



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

LEVI FERREIRA OTON

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA LECTINA DA
ESPONJA MARINHA *Aplysina cauliformis* EM COMBINAÇÃO COM
ANTIBIÓTICOS

FORTALEZA

2023

LEVI FERREIRA OTON

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA LECTINA DA ESPONJA
MARINHA *Aplysina cauliformis* EM COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

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)

- O96a Oton, Levi Ferreira.
Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos / Levi Ferreira Oton. – 2023.
42 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. Rômulo Farias Carneiro.
1. Lectina. 2. Esponja marinha. 3. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDD 639.2

LEVI FERREIRA OTON

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA LECTINA DA ESPONJA
MARINHA *Aplysina cauliformis* EM COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

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: 07/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Rômulo F. Carneiro (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Jessica A. Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha irmã Laís Oton.

Aos meus pais, Maria Jucilene Oton e
Claudenildo Oton.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por ter sido fiel com o seu propósito na minha vida desde o princípio. Sou grato por ter me permitido alcançar meus objetivos, por me dar esperança para seguir em frente, me amparar nos momentos difíceis, permitindo-me viver momentos incríveis, por me guiar e me abençoar em toda minha trajetória até aqui. Sem Ele nada eu poderia ter feito e toda honra seja dada à Deus.

Em especial aos meus pais Oton e Jucilene, principalmente por terem me criado no caminho do Senhor. Sou grato por me amarem incondicionalmente e se doarem tanto à minha formação.

À minha irmã Laís, pela amizade e cumplicidade, por experiências trocadas, conversas e carinho comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Engenharia de Pesca e Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar Lab, pela infraestrutura oferecida para a realização do trabalho.

Ao Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) pela infraestrutura e auxílio nas análises de atividade antibacteriana.

Ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e ao corpo docente que colaboraram com a minha formação acadêmica.

Ao meu orientador professor Dr. Alexandre Holanda Sampaio a quem tenho a mais profunda gratidão pela sua ajuda e incentivo para comigo desde o começo desse curso, quando me deu a oportunidade de conhecer a área da biotecnologia marinha. Não há palavras suficientes para expressar o impacto positivo que senhor teve em minha vida e em minha jornada acadêmica.

Ao professor Dr. Rômulo Farias Carneiro por ter me acompanhado durante toda minha graduação praticamente, pelos estágios, amizade, conversas, momentos de descontração, além disso, por ser um exemplo como pessoa e como profissional. Também agradeço por me aconselhar e me orientar com muita paciência e atenção, as quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Sou muito grato e feliz pelo senhor ter me ajudado tanto.

À doutoranda Jéssica Duarte e ao Prof. Dr. Rômulo por aceitarem fazer parte da banca e contribuições valiosas para a finalização deste trabalho.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves pelas orientações, pela paciência em transmitir o conhecimento, pela amizade e por ter contribuído em minha formação acadêmica.

Ao Programa de Educação Tutorial – PET por colaborar com minha formação acadêmica e pessoal.

Ao meu querido tutor e professor Reynaldo Marinho, por me receber no PET, direcionar em muitos momentos, por me motivar a persistir em melhorar cada vez mais na carreira acadêmica, além disso, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho durante o momento que estive sob sua tutoria.

Sou grato ao professor Manoel Furtado, que infelizmente nos deixou, por ter me ajudado a decidir coisas tão importantes na minha vida, pela amizade e por me direcionar a chegar até onde cheguei.

Aos meus amigos e companheiros de bancada Eduardo, Elany, Israel, João Marcelo e Philippe. Sou muito grato por dividir momentos ímpares na minha vida ao lado de todos vocês, pela parceria, sorrisos, risadas, apoio, motivação e pela ajuda prestada nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de faculdade, Matheus Viana, Simeão Pacheco e João Marcelo, pela amizade, ajuda nas dificuldades e companheirismo nos momentos felizes ao longo do curso.

“A fé é a certeza daquilo que esperamos e a prova das coisas que não vemos.”

(Hebreus 11:1)

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que têm a capacidade de se ligar a carboidratos específicos, desempenhando um papel fundamental em processos biológicos, como reconhecimento celular, adesão, resposta imune e regulação do crescimento celular. As lectinas de esponjas marinhas têm despertado interesse devido à sua diversidade estrutural e funcional, bem como às suas atividades biológicas. Essas proteínas podem apresentar propriedades antivirais, anticancerígenas, antimicrobianas e imunomoduladoras. As lectinas de esponjas marinhas têm demonstrado potencial como ferramentas para estudos de glicobiologia e para o desenvolvimento de terapias direcionadas a doenças relacionadas a distúrbios glicoproteicos. A pesquisa em lectinas de esponjas marinhas pode contribuir para avanços significativos na medicina, como o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais, anticancerígenos e antimicrobianos. Além disso, essas proteínas podem fornecer *insights* valiosos sobre os mecanismos de reconhecimento celular e imunidade, levando a uma melhor compreensão das doenças e a novas estratégias terapêuticas. O presente trabalho foi desenvolvido com foco em avaliar o efeito da lectina ACL isolada da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. Os ensaios realizados ao longo desse trabalho para extração e purificação de ACL consistiram em *salting in* e *salting out*, técnicas cromatográficas de afinidade e troca iônica combinadas. O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em gel SDS-PAGE, teste de quantificação de proteínas e atividade hemaglutinante. Foi determinada a composição de estrutura secundária da lectina por meio de dicroísmo circular, resultando em estrutura correspondendo a 57% folha- β . ACL foi submetida a ensaios combinados com antibióticos frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, os quais demonstraram o efeito sinérgico da lectina em combinação com antibióticos.

Palavras-chave: Lectina; Esponja marinha; Atividade Antibacteriana.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that have the ability to bind to specific carbohydrates, playing a fundamental role in biological processes such as cell recognition, adhesion, immune response, and regulation of cell growth. Lectins from marine sponges have attracted interest due to their structural and functional diversity, as well as their biological activities. These proteins can exhibit antiviral, anticancer, antimicrobial, and immunomodulatory properties. Lectins from marine sponges have shown potential as tools for glycobiology studies and for the development of therapies targeted at diseases related to glycoprotein disorders. Research on lectins from marine sponges can contribute to significant advancements in medicine, such as the development of new antiviral, anticancer, and antimicrobial drugs. Additionally, these proteins can provide valuable insights into cellular recognition and immunity mechanisms, leading to a better understanding of diseases and new therapeutic strategies. The present work was conducted with a focus on evaluating the effect of the ACL lectin isolated from the marine sponge *Aplysina cauliformis* in combination with the antibiotics ampicillin and tetracycline. The assays performed throughout this work for ACL extraction and purification consisted of salting in and salting out, combined affinity chromatography, and ion exchange techniques. The purification process was monitored by SDS-PAGE gel electrophoresis, protein quantification tests, and hemagglutination activity. The secondary structure composition of the lectin was determined using circular dichroism, resulting in a structure corresponding to 57% beta-sheet. ACL was subjected to combined assays with antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Escherichia coli* strains, which demonstrated the synergistic effect of the lectin in combination with antibiotics.

Keywords: Lectin; Marine Sponge; Antibacterial Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia geral da esponja e principais estruturas destacadas.	13
Figura 2 - Esquema do plano básico do corpo da esponja e alguns dos tipos de células especializadas encontradas nas esponjas.	14
Figura 3 - Arquitetura corporal de porífera. Condição asconoide, siconoide e leuconoide	15
Figura 4 - <i>Aplysina cauliformis</i> . Grande massa emaranhada de esponja (A). Poros exalantes dispostos em fileiras alinhadas ao longo dos ramos (B).....	16
Figura 5 - Galectinas prototypical apresentando um DRC (a). Galectina do tipo tandem-repeat com dois DRCs diferentes (b). Galectina-3 ou tipo chimera com região N-terminal ligada ao (c).....	19
Figura 6 – Etapas de preparação do extrato proteico.....	24
Figura 7 – Fluxograma de purificação da proteína.....	25
Figura 8 – Atividade hemaglutinante com diluição seriada em placa de microtitulação.	26
Figura 9 – Microplaca de 96 poços para ensaio com lectina ACL combinada com antibiótico.	28
Figura 10 – Cromatografia de afinidade de fração 0-100 por sulfato de amônio do extrato de <i>Aplysina fistularis</i>	29
Figura 11 – Cromatografia em coluna de troca iônica da amostra extraída da cromatografia de afinidade.	30
Figura 12 – Eletroforese em gel SDS-PAGE de ACL na presença e ausência de agente redutor.	31
Figura 13 – Cromatografia de exclusão molecular de ACL.....	32
Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular de ACL.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lectinas isoladas de esponjas.	21
Tabela 2 – Purificação da lectina presente em extrato de <i>Aplysina cauliformis</i>	33
Tabela 3 – Efeito da lectina ACL combinada aos antibióticos Ampicilina e Tetraciclina sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Esponjas marinhas	13
1.2	<i>Aplysina cauliformis</i>	16
1.3	Compostos bioativos de esponjas marinhas	17
1.4	Lectinas.....	18
1.5	Lectinas de esponjas marinhas	18
1.6	Efeito de lectinas sobre bactérias, biofilmes e antibióticos	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	METODOLOGIA	23
3.1	Material biológico	23
3.2	Preparação do extrato proteico	23
3.3	Purificação da lectina	24
3.4	Determinação da concentração de proteínas	25
3.5	Testes de Hemaglutinação	26
3.6	Avaliação da pureza da lectina.....	26
3.7	Dicroísmo circular de ACL.....	27
3.8	Atividade antibacteriana de ACL combinada com antibióticos	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Purificação da lectina	29
4.2	Determinação da Massa Molecular	30
4.3	Dicroísmo circular	32
4.4	Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante	33
4.5	Atividade de ACL combinada com antibiótico contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>Escherichia coli</i>	34
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

