipotência, conferindo assim uma flexibilidade única à sua forma de crescimento (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019; FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016).

De acordo com Ereskovsky e Lavrov (2021), a organização das esponjas é simples em comparação com outros organismos metazoários, uma vez que não possuem distinção de tecidos ou órgãos, no entanto, as esponjas possuem sistema complexo de canais de água. As esponjas possuem uma estrutura cilíndrica com uma grande cavidade central, denominado espongiocele. Ademais, as esponjas apresentam uma diversidade de formas corporais, incluindo variações no tamanho da espongiocele, no número de ósculos e na localização das células que filtram os alimentos provenientes da água (VAN SOEST *et al.*, 2012).

As esponjas constituem boa parte da biomassa marinha bentônica, possuem mais de 9.600 espécies registradas e exibem uma grande diversidade em suas formas, cores e tamanhos com variação de 3 – 10 milímetros a 1,5 – 2 metros (DE VOOGD *et al.*, 2023). Essas características são provenientes da composição de seus esqueletos, que

podem ser de natureza mineral ou orgânica, as quais são produzidas por células especializadas, denominadas esclerócitos ou escleroblastos. Esses esqueletos são construídos a partir de elementos como espículas silicosas, calcárias ou de fibras orgânicas colagenosas (AGUILAR-CAMACHO; DOONAN; MCCORMACK, 2019).

Com base em estudos moleculares filogenéticos, as classes do filo Porifera foram definidas a partir da natureza dos seus esqueletos internos em: Calcarea, Homoscleromorpha, Hexactinellida e Demospongiae. A classe Calcarea é exclusivamente composta por esponjas marinhas, cujos esqueletos são compostos por espículas de carbonato de cálcio (THOMPSON, F.; THOMPSON, C., 2020). A classe Homoscleromorpha tem como característica a ausência de espículas, possuindo formato simples e são pequenas. (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2019; FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016). Hexactinellida é uma classe de esponjas que possuem espículas de sílica e estrutura corpórea em forma de funil ou cilíndrica (HOOPER *et al.*, 2021). E, por fim, a classe Demospongiae que abriga o maior número de espécies e é a mais diversificada em termos de formatos e cores. Espécies desta classe tem característica distintiva a variabilidade em suas espículas formadas por sílica ou espongina (AGUILAR-CAMACHO; DOONAN; MCCORMACK, 2019).

Por serem organismos sésseis, as esponjas produzem uma diversidade de compostos bioativos que funcionam como defesas químicas (VARIJAKZHAN *et al.*, 2021). Esses compostos protegem tais organismos de corpo mole contra diversos fatores de estresse biótico, incluindo a competição por nutrientes e espaço, as relações simbióticas, proteção contra radiação UV e infecções ocasionadas por patógenos (ESPOSITO *et al.*, 2022).

Os compostos derivados de esponjas marinhas pertencem a diferentes classes químicas, incluindo alcaloides, peptídeos cíclicos, terpenos, glicolipídeos, esteróis, macrolídeos, policetídeos, enzimas e nucleosídeos (THOMPSON, F.; THOMPSON, C., 2020; VARIJAKZHAN *et al.*, 2021). Desta forma, as esponjas se destacam como uma fonte rica de biomoléculas com potencial biotecnológico nas áreas da biomedicina, farmacêutica e médica (AGUIAR *et al.*, 2021; MANNELLI *et al.*, 2021).

### 1.1.2 Gênero *Cliona*

*Cliona* é um gênero da família Clionidae, pertencente à classe Demospongiae. Possui organismos que variam em forma, tamanho e cor, são conhecidas



como esponjas perfurantes ou esponjas de escavação, devido ao seu comportamento de perfurar estruturas calcárias, como recifes de corais e conchas de moluscos, para criar cavidades nas quais possam habitar (LAVROV *et al.*, 2022; RFITZLER; RIEGER, 1973). Dessa forma, essas esponjas podem enfraquecer a estrutura de corais e outros substratos, ademais, desempenham um papel na reciclagem de carbonato de cálcio, liberando-o na forma dissolvida no ambiente.

Os espécimes do gênero *Cliona* podem ser encontrados em várias partes do mundo, principalmente em ambientes marinhos tropicais e subtropicais. Na costa brasileira são encontrados nas regiões dos litorais do Nordeste, Sudeste e Sul (DE VOOGD *et al.*, 2023; HOOPER *et al.*, 2002; LAVROV *et al.*, 2018; SIBBR, 2023).

### **1.1.3 *Cliona celata***

A esponja *Cliona celata* foi descrita por Grant em 1826, pertence a classe Demospongiae, subclasse Heteroscleromorpha, Ordem Clionaida, família Clionidae e gênero *Cliona* (SIBBR, 2023) (Figura1). É uma espécie formada por um aglomerado de outras espécies crípticas, essa característica se deve à sua simplicidade morfológica combinada com uma distribuição amplamente postulada. É conhecida por seu papel de bioerosão, por meio da sua capacidade de perfurar conchas de moluscos e corais, vivendo principalmente dentro de seus substratos (HANNA *et al.*, 2006; SIVAN *et al.*, 2023). Portanto, a maior parte do seu corpo está oculta dentro do substrato, com apenas pequenas aberturas expostas, chamadas de ósculos, permitindo a entrada e saída de água (DE PAULA *et al.*, 2012).

Figura 1 - Esponja marinha *Cliona celata*.

Fonte: o Autor (2023). Espécime de *C. celata* coletado na praia de Bitupitá, município de Barroquinha, CE.

