



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

**VINÍCIUS PAULINO PINTO MENEZES**

**ESTUDO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE  
TRÊS LECTINAS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS DA FAMÍLIA OAAH EM  
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS**

**FORTALEZA**

**2024**

VINÍCIUS PAULINO PINTO MENEZES

ESTUDO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE TRÊS  
LECTINAS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS DA FAMÍLIA OAAH EM  
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

FORTALEZA

2024

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)

---

M513e Menezes, Vinícius Paulino Pinto.  
Estudo estrutural e avaliação do efeito antibacteriano de três lectinas de algas marinhas vermelhas da Família OAAH em combinação com antibióticos. / Vinícius Paulino Pinto Menezes. – 2024.  
66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 1, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Lectinas de algas marinhas. 2. Estrutura tridimensional. 3. Efeito antibacteriano. I. Título.  
CDD

---

VINÍCIUS PAULINO PINTO MENEZES

ESTUDO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE TRÊS  
LECTINAS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS DA FAMÍLIA OAAH EM  
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

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

Aprovada em: 15/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, por todos estes anos de colaboração na carreira acadêmica e aprendizado na área da Botânica Aquática;

Aos “chefes”/coordenadores do Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar), Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano e Dra. Renata Pinheiro Chaves pela inestimável colaboração nas pesquisas e desenvolvimento acadêmico;

Meu profundo agradecimento aos membros do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), especialmente Ellen Malveira e Dr. Alexandre Lopes por terem auxiliado nos ensaios biológicos;

Aos professores Renata Pinheiro e Mayron Alves, por terem aceitado fazer parte da Banca Avaliadora, pelas correções e sugestões e enriquecimento do documento;

Aos meus grandes amigos do BioMar: Pedro Arthur, Gabriel Cândido, Jessica Duarte, Andressa Rocha, Juliana Sampaio, Bianca Ferreira, Philippe Duarte, Ellen Malveira e Aldeni Moreira por todas os almoços, merendas, calouradas, comemorações, risadas e memes compartilhados;

Aos demais companheiros de bancada: Elany Rodrigues, Samilly Soares, Manoel Costa, João Marcelo, Israel Barbosa, Levi Oton, Eduardo de Oliveira, Paulo Anderson e Pedro Abílio por toda a dedicação nas atividades do laboratório e companheirismo;

Aos meus pais, Nilza e Luiz Antonio, e ao meu irmão Nicolás por todo o apoio, dedicação, carinho e amor durante todos esses anos;

Aos demais familiares, que sempre estavam presentes nos momentos mais importantes da minha vida;

Aos antigos amigos, Lygia Braga, Daniel Oliveira, Zindanne Cardoso, Lorena Araújo e Tiffany Souza, que nossa amizade possa durar anos e anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio durante todos esses meses;

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

*“But I keep cruising; Can't stop, won't stop moving; It's like I got this music; In my mind, saying it's gonna be alright” (SWIFT, 2014).*

## RESUMO

Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos e glicoconjugados de maneira reversível. Devido a sua especificidade por carboidratos, essas moléculas podem apresentar uma variedade de propriedades interessantes para as áreas da biotecnologia e biomedicina, tais como atividades antivirais, antibacterianas e antitumorais. Atualmente existe uma urgência global para a bioprospecção de novas moléculas capazes de combater bactérias resistentes, que representam um grave problema para a saúde pública. No presente trabalho três lectinas de algas marinhas vermelhas pertencentes à família OAAH (homólogas à aglutinina de *Oscillatoria agardhii*), *Amansia multifida* (AML), *Meristiella echinocarpa* (MEL) e *Solieria filiformis* (SfL), foram purificadas através de cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel e o potencial antibacteriano dessas lectinas foi avaliado pelo método *checkerboard*, em associação com oxacilina e tetraciclina, contra as cepas *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25963 e *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA). Modelos tridimensionais de AML e MEL também foram construídos *in silico* e analisados quanto ao possível sítio de reconhecimento de carboidratos. A modelagem tridimensional das lectinas revelou que, em geral, elas se assemelham a estruturas de  $\beta$ -barril, com cerca de 10 fitas antiparalelas em cada cadeia, comum em lectinas da família OAAH. Pela predição dos sítios de ligação, verificou-se que os aminoácidos que interagem com os carboidratos estão situados nas posições W<sup>145</sup>, R<sup>230</sup>, E<sup>258</sup> e I<sup>261</sup> para AML e W<sup>144</sup>, R<sup>229</sup>, E<sup>257</sup> e I<sup>260</sup> para MEL. De acordo com árvore filogenética construída com base em suas estruturas primárias, MEL e SfL estão bem agrupadas entre as lectinas da família OAAH, porém AML se situa mais próxima às lectinas de bactérias e cianobactérias precursoras da família. AML, MEL e SfL em associação com oxacilina exibiram interação antagonista ou não interação com o antibiótico contra as cepas testadas. Por outro lado, AML e MEL exibiram efeito sinérgico em combinação com tetraciclina contra *S. aureus* ATCC 25963, além de efeito aditivo contra MRSA e *E. coli* ATCC 11303. SfL em associação com tetraciclina exibiu efeito sinérgico e efeito aditivo contra *S. aureus* ATCC 25963 e MRSA, respectivamente. Verifica-se o potencial antibacteriano que as lectinas da família OAAH possuem no combate às bactérias resistentes, em combinação com tetraciclina. Estudos mais aprofundados são necessários para entender como ocorre a interação entre as proteínas e os antibióticos.