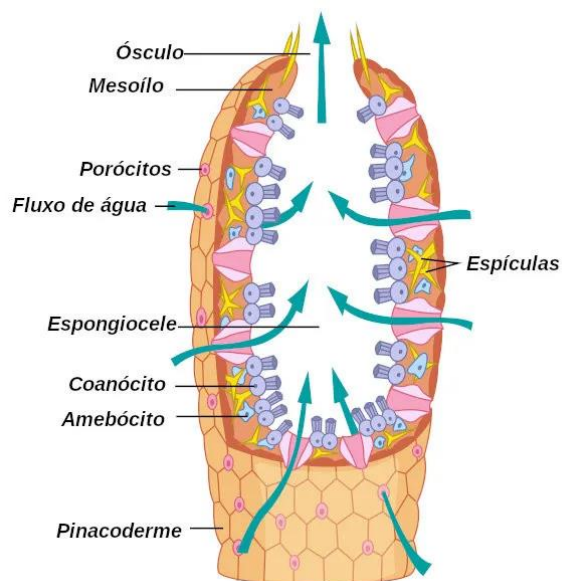
1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas marinhas

As esponjas são animais notáveis e onipresentes nas diversas profundidades dos ambientes aquáticos, estes organismos podem estar distribuídos desde zonas entre marés até regiões mais abissais do oceano. Inicialmente esses organismos eram considerados pertencentes ao reino *plantae* que em primeira impressão podem ser assim considerados, devido sua ausência de movimento, bem como pela sua estrutura ramificada (SARÀ, 2023). Atualmente as esponjas marinhas são caracterizadas como animais bentônicos (dispõem de meio de vida sésil fixo ao substrato), integrantes do filo porifera (do latim *porus* = poro, *ferre* = possuir), conhecidos como os metazoários mais primitivos que habitam o planeta Terra (VAN SOEST *et al.*, 2012).

Morfologicamente as esponjas mais simples apresentam um formato cilíndrico rico em poros na parede do corpo, com uma grande cavidade no seu interior, a qual se chama átrio ou espongiocèle. Sistematicamente, a água presente no meio entra no átrio por meio dos poros e posteriormente é expelida por uma grande abertura comum denominada ósculo. Vale destacar que os animais desse filo possuem uma imensa variação quanto a suas formas corporais, incluindo o tamanho do átrio, número de ósculo e a posição onde se encontram as células filtradoras de alimento (MORPHOLOGY OF SPONGES, 2023) (Figura 1).

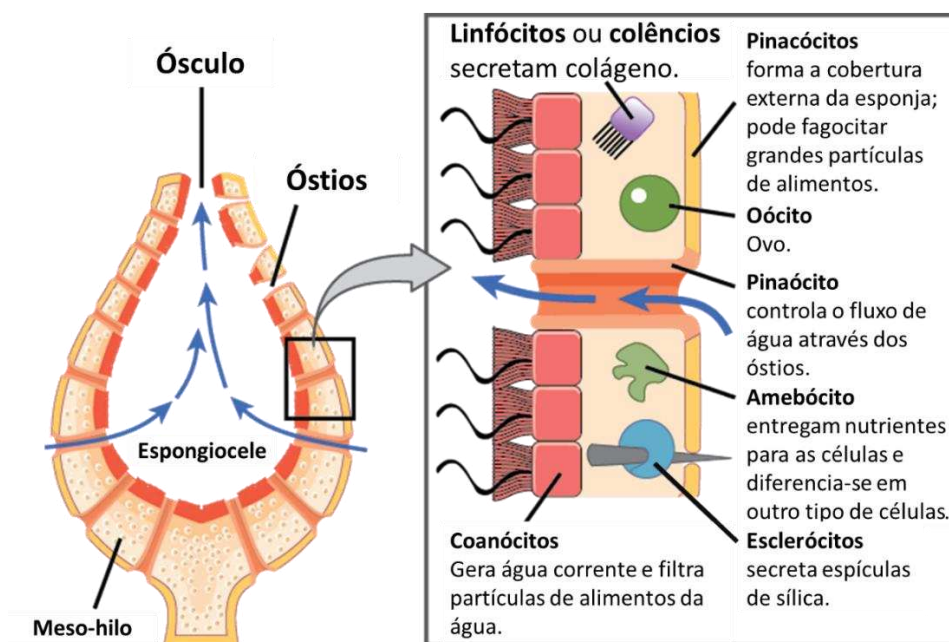
Figura 1 - Morfologia geral de esponjas e principais estruturas destacadas.



Fonte: Adaptado de Longman, (1999).

Variados tipos de células realizam atividades diferentes nas esponjas. Os pinacócitos, por exemplo, constituem a camada mais externa dos poríferos e cessam em uma camada gelatinosa conhecida como meso-hilo (matriz formada por gel semelhante ao colágeno). Existem também células especializadas, em formato tubular, que funcionam como válvulas reguladoras do fluxo de água, formando os óstios e conhecidas como porócitos (MORPHOLOGY OF SPONGES, 2023) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do plano básico do corpo da esponja e alguns dos tipos de células especializadas encontradas nas esponjas.



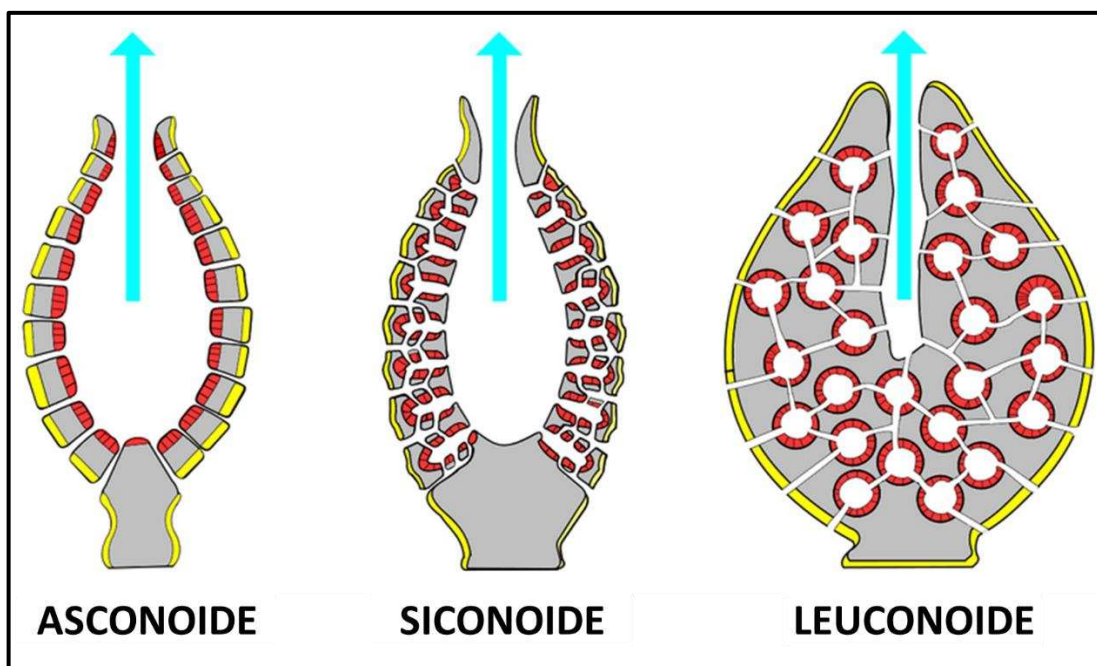
Fonte: Adaptado de Morphology of Sponges, (2023).

Os poríferos são desprovidos de trato digestivo, músculos e nervos, bem como sistemas de sinalização neuronal tradicionais, além de alguns genes essenciais que são comuns aos metazoários. As esponjas possuem raízes ciliares com estrias transversais nas células larvais e nos coanócitos, aspectos comuns a vários organismos do reino protista. No entanto, as esponjas possuem atributos que as classificam como metazoários, tais como, uniões especializadas entre as células, pluricelularidade advinda da deposição de camadas embrionárias, junções entre as células de modo especializado, reprodução sexuada, desenvolvimento de embriões por um conjunto de divisões a nível celular e capacidades sensoriais (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018).

Quanto a arquitetura, as esponjas podem ser agrupadas em três categorias. A estrutura asconoide possui uma coanoderme simples e contínua que reveste a espongiocele, nesse sistema

a água entra pelos óstios, passa pelos porócitos até chegar ao átrio e ser expelida pelo ósculo. Na estrutura siconoide a coanoderme apresenta dobras que formam os canais flagelados, esse sistema possui entrada de água pelos poros dermais que passam por vias condutoras e alcançam os canais flagelados, por fim, após passar pelo espongiocelo sai pelo ósculo. Na estrutura leuconoide a água entra no sistema por meio de poros dermais, passa por vias condutoras que terminam nas câmaras flageladas, enfim a água é levada por condutos eferentes e sai pelo ósculo (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018) (Figura 3).

Figura 3 - Arquitetura corporal de porífera. Condição asconoide, siconoide e leuconoide



Fonte: Wikimedia Commons, (2008).

No total as esponjas somam quase 11.000 espécies descritas. Taxonomicamente os poríferos são classificados em quatro classes: Hexactinellida (do latim *hex* = seis, *aktis* = raio, *ellus* = sufixo diminutivo), atribuídas de esqueleto formado por espículas de sílica e que preferem se estabelecer em águas profundas; Demospongiae (do grego *demos* = povo, *pongos* = esponja), nessa classe encontram-se espécies contendo espículas silicosas e de tipos variados exceto, hexactinais; Homoscleromorpha (do latim *homos* = igual, *skleros* = duros, *morphe* = forma), apresentam espículas muito pequenas e com forma simples ou em alguns casos ausência delas, sendo encontradas em profundidades que vão desde as áreas costeiras até a 8600 m; e Calcarea (do latim *calcis* = calcário), que possuem espículas constituídas por carbonato de cálcio. (CÁRDENAS, 2015; GAZAVE *et al.*, 2012; HABENER; HOOPER; CARROLL, 2016; MORROW; SPERLING *et al.*, 2010; VAN SOEST *et al.*, 2023).