## 1.2 Lectinas

No final do século XIX, foram registradas as primeiras evidências da existência de proteínas capazes de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas ficaram conhecidas como hemaglutininas ou fitoaglutininas, devido à sua descoberta inicial em extratos de plantas. Um dos primeiros relatos sobre o processo de aglutinação em eritrócitos por essas proteínas está associado a descrição de uma hemaglutinina realizada por Peter Hermann Stillmark, a partir de extratos de sementes de *Ricinus communis* que continham uma proteína com capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos de animais (BAH; FANG; NG, 2013; SHARON; LIS, 2004). Em 1919, James B. Sumner desenvolveu a primeira metodologia para isolar uma lectina. Por meio da utilização de extratos do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e, através da precipitação salina, Sumner purificou a lectina denominada de Concanavalina A (SHARON; LIS, 2004).

A palavra lectina deriva do latim “*lect*”, do verbo “*legere*”, que significa “escolher”, foi proposta para designar as hemaglutininas após ser observado que essas proteínas exibiam especificidades diferentes por carboidratos e tipos sanguíneos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954; SHARON; LIS, 2007).

As lectinas de origem animal, embora identificadas como proteínas aglutinantes antes de serem formalmente classificadas como lectinas, são conhecidas há

tanto tempo quanto as lectinas vegetais. Em 1860, o pesquisador S. Mitchell detalhou o processo de aglutinação em seus estudos sobre o veneno da serpente *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860).

Atualmente as lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas que possuem a capacidade de se ligar reversivelmente a mono e oligossacarídeos, sem alterar quimicamente ou participar do metabolismo dos mesmos (AHMMED *et al.*, 2022; GARDÉRES *et al.*, 2015; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KILPATRICK, 2000; SHARON; LIS, 2004). Essas moléculas desempenham diversas funções no organismo através do reconhecimento e ligação a carboidratos específicos presentes na superfície de células. Tais interações são importantes em muitos processos biológicos, como a adesão de células, a migração celular, a ativação do sistema imunológico e a comunicação intercelular (KILPATRICK, 2002).

Devido a capacidade de interagir com glicanos alvos e desencadear respostas variadas, essas moléculas possuem elevado potencial biotecnológico (SHARON; LIS, 2007). As lectinas podem ser utilizadas para estudos estruturais, biologia molecular e celular, imunologia, farmacologia e medicina. Lectinas e outras proteínas de esponjas marinhas provaram ser candidatos potentes para novos medicamentos, devido à sua ampla gama de efeitos biológicos, como antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral (FILHO *et al.*, 2015).

Essas proteínas são amplamente distribuídas na natureza, seu isolamento já foi descrito em diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, algas, plantas e animais, e podem ser classificadas em famílias com base em suas propriedades físico-químicas, funções e, mais notavelmente, sua sequência de aminoácidos (CHETTRI *et al.*, 2021; DE CONINCK; VAN DAMME, 2021).

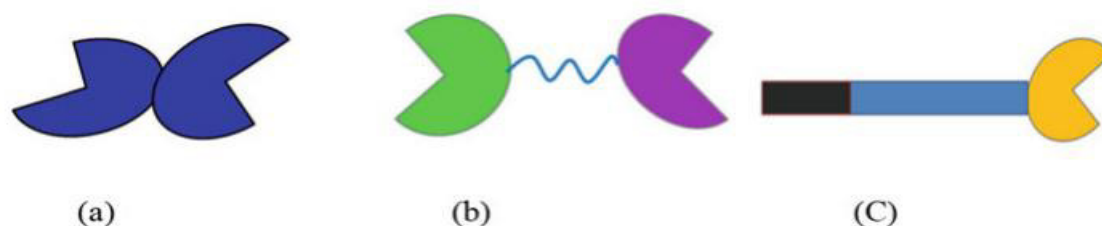
### **1.2.1 Lectinas de esponjas**

Historicamente, os primeiros estudos envolvendo lectinas de esponjas marinhas foram realizados por Dodd e colaboradores em 1968, utilizando as esponjas *Cliona celata*, *Axinella* sp. e a *Tethya aurantium*. A partir dos extratos da *Cliona celata* e da *Axinella* sp foram observadas atividade hemaglutinante destas duas espécies (DODD; MACLENNAN; HAWKINS, 1968).

As lectinas de esponjas podem ser classificadas em diferentes famílias, baseando-se em dois critérios principais: a especificidade de ligação e a sequência de aminoácidos GARDÈRES *et al.*, (2015) (Tabela 1).

As galectinas representam uma família de lectinas capaz de reconhecer  $\beta$ -galactosídeos. Galectinas possuem múltiplas funções, incluindo a mediação da adesão célula-célula e célula-matriz, a regulação do crescimento celular, apoptose, *splicing* de pré-mRNA, transdução de sinais e regulação do sistema imunológico. Além disso, os resíduos de aminoácidos que desempenham o papel na interação com carboidratos são altamente conservados (BERTUZZI *et al.*, 2020; ELOLA *et al.*, 2007; WANG, 2020). As galectinas são distribuídas em três subfamílias de acordo com sua arquitetura estrutural: protótipo, repetição em tandem e quimera (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura modular das galectinas.



Fonte: Adaptado de ELUMALAI; LAKSHMI (2022). (a) protótipo, com formas de domínio de reconhecimento de carboidratos (DRCs) únicas homodímeros não covalentes, (b) repetição em tandem mostra dois DRCs com especificidade similar, um nas região N-terminal e outro na região C-terminal unidos por um peptídeo, (c) tipo quimera mostra um único CRD e um domínio N- terminal semelhante a colágeno.

As lectinas do tipo C possuem uma estrutura de domínio tipo CTLD (*C type lectin like domain*), que permite a ligação a carboidratos a partir da mediação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (ZELENSKY; GREADY 2005). O domínio de reconhecimento de carboidratos (DRCs) das lectinas do tipo C contém uma sequência conservada de aproximadamente 115 aminoácidos, cuja estrutura tridimensional é formada por uma alça dupla e um domínio altamente conservado (ELUMALAI; LAKSHMI, 2022).

As taquilectinas, são um grupo de lectinas inicialmente encontradas na hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Tachyplesus tridentatus*) e que desempenham um papel crucial no sistema imunológico inato, reconhecendo e se ligando a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) na superfície de patógenos invasores (KAWABATA; TSUDA, 2002; KAWABATA, S.; SHIBATA, T., 2020).