**Palavras-chave:** lectinas de algas marinhas; estrutura tridimensional; efeito antibacteriano.

## ABSTRACT

Lectins are proteins that recognize and bind to carbohydrates and glycoconjugates in a reversible manner. Due to their specificity for carbohydrates, these molecules can present a variety of interesting properties for the areas of biotechnology and biomedicine, such as antiviral, antibacterial and antitumor activities. There is currently a global urgency to bioprospect new molecules capable of combating resistant bacteria, which represent a serious problem for public health. In the present work, three lectins from red marine algae belonging to OAAH family (*Oscillatoria agardhii* agglutinin homologue), *Amansia multifida* (AML), *Meristiella echinocarpa* (MEL) and *Solieria filiformis* (SfL), were purified through ion-exchange chromatography in a DEAE-Sephacel matrix and the antibacterial potential of these lectins was evaluated. by the checkerboard method, together with oxacillin and tetracycline, against the strains *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25963 and *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA). Three-dimensional models of AML and MEL were also constructed *in silico* and analyzed for the possible carbohydrate recognition site. Three-dimensional modeling of lectins revealed that, in general, they resemble  $\beta$ -barrel structures, with about 10 antiparallel strands on each chain, common in lectins of the OAAH family. By predicting of the binding sites, it was found that the amino acids that interact with carbohydrates are located at positions W<sup>145</sup>, R<sup>230</sup>, E<sup>258</sup> and I<sup>261</sup> for AML and W<sup>144</sup>, R<sup>229</sup>, E<sup>257</sup> and I<sup>260</sup> for MEL. According to the phylogenetic tree constructed based on their primary structure, MEL and SfL are well grouped among the lectins of the OAAH family, but AML is closer to the lectins of bacterial and cyanobacterial precursors of the family. AML, MEL and SfL together with oxacillin exhibited antagonistic interaction or no interaction with the antibiotic against the strains tested. However, AML and MEL exhibited a synergistic effect in conjunction with tetracycline against *S. aureus* ATCC 25963, in addition to an additive effect against MRSA and *E. coli* ATCC 11303. SfL together with tetracycline exhibited synergistic effect and additive effect against *S. aureus* ATCC 25963 and MRSA, respectively. We verified the antibacterial potential that lectins from the OAAH family have in combating resistant bacteria, in combination with tetracycline. Further studies are needed to understand how the interaction between proteins and antibiotics occurs.