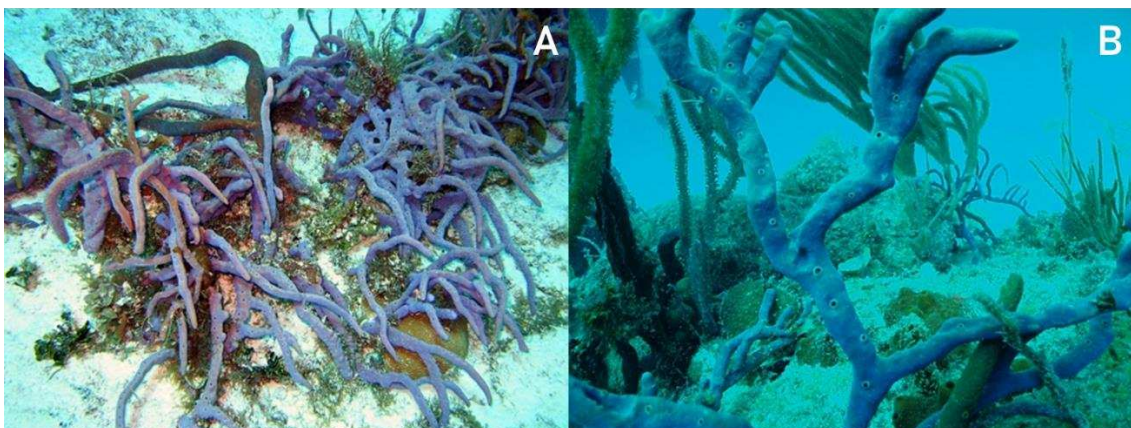
1.2 *Aplysina cauliformis*

A *Aplysina cauliformis* pertence a classe demospongiae e gênero *aplysina*. Das 10.900 espécies de esponjas descritas até o momento, pelo menos 81% pertencem a classe Demospongiae (VAN SOEST *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2017), sendo conhecida como a classe mais abundante em espécie além de grande variedade morfológica (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018).

A família Axinellidae é formada geralmente por esponjas incrustantes, maciças, ramificadas, em forma de leque e tubulares; muitas vezes atribuídas de coloração vermelha, laranja ou amarela; superfície é geralmente aveludada para eriçada devido à projeção de espículas coanossômicas. Os poríferos dessa família estão amplamente distribuídos em águas rasas ou profundas, presentes principalmente, em recifes de corais (ALVAREZ & HOOPER, 2002). São aproximadamente 350 espécies muitas das quais são consideradas importantes do ponto de vista ecológico (WORMS - WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES, 2023).

A espécie *Aplysina cauliformis* possui formato de corda, formando grandes massas intrincadas que chegam a medir mais de 1 metro de comprimento. A esponja apresenta cor malva ou roxa, seus poros ou ósculos, encontram-se alinhados e distribuídos ao longo de seus ramos e possuem bordas abauladas (CORALPEDIA - *Aplysina cauliformis* a, 2023) (Figura 4).

Figura 4 - *Aplysina cauliformis*. Grande massa emaranhada de esponja (A). Poros exalantes dispostos em fileiras alinhadas ao longo dos ramos (B).



Fonte: Adaptado de Coralpedia, (2023).

1.3 Compostos bioativos de esponjas marinhas

As esponjas marinhas são responsáveis por uma série de compostos bioativos sintetizados como os esteróis, terpenos, nucleosídeos, peptídeos cíclicos e alcalóides (VARIJAKZHAN *et al.*, 2021). Graças a essa capacidade de sintetizar uma série de moléculas, que possuem a característica de beneficiar o sistema de defesa, as esponjas se destacam como uma fonte de biomoléculas, com potencial para aplicação na biomedicina (KIM; DEWAPRIYA, 2012; ROUÉ *et al.*, 2012).

Na literatura são descritos exemplos de compostos extraídos de diversos poríferos que resultaram em atividades de interesse, como o depsipeptídeo conhecido como Papuamida A, isolado a partir de *Theonella mirabilis* e *T. swinhoei*, o qual mostrou proteger células leucêmicas em cultura contra infecção pelo HIV-1 *in vitro* (FORD *et al.*, 1999). Homofiminas extraídas da esponja *Homophymia* sp. apresentaram efeito citotóxico em células de câncer (ZAMPELLA *et al.*, 2009). Da esponja *Geodia corticostylifera* foi extraída a Geodiamolida H, que apresentou efeito inibitório em células de câncer de mama. Da esponja *Haliclona* sp. foram isoladas Halipeptinas, que são compostos conhecidos por possuírem atividade anti-inflamatória com efeito dependente da dose (RANDAZZO *et al.*, 2001).

A partir da esponja *Stylotella* sp. foi isolado o stilopeptídeo 2, esse apresenta atividade antileucêmica (BRENNAN *et al.*, 2008). Da esponja *Discodermia* sp. foram obtidos tetradecapeptídeos citotóxicos que demonstraram efeito inibitório na proliferação de células cancerígenas e leucêmicas (MATSUNAGA; FUSETANI; KONOSU, 1985).

Um composto glicosilado, conhecido como karimanone, derivado da esponja marinha *Xestospongia* sp., se mostrou ativo contra uma cepa multirresistente de *Salmonella entérica* (SIBERO *et al.*, 2020). Da esponja marinha *Axinella cannabina* foi isolado o fungo *Talaromyces rugulosus* que produziu derivados de lactona, que apresentaram efeito citotóxico contra células de linfoma murino (KÜPPERS *et al.*, 2017).

Os exemplos mais relevantes de compostos extraídos de poríferos são: o antiviral comercializado 9-β-D-arabinofuranosiladenina, conhecido comumente como Ara-A ou Vidarabina e o antileucêmico arabinofuranosil ou simplesmente Ara-C ou citarabina, ambos são compostos derivados da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, que também são conhecidos por serem os primeiros medicamentos de origem marinha a serem aprovados para o uso em humanos (BERGMANN; FEENEY; PFIZER, 1951).

1.4 Lectinas

Na segunda metade do século XIX, o microbiologista Hermann Stillmark descreveu pela primeira vez a existência de proteínas com capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos. Em 1954 Boyd e Shapleigh analisaram que essas proteínas aglutinavam de forma seletiva eritrócitos do sistema ABO, assim nomearam como “lectina” do latim *legere* que significa escolher. A definição para essas macromoléculas está em constante evolução, nos dias atuais as lectinas são descritas como proteínas ou glicoproteínas com capacidade de se ligar aos carboidratos de forma reversível (OCÁDIZ, 2023; SOL *et al.*, 2006; VASTA; AHMED, 2009).

As lectinas são responsáveis por muitos processos biológicos, podendo citar reconhecimento celular, mecanismo de defesa contra vírus e bactérias (BRZEZINSKA & BUJACZ, 2020; SHARON & LIS, 2004). As lectinas possuem capacidade anticâncer, pois a propriedade intrínseca da lectina permite que a mesma se ligue a resíduos de açúcar específicos em glicoproteínas e até mesmo complexos glicolipídicos, faz com que ela se torne uma candidata apta para estudos biomédicos. Por esse motivo diversas lectinas têm sido utilizadas no tratamento contra câncer, e em alguns casos com êxito, avançando para ensaios pré-clínicos e clínicos. Atividades antidiabéticas também são proporcionadas por lectinas, nesse aspecto, os estudos apresentam o efeito positivo das lectinas em pacientes diabéticos. As lectinas exibem ação fungicida, por meio de suas ligações com quitina e outros glicanos encontrados na superfície do fungo. As lectinas dispõem também de atividade antiparasitária, foi relatado que alguns parasitas responsáveis por causar infecções como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.*, sofrem interferência nos processos biológicos (MISHA *et al.*, 2019).

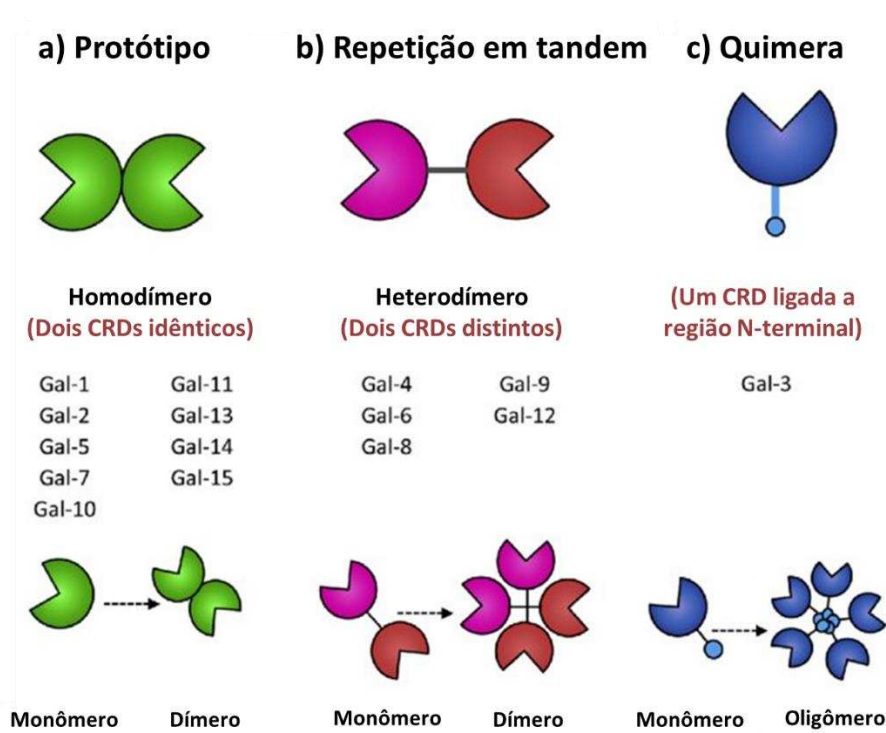
1.5 Lectinas de esponjas marinhas

Atualmente se tem conhecimento de aproximadamente 45 lectinas isoladas a partir das espécies de esponjas conhecidas, essas macromoléculas por sua vez já apresentaram potencial biotecnológico significativo (DUARTE, 2022). As lectinas são agrupadas em diferentes famílias (Tabela 1) de acordo com dois fatores principais: a seletividade de ligação e sequência de aminoácidos. Nas esponjas já foram descritas lectinas pertencentes as seguintes famílias: galectinas, taquilectina e tipo C, entretanto existem outras lectinas que não foram agrupadas em famílias e sim quanto a sua especificidade de ligação (GARDÈRES *et al.*, 2015).