Tabela 1 - Família de lectinas de esponjas marinhas.

NOME	ESPÉCIE	TAMANHO EM kDa (SUBUNIDADES)	LIGANTES	CÁTIONS
<b>Galectinas</b>				
ALL	<i>Aplysina lactuca</i>	30 (2)	Galactosídeos	Ca <sup>2+</sup>
AFL	<i>Aplysina fulva</i>	30 (2)	Galactosídeos	Nd
CchG 1	<i>Cinachyrella sp.</i>	50.0 (4)	Galactosídeos	Não
CchG 2	<i>Cinachyrella sp.</i>	50.0 (4)	Galactosídeos	Não
GCG	<i>Geodia cydonium</i>	60.0 (4)	Galactosídeos	Ca <sup>2+</sup>
HoL-30	<i>Halichondria okadai</i>	60.0 (2)	Galactosídeos	Não
CCL	<i>Chondrilla caribensis</i>	15.0 (4)	Galactosídeos	Nd
<b>Tipo C</b>				
AaL	<i>Aplysina archeri</i>	63.0 (4)	Galactosídeo não redutor	Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
AIL	<i>Aplysina lacunosa</i>	63.0 (4)	Galactosídeo não redutor	Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
AvL	<i>Aphrocallistes vastus</i>	34.0 (1)	Galactosídeos	Ca <sup>2+</sup>
<b>Taquilectinas</b>				
Ef lectin	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	24.0 (1)	Nd	Não
Sd lectin	<i>Suberites domuncula</i>	27.0 (1)	Lipopolissacarídeo	Não

Fonte: Adaptado de GARDÈRES *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2023; MARQUES *et al.*, 2018; MARQUES, 2021; SOUSA *et al.*, 2021 – Nd – Não determinado.

### 1.2.2 Lectinas de esponjas com ação antibacteriana

Diante da perspectiva na diversidade de funções que lectinas encontradas em esponjas são capazes de produzir, várias lectinas identificadas nesses organismos apresentaram atividade de aglutinação de bactérias e atividades antibacterianas, podendo ser utilizadas na detecção e combate a esses microrganismos.

Segundo Filho (2014), a lectina da *Aplysina fulva*, AFL, demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. A lectina presente na espécie *Chondrilla caribensis* (CCL) demonstrou a capacidade de reduzir a quantidade de biomassa de bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* (MARQUES *et al.*, 2018). A lectina ACL da esponja *Aplysina cauliformis* apresentou atividade aglutinante contra cepa de *E. coli* (VIANA, 2021). A lectina obtida de *Cliona varians*, CvL-1, demonstrou eficácia na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA *et al.*, 2006).

A lectina presente na esponja *Fasciospongia cavernosa*, uma lectina de ligação específica à galactose, mostrou uma atividade antibacteriana considerável *in vitro*, particularmente contra bactérias Gram-positivas, e exibiu uma forte atividade antibiofilme (SADANANDAN; RAUF, 2018).

### 1.2.3 Lectinas do gênero *Cliona*

Atualmente, há o relato de duas lectinas presente em esponjas do gênero *Cliona*: CvL-1 e CvL-2, ambas isoladas de *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2015).

CvL-1 é uma glicoproteína tetramérica com subunidades de 28 kDa e massa molecular nativa de 114 kDa. Essa proteína demonstrou um efeito citotóxico contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, a lectina demonstrou um efeito inibitório relativamente menos pronunciado no crescimento de bactérias Gram-negativas. CvL-1 foi também capaz de aglutinar promastigotas de *Leishmania chagasi* (MOURA *et al.*, 2006). Queiroz e colaboradores (2008) relataram que CvL-1 inibiu o crescimento de células humanas de leucemia da linhagem K562. Ademais a CvL-1 demonstrou potencial atividade pró-inflamatória em ratos, induzindo a

migração de neutrófilos, provavelmente por meio de uma via de ativação de macrófagos residentes e quimiotaxia mediada por citocinas (QUEIROZ *et al.*, 2008).

CvL-2 foi purificada através da combinação de precipitação com acetona, cromatografia de interação hidrofóbica e exclusão molecular. Em SDS-PAGE, a proteína apresentou massa molecular de aproximadamente 175 kDa. Além disso, CvL-2 exibiu toxicidade contra náuplios de artemia (MOURA *et al.* 2015).

Considerando o potencial biotecnológico das lectinas presentes nas esponjas marinhas do gênero *Cliona*, o presente trabalho teve como objetivo principal purificar e avaliar o efeito aglutinante de uma lectina da esponja marinha *Cliona celata*, frente a bactérias patogênicas.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Purificar uma nova lectina presente na esponja marinha *Cliona celata*, caracterizar e avaliar seu efeito aglutinante frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina da esponja *Cliona celata*.
- Avaliar a atividade hemaglutinante da lectina de *C. celata* contra eritrócitos de coelhos.
- Estabelecer a especificidade da lectina por carboidratos e glicoproteínas.
- Estimar a massa molecular da lectina por SDS-PAGE.
- Avaliar o efeito aglutinante contra bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta da esponja

Os espécimes da esponja *Cliona celata* foram coletados na zona entre marés da praia de Bitupitá, município de Barroquinha, Ceará. Todas as coletas, assim como o acesso ao patrimônio genético dos organismos marinhos foram reguladas e autorizadas pelos devidos órgãos ambientais, por meio de registros no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-12) e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9). O material biológico coletado foi armazenado em saco plástico, acomodado em caixa térmica, transportado até o laboratório e armazenado a -20 °C para uso posterior.