**Keywords:** marine algae lectin; three-dimensional structure; antibacterial effect.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representantes dos três principais filos e classes das macroalgas .....	14
Figura 2 – Diferentes tipos de oligossacarídeos <i>N</i> -glicanos .....	17
Figura 3 – <i>Amansia multifida</i> .....	20
Figura 4 – <i>Meristiella echinocarpa</i> .....	22
Figura 5 – <i>Solieria filiformis</i> .....	23
Figura 6 – Estrutura tridimensional da isoforma rSfL-1 .....	24
Figura 7 – Cromatografias de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel de AML, MEL e SfL e SDS-PAGE 15% .....	35
Figura 8 – Predição da estrutura tridimensional de AML e MEL .....	35
Figura 9 – Previsão do sítio de ligação das lectinas aos carboidratos .....	36
Figura 10 – Alinhamento das estruturas primárias de lectinas da família OAAH .....	37
Figura 11 – Árvore filogenética de lectinas da família OAAH .....	39
Figura 12 – Estrutura tridimensional de GRFT .....	45
Figura 13 – Estrutura tridimensional de OAA .....	45
Figura 14 – Modelagens estruturais putativas de ASL-1, EDA-2, ESA-2 e MPA-1 .....	46
Figura 15 – Modelo estrutural de SfL e sobreposição das estruturas de AML, MEL e SfL	47
Figura 16 – Sítio 5 de ligação entre AML e ampicilina .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da lectina AML combinada aos antibióticos oxacilina e tetraciclina sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	41
Tabela 2 – Efeito da lectina MEL combinada aos antibióticos oxacilina e tetraciclina sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	42
Tabela 3 – Efeito da lectina Sfl combinada aos antibióticos oxacilina e tetraciclina sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC	Domínio de reconhecimento a carboidrato
HM	<i>High-mannose</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HCA	Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i>
HML	Lectina de <i>Hypnea musciformis</i>
MALDI-ToF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i> (Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
GRFT	Griffthsina/Lectina de <i>Griffithsia</i> sp.
HSV-2	Vírus da Herpes do tipo 2
JEV	Vírus da encefalite japonesa
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus
BTL	Lectina de <i>Bryothamnion triquetum</i>
BSL	Lectina de <i>Bryothamnion seaforthii</i>
OAAH	Homólogas à aglutinina de <i>Oscillatoria agardhii</i>
OAA	Aglutinina de <i>Oscillatoria agardhii</i>
KAA	Lectina de <i>Kappaphycus alvarezzi</i>
KSA	Lectina de <i>Kappaphycus striatus</i>
ESA	Lectina de <i>Eucheuma serra</i>
EDA	Lectina de <i>Eucheuma denticulatum</i>
UFH	Hemaglutinina de <i>Ulva fasciata</i>
DEAE	Dietilaminoetil
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
AML	Lectina de <i>Amansia multifida</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
MEL	Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i>
SfL	Lectina de <i>Solieria filiformis</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
PBS	Tampão fosfato de sódio com cloreto de sódio
PB	Tampão fosfato de sódio
CEUAP	Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio)
MHA	Ágar Müller-Hinton
MHB	Caldo Müller-Hinton
CIM	Concentração Inibitória Mínima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>O ambiente marinho como fonte de moléculas de alto potencial biotecnológico</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Macroalgas marinhas</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Lectinas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Lectinas de algas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5</b>	<b>Lectinas da Família OAAH (Homólogas à aglutinina de <i>Oscillatoria agardhii</i>)</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5.1</b>	<b><i>Lectina de Amansia multifida (AML)</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.5.2</b>	<b><i>Lectina de Meristiella echinocarpa (MEL)</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.5.3</b>	<b><i>Lectina de Solieria filiformis (SfL)</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.6</b>	<b>Micro-organismos patogênicos: um problema de saúde mundial</b> .....	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta do material biológico</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Purificação da AML</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Purificação da MEL</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Purificação da SfL</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>Atividade hemaglutinante</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Avaliação da homogeneidade das lectinas</b> .....	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Modelagem da estrutura tridimensional</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise da sequência de aminoácidos e relação filogenética entre as proteínas</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Atividades antibacteriana das lectinas</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9.1</b>	<b><i>Micro-organismos e condições de cultura</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.9.2</b>	<b><i>Atividade antibacteriana das lectinas com antibióticos</i></b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Purificação e homogeneidade das lectinas</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Modelagem das estruturas tridimensionais de AML e MEL</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise da sequência de aminoácidos e relação filogenética</b> .....	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito antibacteriano das lectinas em conjunto com antibióticos</b> .....	<b>40</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O ambiente marinho como fonte de moléculas de alto potencial biotecnológico

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra. Eles são divididos em diferentes zonas, como a zona costeira, a zona pelágica e a zona abissal; e cada uma dessas regiões possui características únicas e suporta uma variedade de organismos adaptados a condições específicas. Este é um dos ecossistemas mais importantes do planeta, desempenhando um papel fundamental na regulação do clima, fornecimento de alimentos, produção de oxigênio e abrigo de uma variedade de formas de vida (Althagbi *et al.*, 2020; Bălașa; Chircov; Grumezescu, 2020).

Para sobreviver e prosperar no ambiente, os organismos marinhos desenvolveram uma ampla variedade de adaptações. Essas adaptações são resultado de milhões de anos de evolução e permitem que esses organismos enfrentem os desafios únicos que encontram nos oceanos (Hamed *et al.*, 2015).