As galectinas, anteriormente denominadas como lectinas do tipo S, são conhecidas por apresentarem seletividade de ligação a resíduos β -galactosídeos. No nível extracelular as galectinas se ligam a células unindo-se aos glicanos e a matriz extracelular. Além disso, as

lectinas pertencentes a essa família podem ser encontradas no citoplasma e no núcleo celular (HIRABAYASHI; KASAI, 1993; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). As galectinas estão agrupadas em subfamílias de acordo com sua arquitetura estrutural, sendo assim existem três tipos diferentes: o modelo protótipo, que possui um único domínio de reconhecimento ao carboidrato DRC e também pode formar homodímeros (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15); o tipo quimera (galectina-3), essa possui uma região não lectínica com cerca de 120 aminoácidos ligada ao DRC; E a galectina do tipo repetição em tandem que possui dois DRCs (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) (Homólogos) em uma única cadeia polipeptídica ligados por um linker de aproximadamente 70 aminoácidos (MÜNCHEN *et al.*, 2016; UNAJAK *et al.*, 2015; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008) (Figura 5).

Figura 5 - Galectinas prototypical apresentando um CRD (a). Galectina do tipo tandem-repeat com dois CRDs diferentes (b). Galectina-3 ou tipo chimera com região N-terminal ligada ao CRD (c).



Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, (2019)

As taquilectinas são uma classe de lectinas descritas pela primeira vez no caranguejo-ferradura (*Tachypleus tridentatus*) (SHIMIZU; ITO; NIWA, 1977). As proteínas relacionadas a essa divisão apresentam seis domínios de ligação repetidos ao longo de sua estrutura (FUNAYAMA *et al.*, 2005; LÓPEZ, 2022; SCHRÖDER *et al.*, 2003).

Nos poríferos há também as lectinas do tipo C. Inicialmente a terminologia tipo C foi utilizada para descrever as lectinas com dependência de ligação a Ca^{2+} , no entanto com avanços nas pesquisas foi descoberto que as lectinas dessa divisão apresentavam características semelhantes no aspecto de domínio de reconhecimento de carboidratos (DRICKAMER, 1993; LÓPEZ, 2022).

1.6 Efeito de lectinas sobre bactérias, biofilmes e antibióticos

As lectinas recebem destaque devido seu grande potencial de aplicação biotecnológica. Foram descritas diversas atividades antibacterianas dessas macromoléculas. A lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (CCL) é uma proteína homotetramérica que apresentou capacidade de aglutinar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, além de reduzir a biomassa do biofilme bacteriano (MARQUES *et al.*, 2018).

Outra lectina amplamente estudada foi a AFL, oriunda de *Aplysina fulva*, essa proteína demonstrou-se capaz de inibir o crescimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *C. tropicalis* (FILHO, 2014). Carneiro e colabores (2019) destacaram ainda que a AFL reduziu significativamente a formação do biofilme bacteriano de células patogênicas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*.

Também foi avaliado o potencial antimicrobiano de lectinas em combinação com antibióticos. A lectina extraída da planta *Alpinia purpurata* (ApuL) conjugada com oxacilina, fluconazol e ceftazidima revelou efeito de sinergismo contra diferentes cepas bacterianas testadas, que exibiram resistência ao antibiótico de forma isolada (FERREIRA *et al.*, 2018). Da lectina CasuL isolada a partir da planta *Calliandra surinamensis* foi avaliado o potencial antibacteriano quando combinada CasuL com ampicilina e tetraciclina. As combinações entre a lectina e os antibióticos resultaram em efeito sinérgico e demonstraram reduzir o biofilme bacteriano (PROCÓPIO *et al.*, 2019).

Da esponja *Aplysina lactuca* foi isolada a ALL, essa lectina foi submetida a ensaios frente a cepas bacterianas gram positivas e gram negativas, onde a lectina destacou potencial antibacteriano por aglutinar ambas as células patogênicas testadas, bem como, reduzir a massa microbiana do biofilme (CARNEIRO *et al.*, 2017). Recentemente a ALL foi submetida a ensaios com foco em avaliar o potencial antimicrobiano da lectina em combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina, que não só inibiu contra cepas multiresistentes como também potencializou o efeito dos antibióticos (DUARTE, 2022).

Tabela 1 – Famílias de lectinas isoladas de esponjas.

NOME	ESPÉCIE	TAMANHO EM kDa (SUBUNIDADES)	LIGANTES	CÁTIONS
Galectinas				
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 ²⁺
HoL-30	<i>Halichondria okadai</i>	60.0 (2)	Galactosídeos	Não
CCL	<i>Chondrilla caribensis</i>	15.0 (4)	Galactosídeos	nd
CaL	<i>Cinachyrella alloclada</i>	16 (2)	Galactosídeos	Ca ²⁺
ALL	<i>Aplysina lactuca</i>	15 (4)	Galactosídeos	Ca ²⁺
Tipo-C				
AaL	<i>Aplysina archeri</i>	63.0 (4)	Galactosídeo não redutor	Ca ²⁺ /Mg ²⁺
AIL	<i>Aplysina lacunosa</i>	63.0 (4)	Galactosídeo não redutor	Ca ²⁺ /Mg ²⁺
AvL	<i>Aphrocallistes vastus</i>	34.0 (1)	Galactosídeos	Ca ²⁺
PsL	<i>Pellina semitubulosa</i>	200.0 (6)	Galactosídeo/arabinose	Ca ²⁺
Tachylectinas				
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 GARDERES *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2023; MARQUES *et al.*, 2018; nd – Não determinado

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano da lectina ACL, isolada da esponja marinha *Aplysina cauliformis*, em combinação com antibióticos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade hemaglutinante de extratos proteicos da esponja marinha.
- Purificar lectina ACL da esponja marinha *A. cauliformis*.
- Avaliar estrutura secundária de ACL por difração circular.
- Avaliar potencial de ACL combinada com antibióticos ampicilina e tetraciclina frente as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*.

3 METODOLOGIA

3.1 Material biológico

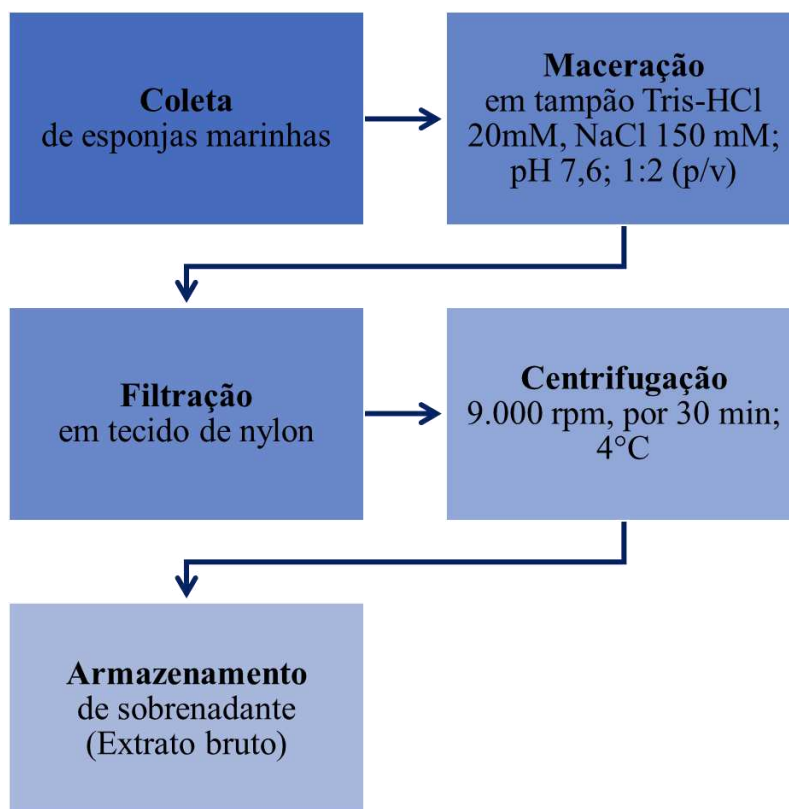
Espécimes de *Aplysina cauliformis* foram coletados em um ponto de mergulho do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (03°35'19" S e 038°24'32" W), localizado no município de Fortaleza, litoral do Ceará. As coletas, bem como o acesso ao patrimônio genético das esponjas foram reguladas e previamente autorizadas pelos devidos órgãos ambientais, por intermédio de registros no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-8) e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9).

O material biológico foi armazenado dentro de sacos plásticos e acomodado em caixa térmica sendo então transportado até o laboratório, onde foi armazenado a -20 °C até posterior uso.

3.2 Preparação do extrato proteico

As etapas de obtenção do extrato total de *Aplysina cauliformis* estão apresentadas na figura 6. Os espécimes foram cortados em pequenos pedaços, suspensos e macerados em tampão Tris-HCl 20mM, de pH 7,6, contendo NaCl 150 mM (TBS), seguindo a proporção 1:2 (p/v). A mistura foi filtrada em tecido de nylon, de modo que as partículas maiores ficaram retidas na malha, em seguida, a mistura foi centrifugada à 9.000 xg, por 30 minutos, à 4 °C. O precipitado resultante da centrifugação foi descartado e o sobrenadante, denominado de extrato bruto.