#### 3.2 Purificação da lectina

Para obtenção da lectina presente na esponja *C. celata*, os exemplares foram liofilizados, triturados, pesados e homogeneizados em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,6; contendo NaCl 150 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM, na proporção 1:10 (p/v). A mistura foi então mantida em agitação por 16 h a 4 °C. O homogeneizado foi filtrado em tecido de nylon para retenção de partículas grandes, e em seguida, foi centrifugado à 9.000 xg, por 20 minutos, à 4 °C. O precipitado resultante da centrifugação foi descartado e o sobrenadante foi denominado de extrato bruto.

Para isolamento da lectina, o extrato bruto foi submetido inicialmente a precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação, em seguida a mistura permaneceu por 4 h a 4 °C. A amostra foi centrifugada a 9.000 xg, por 20 minutos, à 4 °C e o precipitado foi solubilizado no mesmo tampão de extração sendo denominado de fração 0-70.

Posteriormente, a fração 0-70 foi dialisada, liofilizada e submetida a cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF acoplado ao sistema ÄKTA *pure* (GE Healthcare Life Sciences). Para tal, o material liofilizado foi solubilizado em pequena quantidade de tampão Tris-HCL 20 mM, pH 7,6 (TBS). O mesmo tampão de solubilização foi utilizado para equilíbrio da coluna e eluição foi realizada com aumento gradual na concentração de NaCl entre 0-1 M. O fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> foi mantido e

frações de 1 mL foram coletadas. A cromatografia foi monitorada por absorvância a 280 nm, as frações correspondentes à lectina foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para uso posterior.

Em seguida, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular, onde a lectina foi solubilizada em TBS, centrifugada e aplicada em coluna BEH SEC Column 200 Å 1,7 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.

### 3.3 Atividade hemaglutinante e inibição

Os testes de atividade hemaglutinante e de inibição da atividade hemaglutinante foram realizados usando eritrócitos humanos (A, B e O), coletados junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Também foram utilizados eritrócitos de coelhos mantidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A coleta de sangue foi regulada e autorizada por comitê de ética, por meio de autorização sob código CEUAP nº 2211202101. Os eritrócitos de coelhos foram usados em suas formas não tratadas com as enzimas proteolíticas. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação, de fundo “V”, a partir do método de duplas diluições seriadas, de acordo com Sampaio *et al.* (1998).

Para o teste de inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados os seguintes carboidratos e glicoproteínas: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α-D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafínose, metil-α-D-galactopiranosídeo, metil-β-D-galactopiranosídeo, metil-β-D-tiogalactose, fenil-β-D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo, α-metil-manosídeo, lactulose, β-lactose, sacarose, fenil-β-D-galactose, N-acetil-D-manosamina, transferrina humana, asilofetuína bovina, tiroglobulina suína, mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), mucina submaxilar bovina (BSM) e fetuína bovina.

### 3.4 Efeito de íons divalente na atividade hemaglutinante

O efeito de íons divalentes e EDTA (ácido dietiltetraacético) sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi avaliado conforme descrito por Sampaio *et al.* (1998), utilizando placas de microtitulação em V.

### 3.5 Avaliação da pureza da lectina

A pureza e homogeneidade da proteína foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sendo os géis corados com Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram preparadas na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, conforme descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada sob uma corrente elétrica constante de 25 mA e tensão de 150 V, com duração de uma hora.

### 3.6 Estimativa da massa molecular

A massa molecular da lectina foi estimada por SDS-PAGE, por meio da correlação da migração da proteína no gel com a migração dos marcadores moleculares de massa molecular conhecida, em condições não redutoras.

### 3.7 Ensaio de aglutinação bacteriana

O experimento envolveu o uso das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303, seguindo um método adotado por Melo e colaboradores (2014), com modificações. Todas as linhagens bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas contendo *Tryptic Soy Agar* (TSA) por 24 horas a uma temperatura de 37 °C.

Da placa com as bactérias crescidas foram escolhidas as colônias isoladas, que foram transferidas para 5 mL de caldo nutritivo *Trypticase Soy Broth* (TSB) e incubadas por mais 24 horas a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 2.000 xg por 10 minutos a 4 °C e lavadas três vezes com um tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo 150 mM de NaCl (TBS). Em seguida, as células foram ressuspendidas em TBS contendo formaldeído a 4% e mantidas a 4 °C por 24 horas. Após

a incubação com formaldeído, as células foram novamente lavadas com TBS e a concentração final das bactérias foi ajustada para  $2 \times 10^8$  por meio da leitura da absorbância a 620 nm de acordo com as curvas de crescimento pré-determinadas no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS).

Em microtubos foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das células bacterianas com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de lectina do P3, que foi obtida da cromatografia de troca iônica com concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e transferidas para lâminas antes da visualização.

Além disso, foi realizada uma análise da capacidade aglutinante da lectina na presença de tiroglobulina (glicoproteína inibidora), na qual a lectina foi pré-incubada com 50  $\mu\text{L}$  de tiroglobulina a uma concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  por 30 minutos. Após este período foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana. O grupo de controle consistiu apenas das células bacterianas, com ou sem a presença de tiroglobulina. A observação da atividade foi realizada utilizando um microscópio óptico Basic Trinocular Planocromático – K55TP.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante do extrato de *Cliona celata*.

O extrato de *Cliona celata* apresentou forte atividade hemaglutinante frente a eritrócitos nativos de coelho ( $2048 \text{ H.U.mL}^{-1}$ ). Este dado corrobora com os experimentos de Dodd *et al.*, (1968), que relataram o efeito aglutinante do extrato de *C. celata* frente a eritrócitos de coelho. Na ocasião também foi avaliado a atividade do extrato frente a eritrócitos humanos do sistema ABO, mas não houve hemaglutinação (DODD *et al.*, 1968).

A atividade hemaglutinante do extrato de *C. celata* foi inibida apenas pelas glicoproteínas asialofetuína, fetuína bovina e tiroglobulina suína (Tabela 2).

Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante de extrato de *Cliona celata*.