A produção de metabólitos primários e secundários pelos organismos marinhos é uma área de grande interesse científico e tem sido objeto de estudos extensos nas últimas décadas. Os processos metabólicos primários estão relacionados com as principais macromoléculas (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) e são responsáveis pelo metabolismo e formação de um diversificado número de substâncias orgânicas no interior das células que formam os vários tecidos dos organismos vivos (Silva *et al.*, 2019).

Por outro lado, o metabolismo secundário está associado à produção de pequenas moléculas que não são essenciais para o crescimento e reprodução do organismo, como compostos fenólicos, terpenos, esteroides, alcaloides e flavonoides (Kessler; Kalske, 2018; Yang *et al.*, 2018). Os organismos marinhos produzem compostos secundários que são essenciais para diversos setores industriais, como cosmética, produção de suplementos nutricionais e desenvolvimento de agentes terapêuticos para tratamento de enfermidades (Srinivasan *et al.*, 2021; Tziveleka; Vagias; Roussis, 2003).

Os organismos marinhos, incluindo algas, invertebrados, esponjas, corais e peixes, têm mostrado uma riqueza extraordinária na produção de metabólitos com potencial biotecnológico. Essas substâncias podem ser isoladas de várias partes dos organismos, como pele, órgãos internos, tecidos ou secreções (Bălașa; Chircov; Grumezescu, 2020).

Esses produtos naturais exibem uma ampla variedade de estruturas químicas e funções biológicas. Alguns possuem propriedades antimicrobianas, que ajudam os organismos marinhos a se protegerem contra infecções bacterianas e fúngicas. Além disso, essas moléculas também podem possuir atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes e analgésicas, entre outras. Como resultado, essas substâncias têm despertado um grande interesse na pesquisa farmacêutica, como fontes potenciais de novos medicamentos e terapias (Conte *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

## 1.2 Macroalgas Marinhas

As macroalgas marinhas correspondem a um grupo de organismos avasculares, multicelulares e fotossintetizantes que habitam uma diversidade de ambientes aquáticos, especialmente a região costeira dos oceanos, nas zonas entre-marés e recifes. As macroalgas são taxonomicamente classificadas em três principais grupos (FIGURA 1) baseado no pigmento que apresentam: o filo Chlorophyta (algas verdes), o filo Rhodophyta (algas vermelhas) e a classe Phaeophyceae (algas pardas) (Maliki *et al.*, 2022). Além disso, vale ressaltar o filo das cianobactérias (Cyanobacteria), também conhecidas como cianofíceas ou algas azuis, que são na sua maioria, micro-organismos fotossintetizantes primitivos, presentes nos ambientes aquáticos de forma isolada, em filamentos ou agrupadas, formando colônias, quando é possível observá-las a olho nu ou formando pequenos tufos fixos aos recifes de marés (Zahra *et al.*, 2020).

Figura 1 – Representantes dos três principais filios e classes das macroalgas.



Fonte: Compilação do Autor<sup>1</sup>. A) *Caulerpa prolifera* (Chlorophyta), B) *Cryptonemia* sp. (Rhodophyta) e C) *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae).

<sup>1</sup>Imagens retiradas do site: [www.marinespecies.org/](http://www.marinespecies.org/)



As macroalgas acumulam amido como reserva energética, bem como outros polissacarídeos de cadeia longa. As clorófitas (algas verdes) produzem ulvana como constituinte da parede celular, além de conter clorofilas *a* e *b*, carotenos e xantofilas, e também possuem como pigmentos acessórios. As rodófitas (algas vermelhas) possuem clorofila *a*, carotenoides e ficobilinas, como a ficoeritrina, que determina a coloração característica desse grupo. Nas feofíceas (algas pardas) são encontrados diversos pigmentos, como a fucoxantina, clorofilas *a* e *c* e carotenoides, bem como óleos e polissacarídeos (a laminarina, por exemplo) (Sudhakar *et al.*, 2018).