Figura 6 – Etapas de preparação do extrato proteico.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

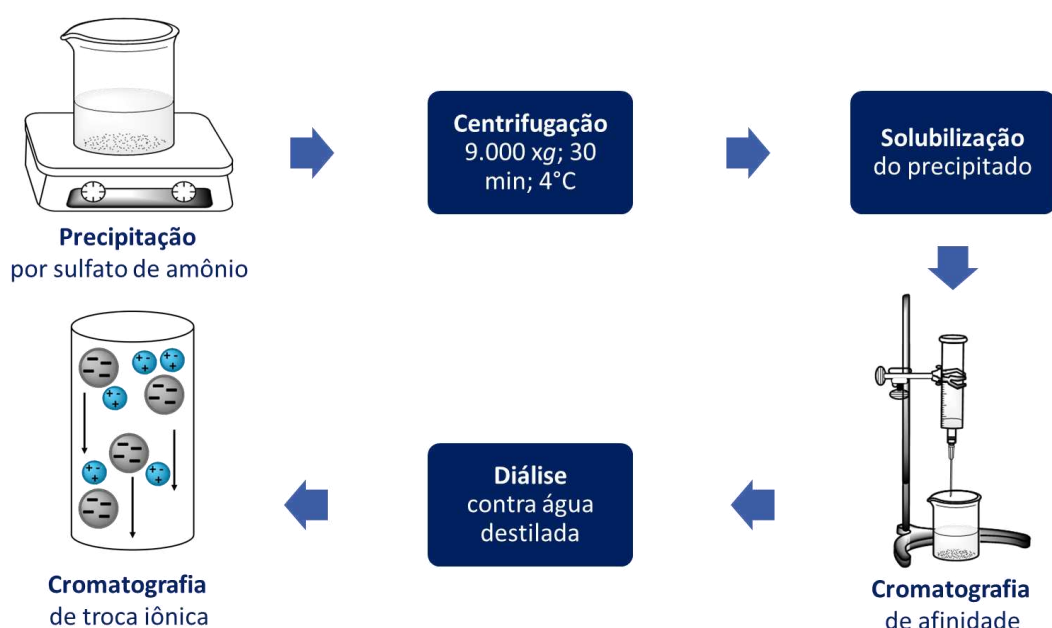
3.3 Purificação da lectina

A lectina presente na esponja marinha *A. cauliformis* foi obtida seguindo o protocolo prévio estabelecido por Viana (2021) com algumas modificações. Para isolamento da lectina, o extrato bruto foi submetido inicialmente a precipitação com sulfato de amônio a 100% de saturação, em seguida a mistura permaneceu por 4 h a 4 °C. A amostra foi centrifugada a 9.000 xg, por 30 minutos, à 4°C e o precipitado foi solubilizado no mesmo tampão de extração sendo denominado de fração 0-100.

A princípio foi realizada uma cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B. Nesse trabalho foram aplicados 30 mL de fração 0-100 em coluna de afinidade 6B (1,0 x 5,0 cm), previamente equilibrada com TBS. As frações não retidas na coluna foram lavadas com TBS até atingirem absorvância abaixo de 0,02 a uma leitura de 280 nm. O tampão TBS com lactose 300 mM foi utilizado para eluir as proteínas retidas na matriz, nessa etapa os eluatos com absorvância acima de 0,02 foram coletados, denominados de P2 Sepharose e armazenados a - 20 °C até posterior uso.

As frações da cromatografia foram reunidas e dialisadas contra água destilada e ultra pura, sendo então liofilizadas. A cromatografia de troca iônica compreendeu a etapa seguinte, sendo realizada em coluna HiTrap Q FF acoplado ao sistema automático ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences). O material liofilizado foi solubilizado em pequena quantidade de tampão Tris-HCL 20 mM, pH 7,6. 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 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ foi mantido e frações de 1 mL foram coletadas. A cromatografia foi monitorada por absorvância a 280 nm .

Figura 7 – Fluxograma de purificação da proteína.



Fonte: Elaborado pelo Autor, (2023)

3.4 Determinação da concentração de proteínas

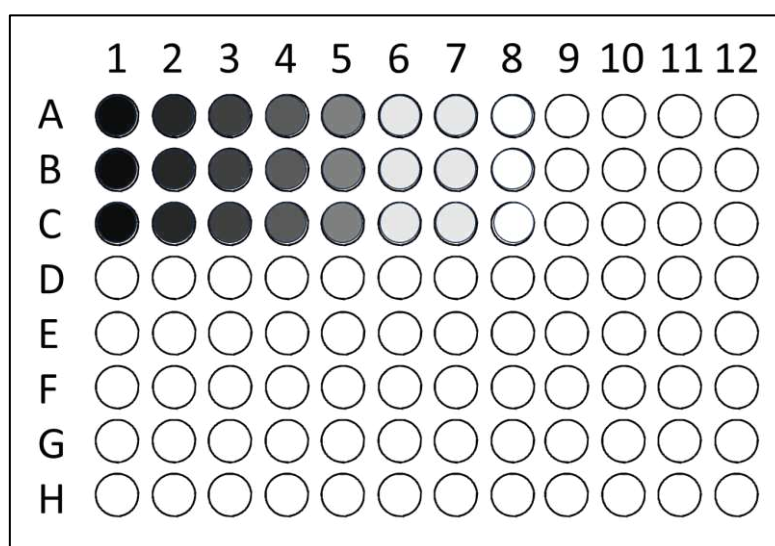
Durante a extração até a etapa final de purificação da lectina foram coletadas frações e submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 2002) bem como para determinação da concentração de proteínas totais pelo teste de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.5 Testes de Hemaglutinação

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados usando eritrócitos de coelhos, mantidos no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará sob autorização CEUAP 2211202101. A lavagem dos eritrócitos ocorreu 6 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 foram realizados em placas de microtitulação, com fundo em formato “V”, a partir do método de diluição seriada, seguindo a metodologia padrão (SAMPAIO, *et al.*, 2002).

Figura 8 – Atividade hemaglutinante com diluição seriada em placa de microtitulação.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

* Esquema da placa de microtitulação. A diluição progressiva da amostra proteica foi realizada no sentido horizontal, partindo dos poços na coluna 1 em diante.

3.6 Avaliação da pureza da lectina

A pureza e homogeneidade da proteína foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As amostras foram preparadas na presença e ausência de β -mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). O gel foi sujeito a uma corrente elétrica constante de 25 mA e tensão de 150 V, com duração de uma hora.

A massa molecular da proteína alvo foi estimada através da comparação da migração da lectina purificada com proteínas de peso molecular previamente conhecido.

Também foi estimada a massa molecular nativa por meio de cromatografia de exclusão molecular, em coluna BEH SEC de 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm x 300 mm, 1/pkg, acoplada a um sistema UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Acquity (Waters).

3.7 Dicroísmo circular de ACL

A determinação da composição da estrutura secundária da lectina ACL foi feita utilizando espectropolarímetro, Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) ligado a um *peltier* com controle de temperatura.

A lectina foi solubilizada em uma solução de fosfato 20 mM e pH 7, com concentração de 0,2 mg.mL⁻¹ e disposta em cubeta de quartzo retangular com caminho óptico de 5 mm. Os espectros foram adquiridos no intervalo entre 190 e 240 nm (far-UV), a uma velocidade de varrimento de 50 nm.min⁻¹. O percentual das estruturas secundárias, α-hélice, β-folha e estrutura desordenada foram estimadas utilizando o algoritmo e base de dados Selcon 3 (SREERAMA; WOODY, 2000) acessado pelo servidor *on-line* DichroWeb (WHITMORE; WALLACE, 2008).

3.8 Atividade antibacteriana de ACL combinada com antibióticos

A avaliação do efeito da lectina ACL combinada aos antibióticos foi realizada através do método *checkerboard*, descrito nos trabalhos realizados por Lechartier, Hartkoom e Cole (2012) com adaptações.

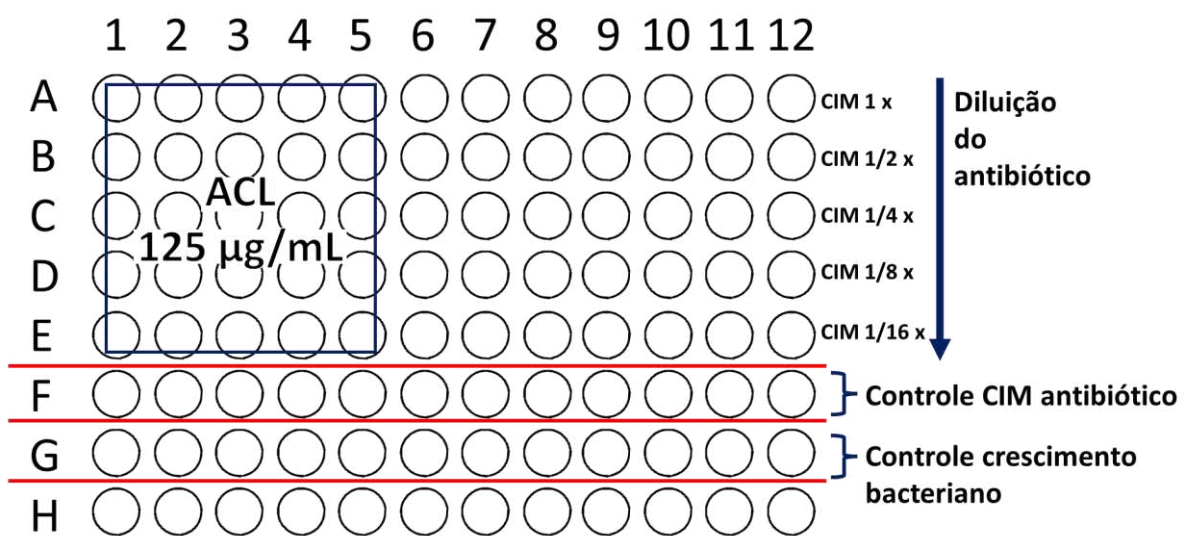
O método resume-se em múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Este método consiste em colunas contendo concentrações diferentes da droga “A” diluídas ao longo do eixo x, e linhas contendo as concentrações da droga “B” ao longo do eixo y (LORIAN, 2005).

Para este estudo, foi avaliada a combinação de ACL com os antibióticos ampicilina e tetraciclina, contra todas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *S. aureus* ATCC 700698 *S. epidermidis* ATCC 35984 *Escherichia coli* ATCC 11303.