Glicoproteínas	CIM
Tiroglobulina suína	125 $\mu\text{g/mL}$
Asialofetuína bovina	125 $\mu\text{g/mL}$
Fetuína bovina	1000 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: o Autor (2023). Concentração inibitória mínima. Concentração inicial de glicoproteínas:  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A atividade hemaglutinante foi inibida por glicoproteínas que contém N-glicano do tipo complexo (tiroglobulina), assim como O-glicoproteínas (fetuína e asialofetuína bovina). Ambas as glicoproteínas possuem galactosídeos: na tiroglobulina possui a lactosamina (Gal  $\beta$ 1-4 GlcNAc) e Asialofetuína/Fetuína (Gal  $\beta$ 1-3GalNAc). Os dados também sugerem que a presença do ácido siálico compromete a união de carboidratos, visto que a forma desialilada da fetuína mostrou maior poder inibitório sobre a lectina. Em comparação, o extrato de *C. celata* quando estudado por Gold *et al.*, (1971) foi inibido contra galactose e derivados.

### 4.2 Efeito de íons divalente na atividade hemaglutinante do extrato de *Cliona celata*

A atividade hemaglutinante do extrato de *Cliona celata* mostrou ser independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A atividade hemaglutinante foi observada mesmo na presença EDTA, que é um composto que age como quelante de íons metálicos, fazendo com que lectinas dependentes de íons cálcio percam sua atividade hemaglutinante em sua

presença. As lectinas isoladas de *C. varians*, CvL-1 e CvL-2 mostraram ser dependentes de cálcio (MOURA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2015). Entretanto, várias lectinas de esponja marinha são independentes de íons divalente, tais como a *Aplysina cauliformis* (ACL), *A. fulva* (AFL) e *A. lacutuca* (ALL) (CARNEIRO *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2019; VIANA 2021).

### 4.3 Purificação parcial da lectina de *Cliona celata*

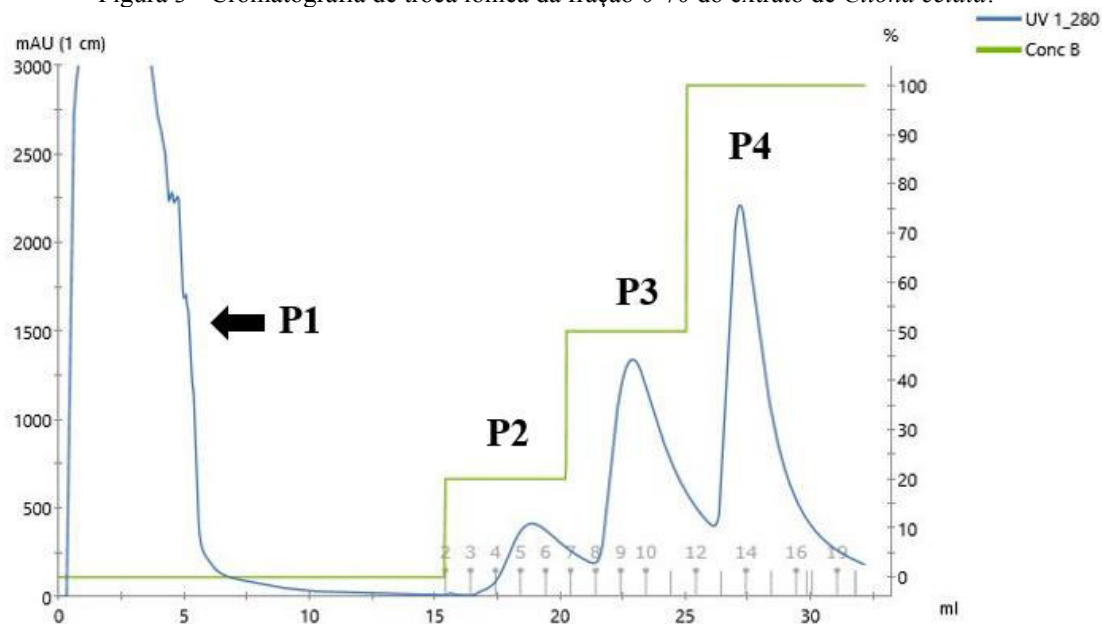
Uma nova lectina presente na esponja marinha *Cliona celata* foi parcialmente isolada por meio de uma combinação de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular.

A lectina presente no extrato bruto foi concentrada com a adição de sulfato de amônio da proporção 0-70% de saturação (F0-70).

A cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF da fração 0-70% foi efetiva no isolamento da lectina (P3), eluída através de um gradiente de NaCl 0-1M, que apresentou toda a atividade hemaglutinante retida na coluna, correspondendo as frações 8 a 12 (Figura 3).

A cromatografia de troca iônica é um método amplamente empregado para a purificação de lectinas, ela normalmente é utilizada como forma preliminar de separação. Lectinas isoladas das esponjas *Craniella australiensis* e *Haliclona caerulea* foram isoladas com auxílio desta cromatografia em combinação com outras técnicas (CARNEIRO *et al.*, 2013; XIONG *et al.*, 2006).

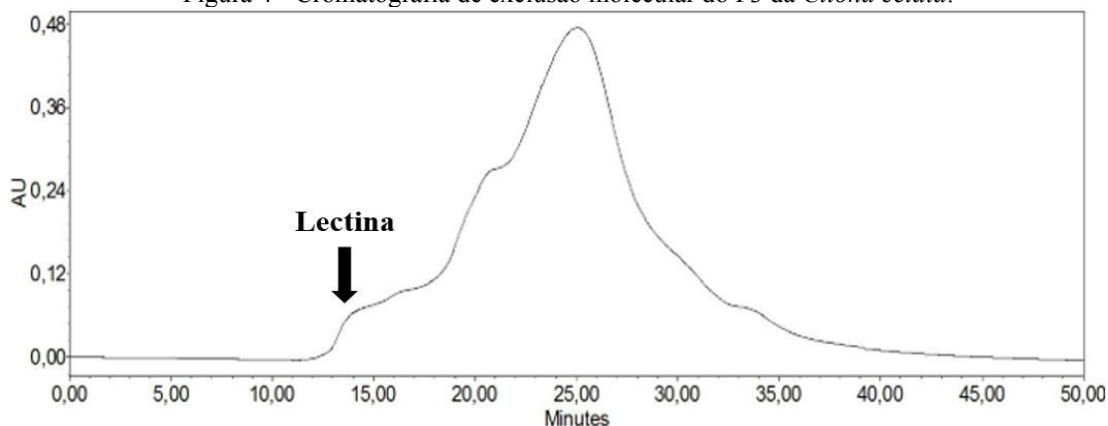
Figura 3 - Cromatografia de troca iônica da fração 0-70 do extrato de *Cliona celata*.



Fonte: o Autor, (2023). Cromatografia de troca iônica coluna HiTrap Q FF, acoplada a um sistema AKTA Pure (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão TBS, pH 7,6 e eluída com gradiente de sal NaCl entre 0-1 M. O fluxo foi mantido em 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os tubos coletados foram 8-12.

Após a cromatografia de troca iônica, a fração ativa (P3) foi submetida a cromatografia de exclusão molecular. A fração que apresentou atividade hemaglutinante foi eluída no minuto 13 da cromatografia (Figura 4).

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica empregada imprescindível no processo de purificação de lectinas. Os protocolos de purificação para as lectinas *Aplysina lacunosa* e *A. aarcheri* (MIARRONS; FRESNO, 2000) incluem esta cromatografia como método de purificação, bem como foi utilizada para outras lectinas de esponjas como a *Aplysina lactuca* (ALL) no qual mostrou um pico simétrico de 94 kDa (CARNEIRO *et al.*, 2017) e para *Aplysina fulva* (AFL) foi observado um pico de 150 kDa (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Figura 4 - Cromatografia de exclusão molecular do P3 da *Cliona celata*.

Fonte: o Autor, (2023). Cromatografia de exclusão molecular de P3 em coluna Acquity UPLC® Waters BEH SEC Column de 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm x 300 mm, 1/pkg. A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão TBS e pH 7,6. As frações foram monitoradas a 280 nm.

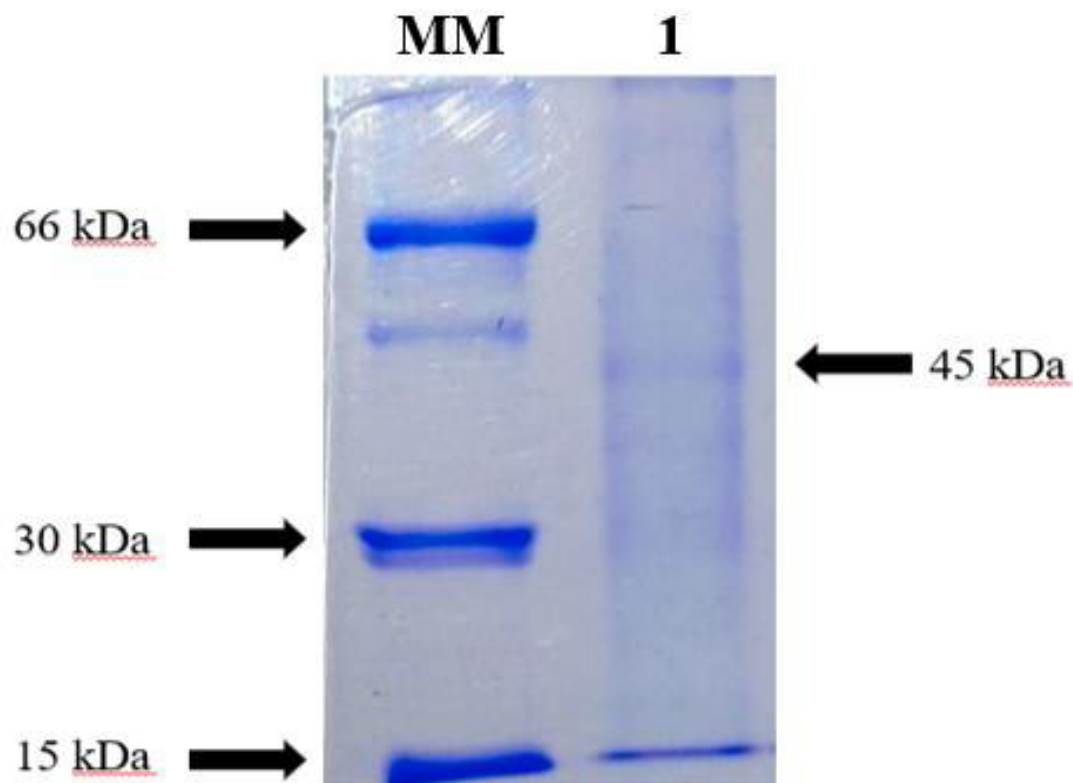
#### 4.4 Estimativa da massa molecular

Em SDS-PAGE, a lectina presente no P3 de *C. celata* apresentou uma banda majoritária com aproximadamente 45 kDa na ausência de β-mercaptoetanol, mas outras bandas são também visíveis no gel, indicando a necessidade de utilização de outras técnicas para completa purificação da lectina de *C. celata*.

As lectinas de *C. varians*, CvL-1 e CvL-2, apresentaram monômeros de 28 kDa e 175 kDa, respectivamente (MOURA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2015).



Figura 5 - Eletroforese em gel SDS-PAGE do P3 na ausência de agente redutor.