Para cada combinação testada foram usados 25 poços da microplaca de 96 poços (Figura 9) de fundo em "U", das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, das linhas A a E nas concentrações da CIM, 1/2 x CIM, 1/4 x CIM, 1/8 x CIM e 1/16 x CIM, e a lectina na concentração constante de 125 µg/mL nas colunas 1 a 5. Tanto os antibióticos quanto a lectina foram diluídos separadamente em placas de microtitulação, e logo em seguida foram misturados em nova placa, que foi preenchido

com 50 μL do antibiótico, 50 μL da lectina e 100 μL do inóculo bacteriano previamente ajustado. A linha F foi usada como controle da CIM do antibiótico, e a linha G como controle do crescimento bacteriano. Logo após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas e para a determinação da nova CIM em combinação, a D.O foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (Spectramax).

Figura 9 – Microplaca de 96 poços para ensaio com lectina ACL combinada com antibiótico.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

Para bactérias que apresentaram valores iguais a 1/2x CIM, considerou-se efeito aditivo; valores entre 1/4 e 1/16, efeito sinérgico, valores 1x CIM, 2x CIM, considerou-se como não interação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

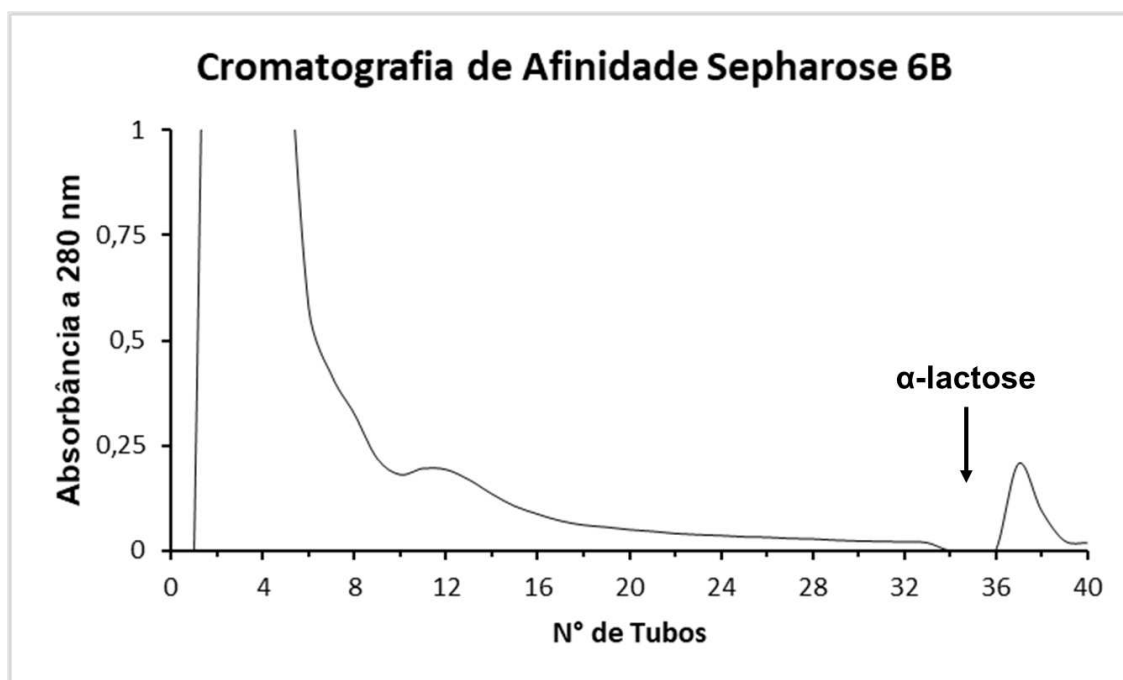
4.1 Purificação da lectina

Na primeira cromatografia, realizada em coluna de Sepharose 6B, o extrato proteico apresentou um pico retido, o qual foi eluído com lactose contida no tampão de equilíbrio (Figura 10).

É descrito na literatura que a purificação com uso de cromatografia de afinidade foi realizada para as lectinas das esponjas marinhas *Aplysina lactuca* (ALL) (CARNEIRO *et al.*, 2017), *Aplysina fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019) e *Aplysina fistularis* (ANDRADE, 2022).

Após a cromatografia de afinidade as frações retidas foram submetidas a cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap Q FF, onde foram coletadas as frações eluídas entre o tubo 21 e o 26 (Figura 11). A purificação por meio de combinação cromatográfica é relatada na purificação das lectinas de *Haliclona caerulea* (H-3) (CARNEIRO *et al.*, 2013) e *Haliclona manglaris* (HMA) (CARNEIRO *et al.*, 2015).

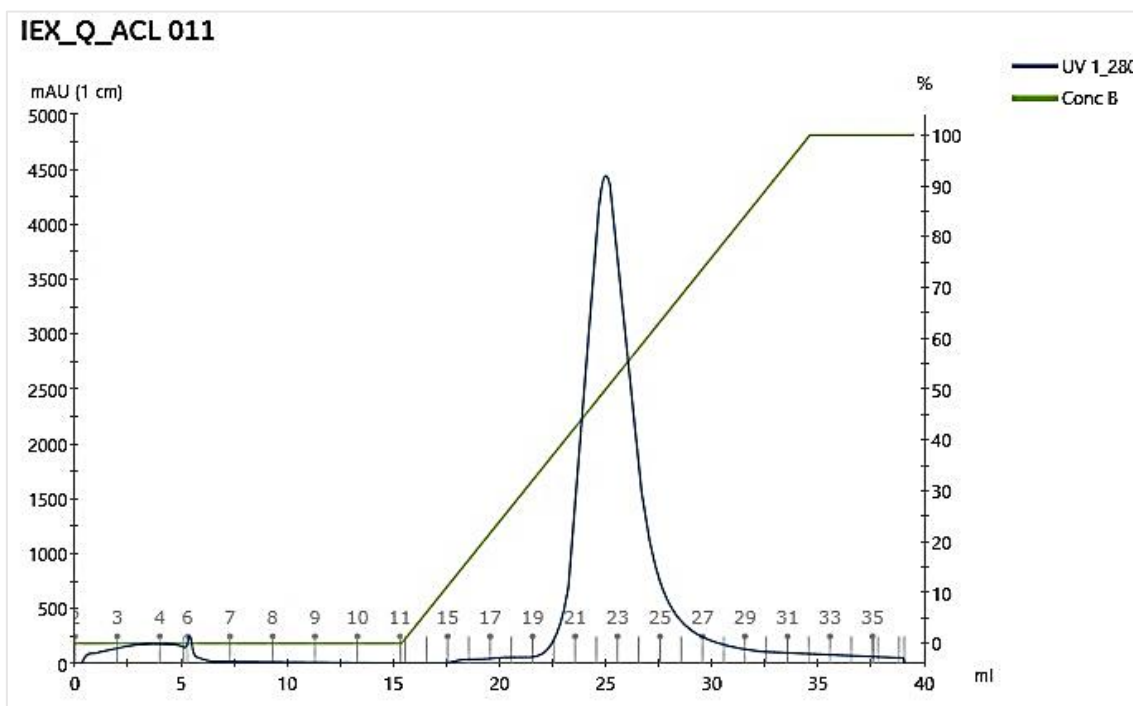
Figura 10 – Cromatografia de afinidade de fração 0-100 do extrato de *Aplysina cauliformis*.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2023).

* Cromatografia em coluna de Sepharose (1,0 cm x 5,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM (TBS). Foram aplicados aproximadamente 30 mL da fração 0-100 do extrato de *Aplysina cauliformis*. Após registro de absorbância abaixo de 0,02 nm as proteínas retidas na matriz foram eluídas em tampão TBS, com α -lactose em concentração de 300 mM. No gráfico a seta indica o momento no qual foi aplicado o tampão TBS contendo lactose.

Figura 11 – Cromatografia em coluna de troca iônica da amostra extraída da cromatografia de afinidade.



Fonte: Elaborado pelo 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⁻¹. Os tubos coletados foram 21-26.

4.2 Determinação da Massa Molecular

Na eletroforese em SDS-PAGE foi identificada na amostra sem β -mercaptoetanol, um monômero de aproximadamente 20 kDa, um dímero em torno de 45 kDa e um oligômero na grandeza de 100 kDa. Na presença de agente redutor foi identificado uma única banda de 20 kDa.

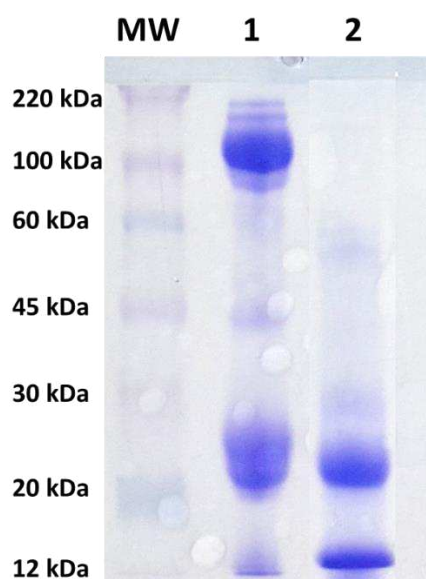
Os resultados sugerem que a lectina ACL apresenta cisteína, uma vez que forma pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas, assim, sua forma monomérica de 20 kDa realiza ligações com outros monômeros até formar o oligômero de 100 kDa.

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os dados encontrados por Viana (2021), que ao estimar massa molecular por eletroforese de ACL, encontrou em sua forma nativa um oligômero de aproximadamente 66 kDa e duas bandas de aproximadamente 30 e 35 kDa na presença de agente redutor.

Outras lectinas apresentaram condições semelhantes de cadeia peptídica em eletroforese em gel, na presença e ausência de β -mercaptoetanol, como da esponja marinha *Haliclona implexiformis* (HiL), que formou uma única banda de 36 kDa e uma

banda larga de 20 kDa com e sem β -mercaptoetanol respectivamente, na lectina da esponja *Aplysina fistularis* (AfiL) foi observado que essa formou uma única banda de 70 kDa que foi decomposta em duas bandas, sendo uma de 30 kDa e outra de 24 kDa (ANDRADE, 2022). Outra lectina bastante estudada foi a extraída da esponja *Aplysina lactuca* (ALL) (CARNEIRO *et al.*, 2017) que mostrou uma única banda de 28 kDa e quando em contato com agente redutor a mesma lectina apresentou uma banda de 19 kDa.