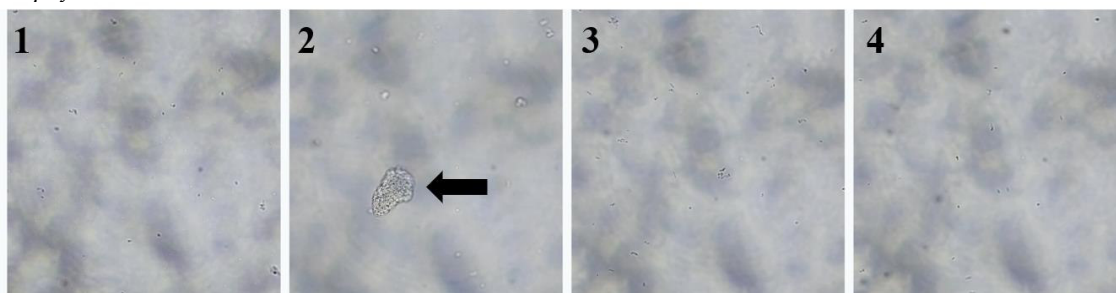


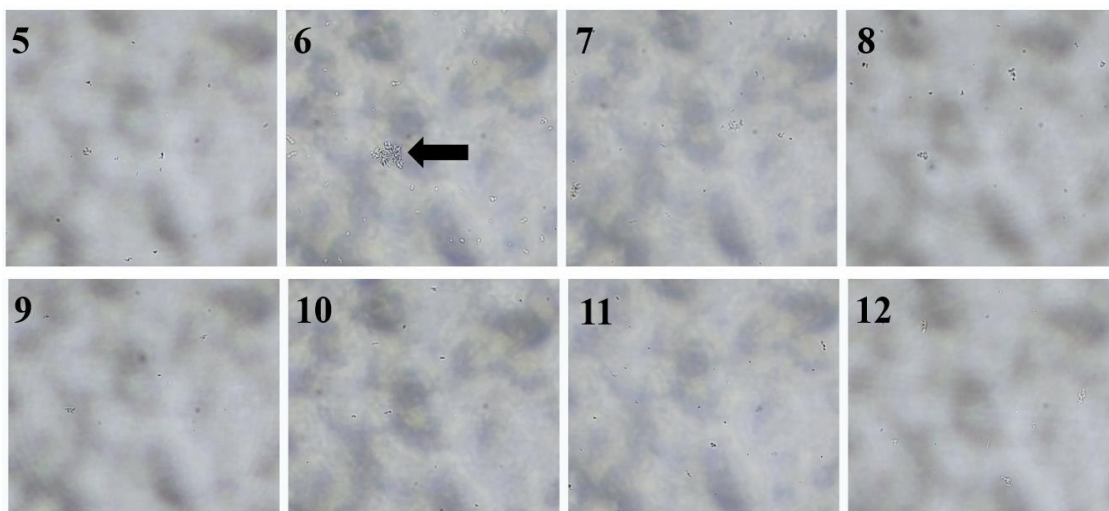
Fonte: o Autor, (2023). SDS-PAGE 15% contendo P3 de *Cliona celata*. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM: Marcador Molecular; 1: P3 na ausência de  $\beta$ mercaptoetanol.

#### 4.5 Aglutinação de bactérias *E. coli*, *S. epidermidis* e *Staphylococcus aureus*

A lectina de *C. celata* mostrou ser capaz de aglutinar a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11303. Entretanto, a proteína não foi capaz de aglutinar as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698 (Figura 6).

Figura 6 - Efeito aglutinante nas cepas de *Escherichia coli* ATCC 11303, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698.





Fonte: o Autor (2023). O efeito aglutinante do P3 foi verificado frente *Escherichia coli* ATCC 11303 e na *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 apenas. 1: Branco *E. coli*. 2: Lectina de *Cliona celata* contra *E. coli*. 3: Branco *E. coli* com tiroglobulina. 4: Lectina de *C. celata* frente *E. coli* com tiroglobulina. 5: Branco *S. epidermidis*, 6: Lectina de *C. celata* frente *S. epidermidis* 7: Branco *S. epidermidis* com tiroglobulina. 8: Lectina de *C. celata* frente *S. epidermidis* com tiroglobulina, 9: Branco *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. 10: Lectina de *C. celata* frente a *S. aureus* 25. 11: Branco *Staphylococcus aureus* ATCC 700698. 12: Lectina de *C. celata* contra *S. aureus* 70. Visualização em lente 40 X. Setas pretas indicam a aglutinação das células bacterianas.

O efeito aglutinante demonstrado pela lectina de *C. celata* frente às cepas bacterianas foi inibido pela presença da glicoproteína tiroglobulina, o que indica o envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina na interação com as células das bactérias.

Devido à capacidade das lectinas de reconhecer resíduos de açúcares específicos, algumas lectinas provenientes de esponjas podem se ligar a carboidratos particulares presentes nas paredes celulares de microrganismos, resultando em atividades antimicrobianas (GÁRDERES *et al.*, 2015).

A lectina presente na esponja *C. varians*, a CvL-1 apresenta efeito citotóxico em bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, a CvL-1 não afetou bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A lectina presente na esponja *Aplysina cauliformis*, ACL exibiu a capacidade de aglutinar *E. coli*, porém não demonstrou a mesma atividade contra *S. aureus* (VIANA, 2021).

A lectina presente na esponja marinha *Aplysina lactuca*, ALL, foi capaz de aglutinar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, mas não inibiu o crescimento planctônico dessas bactérias (CARNEIRO *et al.*, 2017).

## 5 CONCLUSÃO

Uma lectina de esponja marinha *Cliona celata* foi parcialmente purificada utilizando combinação de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e exclusão molecular. A proteína apresentou atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho, sua atividade foi inibida por glicoproteínas. Como potencial biotecnológico, foi observado que essa lectina demonstrou atividade de aglutinação contra cepas de *E. coli* e *S. epidermidis*. No entanto, se faz necessário estudos complementares para melhor compreensão das atividades biológicas dessa proteína.

## REFERÊNCIAS

- ADAMSKA, Maja. Phylum Porifera. In: **Invertebrate Zoology**. CRC Press, 2021. p. 121-136.
- AGUIAR, A. C. C. *et al.* Metabolites from Marine Sponges and Their Potential to Treat Malarial Protozoan Parasites Infection: A Systematic Review. **Marine Drugs**, 1 mar. 2021.
- AGUILAR-CAMACHO, J. M.; DOONAN, L.; MCCORMACK, G. P. Evolution of the main skeleton-forming genes in sponges (phylum Porifera) with special focus on the marine Haplosclerida (class Demospongiae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 131, p. 245–253, 1 fev. 2019.
- 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.
- BAH, C. S. F.; FANG, E. F.; NG, T. B. Medicinal applications of plant lectins. Em: **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**. Springer Netherlands, 2013. p. 55–74.
- 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.
- 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.
- CHEETRI, D. *et al.* Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, 1 ago. 2021.
- DAHIHANDE, A. S.; THAKUR, N. L. Differences in the Structural Components Influence the Pumping Capacity of Marine Sponges. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 17 nov. 2021.

DE CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J. M. **Review: The multiple roles of plant lectins.** *Plant Science* Elsevier Ireland Ltd, 1 dez. 2021.

DE PAULA, T. S. *et al.* Morphology and molecules on opposite sides of the diversity gradient: Four cryptic species of the *Cliona celata* (Porifera, Demospongiae) complex in South America revealed by mitochondrial and nuclear markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p. 529–541, jan. 2012.

DO 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, 5 jun. 2018.

DE VOOGD, *et al.* **World Porifera Database**. 2023. Disponível em: <<https://www.marinespecies.org/porifera>>. Acesso em 21 set. 2023.

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. *et al.* Structural Characterization of a Galectin from the Marine Sponge *Aplysina Lactuca* (ALL) with Synergistic Effects When Associated with Antibiotics against Bacteria. **Biochimie**, p. S0300908423001645, julho de 2023.

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.

ELOLA, M. T. *et al.* **Galectins: Matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, jul. 2007.

ELUMALAI, P.; LAKSHMI, S. **Lectins: Innate immune defense and therapeutics.** Springer Nature, 2022.

ERESKOVSKY, A.V.; LAVROV, A. I. Porifera E.B. LaDouceur (Ed.), **Invertebrate Histology**, Wiley, p.19-54 (2021).

ESPOSITO, R. *et al.* Marine Demospongiae: A Challenging Treasure of Bioactive Compounds. **Marine Drugs**, 1 abr. 2022.

FILHO, S. M. G. *et al.* Marine sponge lectins: Actual status on properties and biological activities. **Molecules**. 1 jan. 2015.

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.

FRANSOZO, Adilson; NEGREIROS-FRANSOZO, Maria Lucia. **Zoologia dos invertebrados.** Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016.

- GARDÈRES, J. *et al.* Porifera Lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.
- GOLDSTEIN, I. *et al.* What should be called a lectin? **Nature** 285, 66 (1980).
- GRANT, R. E. Notice of a New Zoophyte. *Cliona celata*, 1826.
- HANNA, C. *et al.* Zootaxa: *Cliona minuscula*, sp. nov. (Hadromerida: Clionidae) and other bioeroding sponges that only contain tylostyles. **Zootaxa**, v. 1312, p. 1–24, 2006.
- HOOPER, J. N. A. *et al.* Zootaxa 20 years: Phylum Porifera. Zootaxa. **Magnolia Press**, 28 mai. 2021.
- HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R.W.M. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*; **Kluwer Academic/Plenum Publishers: Dordrecht, The Netherlands**, 2002.
- KAWABATA S.; TSUDA R. Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. **Biochim Biophys Acta**. 2002.
- KAWABATA, S.; SHIBATA, T. (2020). Purification and Assays of Tachylectin-5. In: Hirabayashi, J. (eds) Lectin Purification and Analysis. **Methods in Molecular Biology**, vol 2132.
- 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.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685.
- LAVROV, A. I. *et al.* Fine details of the choanocyte filter apparatus in asconoid calcareous sponges (Porifera: Calcarea) revealed by ruthenium red fixation. **Zoology**, v. 150, 1 fev. 2022.
- LAVROV, A. I. *et al.* Sewing up the wounds: The epithelial morphogenesis as a central mechanism of calcaronean sponge regeneration. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 6–7, p. 351–371, 1 set. 2018.
- MANNELLI, L. D. C. *et al.* Pharmacological Activities of Extracts and Compounds Isolated from Mediterranean Sponge Sources. **Pharmaceuticals**, 1 dez. 2021.
- 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.

MELO, A. A. *et al.* HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber holothuria grisea binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 435–442, 2014.

MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus Aplysina. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29283–29289, 22 set. 2000.

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.

MOURA, R. M. *et al.* Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 973-984, 2015.

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.

QUEIROZ, A. F.S. *et al.* Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, p. 1023-1033, 2009.

RFITZLER, K.; RIEGER, G. **Sponge Burrowing: Fine Structure of *Cliona lampa* Penetrating Calcareous Substrata**, 1973.

SADANANDAN, R.; RAUF, A. A. Isolation, Purification and Characterisation of a Dgalactose and N-acetyl-D-galactosamine Specific Lectin from Marine Sponge *Fasciospongia cavernosa*. **Protein and peptide letters**, v. 25, n. 9, p. 871-877, 2018.

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.

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.

SIBBR. **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 out 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.

THOMPSON, Fabiano; THOMPSON, Cristiane. **Biotecnologia Marinha**. Rio Grande: Ed. FURG, 2020.

THOMS, C., *et al.* Chemical defense strategies in sponges: a review. **Porifera research: biodiversity, Innovation and sustainability**, v. 28, p. 627-637, 2007.

VAN SOEST, R. W. M. *et al.* Global Diversity of Sponges (Porifera). **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35105, 27 abr. 2012.

VARIJAKZHAN, D. *et al.* Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. **Marine Drugs 2021, Vol. 19, Page 246**, v. 19, n. 5, p. 246, 27 abr. 2021.

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.

XIONG, C. *et al.* A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 9–16, 2006.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**, dez. 2005.