Figura 12 – Eletroforese em gel SDS-PAGE de ACL na presença e ausência de agente redutor.

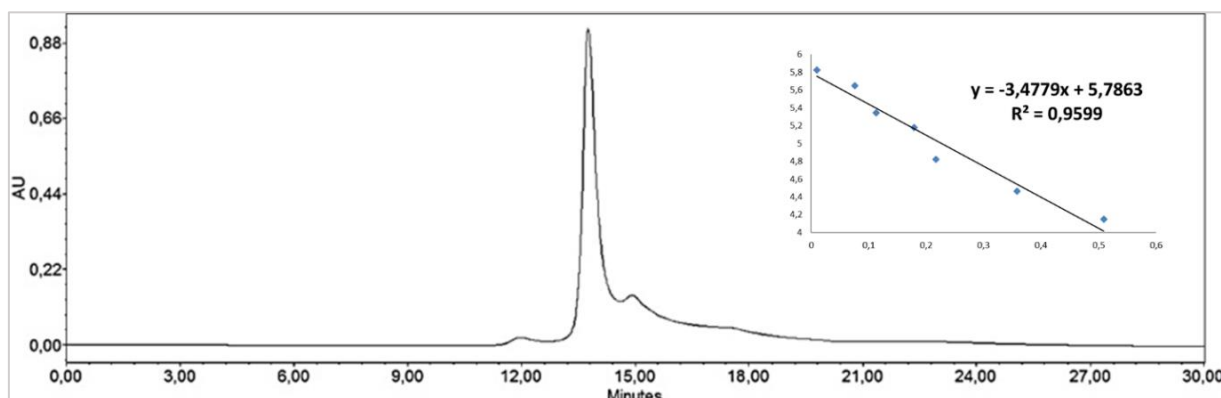


Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

* SDS-PAGE 15% de ACL. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM: Marcador Molecular; 1: ACL na ausência de β -mercaptoetanol; 2: ACL na presença de β -mercaptoetanol.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em coluna BEH SEC acoplada ao sistema Acquity UPLC® Waters, resultando em um único pico simétrico estimado em 54,5 kDa (Figura 12). A cromatografia de exclusão molecular foi feita 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 13 – Cromatografia de exclusão molecular de ACL.



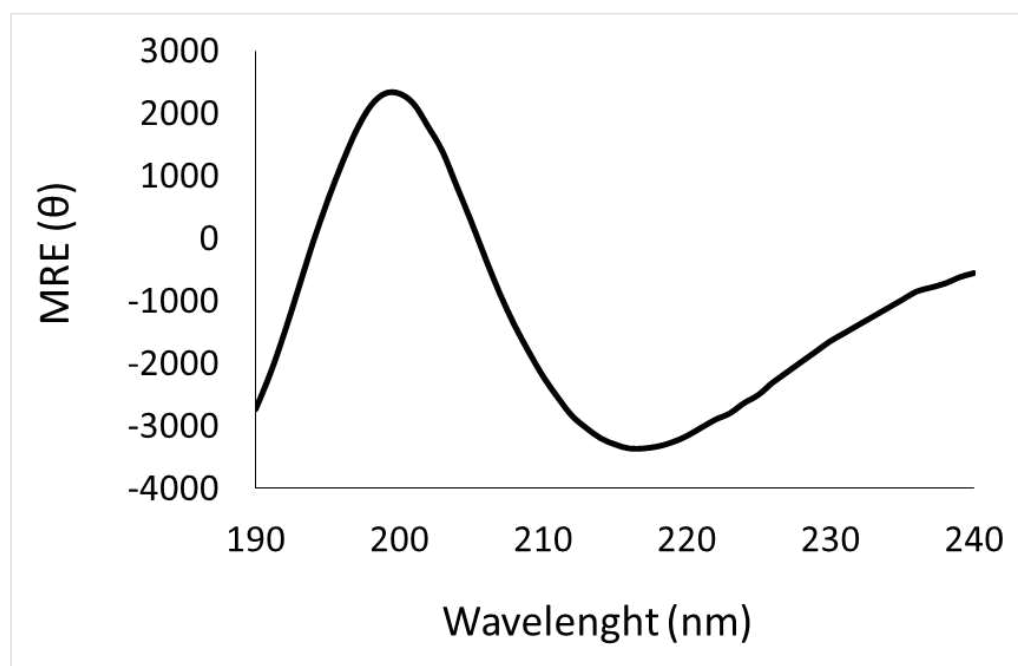
Fonte: Elaborado pelo autor, (2023).

*Cromatografia de exclusão molecular de ACL em coluna Acquity UPLC® Waters BEH SEC Column de 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm x 300 mm, 1/pkg. 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.

4.3 Dicroísmo circular

Por dicroísmo circular foram obtidos espectros da lectina ACL (Figura 14), que destacaram uma banda positiva próxima à faixa de 200 nm e uma banda negativa com mínimo na grandeza de 217 nm, características intrínsecas a proteína, composta majoritariamente por estrutura folha-β (SREERAMA; WOODY, 2003). Os espectros foram analisados utilizando a ferramenta de predição CONTIN alocado no servidor online DICROWEB (SPOELDER; GRONDELLE; GROEN, 1990). A análise expôs que a estrutura secundária de ACL é composta por 1% em α-hélice, 57% folha-β e 42% estrutura desordenada ou randômicas.

Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular de ACL



Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

* Gráfico de espectro de Dicroísmo Circular (*Far-UV*; 190 a 240 nm) de ACL.

4.4 Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante

Foi realizada quantificação de proteínas pelo método de Bradford e avaliada a atividade hemaglutinante durante as etapas de extração que demonstraram que a ACL apresentou rendimento de 0,5 % da atividade hemaglutinante total do extrato bruto (Tabela 2).

Tabela 2 – Purificação da lectina presente em extrato de *Aplysina cauliformis*.

Fração	Proteína Total (mg)	Título (HU.mL ⁻¹)	Atividade Hemaglutinante Total (HU)	Atividade específica (UH.mg ⁻¹)	Rendimento (%)
Extrato bruto	805,6	65.536	1,2 x 10 ⁶	15.456	100
F 0-100	781,3	8.192	4,8 x 10 ⁵	611,3	40
P2	1,12	1.024	2,6 x 10 ⁴	23.813	2
Sepharose					
ACL	0,11	128	640	5.565	0,5

Fonte: Elaborado pelo autor, (2023)

4.5 Atividade de ACL combinada com antibiótico contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*

Para este estudo, a lectina ACL foi combinada com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303.

Nos testes de atividade antibacteriana combinada com antibióticos a ACL manifestou efeitos sinérgicos e aditivos. Contra a bactéria *S. aureus* ATCC 25923, o antibiótico ampicilina, possui concentração mínima inibitória (CIM) igual a 0,250 µg/mL, quando combinado com ACL foi observado CIM de 0,0625, diminuindo em 1/4 a CIM e representando efeito sinérgico. Contra a bactéria *S. aureus* ATCC 700698 que possui maior resistência ao antibiótico supracitado, a combinação resultou novamente em efeito sinérgico, com CIM de 2 µg/mL. Para *S. epidermidis* ATCC 35984 a concentração diminuiu para 256 µg/mL, apresentando uma relação de CIM de 1/2 quando comparado com o antibiótico em modo individual, nesse teste foi considerado que o efeito da lectina junto a ampicilina foi aditivo. Quanto a bactéria *E. coli* ATCC 11303, o efeito demonstrado também foi aditivo, uma vez que a CIM foi reduzida em 1/2 ao conjugar ACL e o antibiótico.

Resultados significativos foram avaliados na combinação ACL e tetraciclina. Para *S. aureus* ATCC 25923 a combinação resultou em CIM igual a 0,0625 µg/mL e redução de 1/4 entre CIMs individual e combinado, o efeito manifestado foi de sinergismo. Contra *S. aureus* ATCC 700698 a combinação reduziu a CIM em 1/2, com concentração de 64 µg/mL tal fator caracterizou o efeito aditivo da lectina. Para *S. epidermidis* ATCC 35984 a ACL combinada com antibiótico demonstrou efeito de sinergismo e CIM de 8 µg/mL. O resultado do conjugado entre ACL e tetraciclina contra *E. coli* ATCC 11303 representou concentração de concentração de 64 µg/mL demonstrando efeito aditivo, onde a redução entre CIMs foi de 1/2 (Tabela 3).

Os DRCs das lectinas possuem capacidade de ligação tanto para carboidratos considerados como simples (monossacarídeos e dissacarídeos) como para estruturas mais complexas (polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios) por meio de ligações de hidrogênio e não covalentes (SINGH; KAUR; SINGH, 2014). O conceito de reconhecimento de proteína-carboidrato deriva da capacidade intrínseca as lectinas de reconhecer pequenas alterações nos carboidratos que estão presentes na superfície das células patogênicas (PROCÓPIO *et al.*, 2017). Atualmente muitos agentes causadores de doenças infecciosas parecem ser resistentes aos antibióticos tradicionalmente

comercializados pela indústria farmacêutica, assim, existe um contínuo esforço pela prospecção de novas moléculas com efeito antimicrobiano. As moléculas oriundas de organismos aquáticos surgem como uma solução inovadora e viável como foi destacado no presente trabalho.

Tabela 3 – Efeito da lectina ACL combinada aos antibióticos Ampicilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus 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 25923	0,250	0,0625	1/4	Sinergismo	0,250	0,0625	1/4	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	32	2	1/16	Sinergismo	128	64	1/2	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	512	256	1/2	Aditivo	128	8	1/16	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	2	1	1/2	Aditivo	1	0,5	1/2	Aditivo

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

– Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina ACL, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 0,250 a 512 µg/mL para ampicilina e de 0,250 a 128 µg/mL para tetraciclina. A concentração de ACL se manteve constante (125 µg/mL). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico. Valores igual a 1x, 2x da CIM, foram considerados como não interação.

5 CONCLUSÃO

As lectinas de esponjas marinhas representam uma área de pesquisa promissora devido às suas propriedades únicas e seu potencial para aplicações na medicina, biotecnologia e ciências biológicas. Essas proteínas têm uma diversidade estrutural e funcional, exibindo atividades biológicas que incluem propriedades antimicrobianas como foi descrito nesse trabalho.

Observou-se que, a lectina ACL foi extraída da esponja marinha *Aplysina cauliformis*, purificada por meio de protocolos descritos na literatura e os dados encontrados de cromatografia bem como estimativa de massa molecular corroboram com os descobertos por Viana (2021). As frações proteicas obtidas durante o processo de purificação da proteína foram reunidas para avaliar o quantitativo de proteínas que apresentou resultados significativos. Além disso, a lectina mostrou que sua estrutura secundária é formada majoritariamente por β -folha, correspondendo a 57% de sua composição.

A proteína foi submetida a testes de atividade antibacteriana em combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. Foi observado que essa interação potencializou o efeito desses antibióticos contra três cepas bacterianas Gram-positivas e contra a cepa Gram-negativa *E. coli*. A combinação resultou efeitos sinérgicos e aditivos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, 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) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 18 de fevereiro de 2022.
- ALVAREZ, B. & HOOPER, J. Family Axinellidae Carter, 1875. **Systema Porifera**, p. 724–47, 2002.
- BERGMANN, W. & FEENEY, R. Contributions to the study of marine products. xxxii. the nucleosides of sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, vol. 16, no 6, p. 981–87 junho de 1951.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, vol. 72, no. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRENNAN, M. R. *et al.* Stylopeptide 2, a proline-rich cyclodecapeptide from the sponge *Stylotella* sp. **Journal of Natural Products**, vol. 71, no. 3, p. 453–456, mar. 2008.
- BRUSCA, R., *et al.* **INVERTEBRADOS**. Guanabara koogan, 3ed., 2018.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A Chromophore-Containing Agglutinin from *Haliclona Manglaris*: Purification and Biochemical Characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 72, p. 1368–75, janeiro de 2015.
- 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**, vol. 662, p. 169–176, fevereiro de 2019.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a New Lectin from the Marine Sponge *Haliclona Caerulea*: Purification and Mass Spectrometric Characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 45, no 12, p. 2864–73, dezembro de 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**, vol. 99, p. 213–222, junho de 2017.
- CORALPEDIA - **Your guide to Caribbean corals and sponges**. Disponível em: https://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/sponges/aplysina_cauliformis_a. Acesso em: 10 jun. 2023.
- DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺-Dependent Animal Lectins. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, vol. 45, p. 207–32, 1993.

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.

DUARTE, J. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca***. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 21 de fevereiro de 2022.

FERREIRA, G. R. S. *et al.* Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, vol. 124, p. 152–162, novembro de 2018.

FORD, P. W. *et al.* Papuamides A-D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei*, collected in Papua New Guinea. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 121, no. 25, p. 5899–5909, 30 jun. 1999.

GOMES, S. **Purificação, caracterização e atividades biológicas de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal da Paraíba, 2014.

FUNAYAMA, N. *et al.* Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers for sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. **Zoological science**, vol. 22, no. 10, p. 1113–1122, out. 2005.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. **Marine Drugs**, vol. 13, no 8, p. 5059–101, agosto de 2015.

GAZAVE, *et al.* No Longer Demospongiae: Homoscleromorpha Formal Nomination as a Fourth Class of Porifera. **Hydrobiologia**, vol. 687, no 1, p. 3–10, maio de 2012.

GOMES, F. S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius leaf*. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 114, no. 3, p. 672–679, 1 mar. 2013.

HABENER, L. J.; HOOPER, J. N. A.; CARROLL, A. R. Chemical and Biological Aspects of Marine Sponges from the Family Mycalidae. **Planta Medica**. Georg Thieme Verlag, 1 jun. 2016.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. I. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, vol. 3, no. 4, p. 297–304, 1 ago. 1993.

KIM, S. K.; DEWAPRIYA, P. Bioactive Compounds from Marine Sponges and Their Symbiotic Microbes: A Potential Source of Nutraceuticals. **Advances in Food and Nutrition Research**, vol. 65, p. 137–151, 1 jan. 2012.

KÜPPERS, L. *et al.* Lactones from the Sponge-Derived Fungus *Talaromyces Rugulosus*. **Marine Drugs**, vol. 15, no 11, p. 359, novembro de 2017.

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

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

LÓPEZ, D. **Estudio de las lectinas presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus***. 2022. Tese (Mestrado em ciências bioquímicas) - Departamento de química. Universidad Nacional de Colombia, 02 de junho de 2022.

LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. New York. Williams & Wilkins. 851p, 2005.

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

MATSUNAGA, S.; FUSEYANI, N.; KONOSU, S. Bioactive marine metabolites, IV. Isolation and the amino acid composition of discodermin a, an antimicrobial peptide, from the marine sponge *discodermia kiiensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 48, no. 2, p. 12, 1985.

MISHRA, ABTAR, *et al.* Structure-Function and Application of Plant Lectins in Disease Biology and Immunity. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 134, p. 110827, dezembro de 2019.

MORROW, C.; CÁRDENAS, P. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). **Frontiers in Zoology**, vol. 12, no. 1, 1 jul. 2015.

MORPHOLOGY OF SPONGES. **Biology LibreTexts**. Disponível em: [https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Fundamentals_of_Biology_I_\(Lumen\)/14%3A_Module_11_Invertebrates/14.16%3A_Morphology_of_Sponges](https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Fundamentals_of_Biology_I_(Lumen)/14%3A_Module_11_Invertebrates/14.16%3A_Morphology_of_Sponges). Acesso em: 01 jun. 2023.

PIETRZYK-BRZEZINSKA, AGNIESZKA J., & ANNA BUJACZ. H-Type Lectins – Structural Characteristics and Their Applications in Diagnostics, Analytics and Drug Delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 152, p. 735–47, junho de 2020.

UNVERDORBEN, L. *et al.* Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, no 5, p. 644, abril de 2016.

OCÁDIZ, B. W. B. **Efecto de la administración oral aguda de lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1) en ratones CD-1.** Tese (Licenciatura em Nutrição) - Faculdade de Ciências Naturais. Universidad Autónoma de Querétaro, 2023.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. **Nova Science Publishers, Inc.** Cap. 3, 2017.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **MicrobiologyOpen**, vol. 8, no 11, novembro de 2019.

RANDAZZO, A. *et al.* Halipeptins A and B: Two novel potent anti-inflammatory cyclic depsipeptides from the Vanuatu marine sponge *Haliclona* species. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 123, no. 44, p. 10870–10876, 7 nov. 2001.

ROUÉ, M. *et al.* Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products. **Natural Product Reports**, vol. 29, no. 7, p. 739–751, 1 jul. 2012.

SAMPAIO, A. *et al.* New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumose*. **Journal of Applied Phycology**. [s.l]. vol. 14, p. 489–495, 2002.

SARÀ, M. **Sponge | Definition, Features, Reproduction, & Facts | Britannica.** Disponível em: <<https://www.britannica.com/animal/sponge-animal>>. Acesso em: 13 jun. 2023.

SCHRÖDER, H. C. *et al.* Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **The Journal of biological chemistry**, vol. 278, no. 35, p. 32810–32817, 29 ago. 2003.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Structural composition of β I- and β II-proteins. **Protein science: a publication of the Protein Society**, [s.l]. v. 12, n. 2, p. 384–388, 2003.

SHARON, N. & LIS, H. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. **Glycobiology**, vol. 14, no 11, p. 53R-62R, junho de 2004.

SHIMIZU, S.; ITO, M.; NIWA, M. *Biochimica et Biophysica Acta*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 71–79, maio 1977.

SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, vol. 29, no. 4, p. 283–309, 3 abr. 2019.

SIBERO, M. *et al.* Chromanone-type compounds from marine sponge-derived *Daldinia eschscholtzii* KJMT FP 4.1. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, vol. 10, no 1, p. 1–7, janeiro de 2020.

SINGH, R. S. *et al.* Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillus Gorakhpurensis*: Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity. **PLOS ONE**, vol. 9, no 10, p. e109265. outubro de 2014.

SPERLING, E. *et al.* Where's the Glass? Biomarkers, molecular clocks, and microRNAs suggest a 200-Myr missing Precambrian fossil record of siliceous sponge spicules. **Geobiology**, vol. 8, no 1, p. 24–36, janeiro de 2010.

SPOELDER, H. J. W.; GRONDELLE, R. VAN; GROEN, F. C. A. Estimation of Protein Secondary Structure Analysis from Circular Dichroism Spectra and Error. v. 118, p. 110–118, 1990.

SOL, F. G., *et al.* **Lectinas**. Investigación y Ciencia, 2006.

UNAJAK, S. *et al.* Molecular Characterization of Galectin-8 from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) and Its Response to Bacterial Infection. **Molecular Immunology**, vol. 68, no 2, p. 585–96, dezembro de 2015.

VAN SOEST, R. W. M. *et al.* Global Diversity of Sponges (Porifera). **PLOS ONE**, vol. 7, no. 4, p. e35105, 27 abr. 2012.

VAN SOEST, R., *et al.* World Porifera Database. Disponível em: <https://www.marinespecies.org/porifera>. Acesso em 01 mar. 2023.

VARIJAKZHAN, D. *et al.* Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. **Marine Drugs** 2021, vol. 19, no. 5, p. 246, 27 abr. 2021.

VASTA, G. R.; AHMED, H. **ANIMAL LECTINS: A FUNCTIONAL VIEW**. CRC Press, 2009.

VIANA, L. **PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO 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 2021.

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

WORMS - World Register of Marine Species. Disponível em: <https://www.marinespecies.org>. Acesso em: 16 jun. 2023.

YANG, Q. *et al.* Development of a multilocus-based approach for sponge (phylum Porifera) identification: Refinement and limitations. **Scientific Reports**, vol. 7, 2 fev. 2017.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, vol. 10, no. 17, p. e17, jun. 2008.

ZAMPELLA, A. *et al.* Homophymines B–E and A1–E1, a family of bioactive cyclodepsipeptides from the sponge *Homophymia* sp. **Organic & Biomolecular Chemistry**, vol. 7, no. 19, p. 4037–4044, 16 set. 2009.