As algas possuem uma grande importância ecológica para o ecossistema marinho. Assim como as plantas terrestres, elas são a base da cadeia trófica do ambiente onde estão inseridas, sustentando principalmente as comunidades de animais bentônicos. Por outro lado, as macroalgas também desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra predadores e micro-organismos e de adaptação ao meio. Por conta de seu estilo de vida sésil, ou seja, sem locomoção, elas tiveram que se adaptar a diversas condições ambientais, como a variação de luminosidade, concentração de nutrientes e salinidade em ambientes entre-marés, além da presença de poluentes ambientais. Somam-se a estes desafios a herbivoria por parte de crustáceos, moluscos, equinodermos e peixes, bem como a ação de micro-organismos patogênicos, como vírus, fungos, bactérias e parasitas. Todos estes fatores levaram à produção de compostos variados, como pigmentos, vitaminas, compostos fenólicos e esteroides, capazes de mitigar a ação predatória sobre as algas, de adaptá-las ao meio e garantir a sua permanência no ambiente marinho (Biris-Dorhoi *et al.*, 2020).

Além de sua grande importância ecológica, as algas também têm uma grande importância no setor econômico e industrial. A partir das descobertas e isolamentos dos produtos naturais das algas, diversas espécies são muito estudadas quanto ao seu cultivo para extração de ágar, pigmentos, para alimentação humana e produção de biofertilizantes e biocombustíveis, bem como no isolamento de compostos farmacêuticos com propriedade antivirais, antibacterianas e antitumorais (Leandro; Pereira; Gonçalves, 2020).

### 1.3 Lectinas

Lam e Ng (2011) definem lectinas como proteínas que possuem ao menos um domínio não-catalítico, exibindo uma atividade ligante reversível e não covalente a monossacarídeos e oligossacarídeos. A primeira detecção de tais proteínas em vegetais data do

final do século XIX, quando Stillmark (1888) estudava a toxicidade da mamona (*Ricinus communis*), observando que o extrato das sementes aglutinava os eritrócitos testados (Sharon; Lis, 2003).

A habilidade de aglutininas (como foram inicialmente denominadas) de plantas terrestres diferenciarem eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh (1954) a elaborarem uma nova definição para essa classe de proteínas, denominando-as de lectinas (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) (Sharon; Lis, 2003).

Por possuírem essa capacidade de reconhecimento aos carboidratos, as lectinas são capazes de interagir com diversas moléculas que possuem carboidratos específicos em sua estrutura (aqueles com os quais elas possuem maior especificidade), seja de fluídos biológicos ou receptores de superfície celular, atuando como decodificadores de informações trocadas entre moléculas, células e organismos, e com isso apresentam uma variedade de funcionalidades biológicas (Lam; Ng, 2011).

As propriedades que as lectinas possuem de ligação aos glicoconjugados as tornam importantes ferramentas em setores da pesquisa científica, principalmente nas áreas de bioquímica, biotecnologia, biologia molecular, imunologia, farmacologia e medicina. As lectinas podem causar uma variedade de efeitos celulares, como aglutinação, estímulo mitogênico, inibição de crescimento bacteriano e fúngico, agregação celular, imunomodulação dentre outros, aumentando o interesse nessas proteínas (Santos *et al.*, 2014).

#### **1.4 Lectinas de algas**

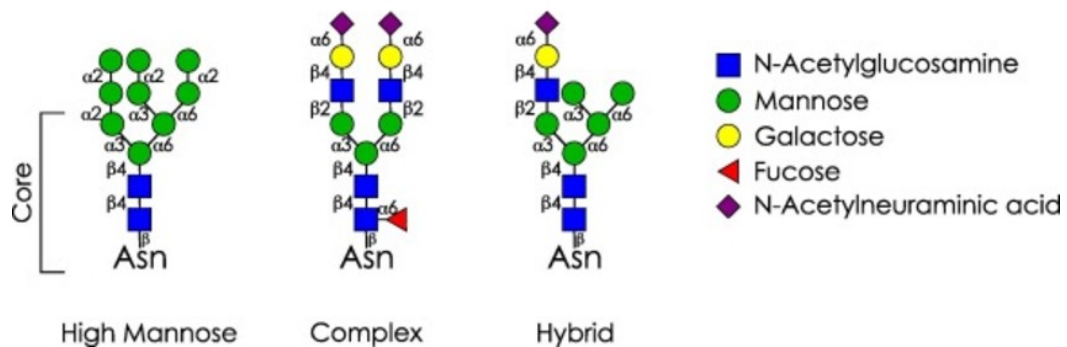
De forma geral as lectinas de algas são proteínas de baixo peso molecular, possuindo um alto conteúdo de aminoácidos ácidos, conferindo um ponto isoelétrico variando entre 4 e 6, não requerem cátions divalentes para realizar suas atividades biológicas, são monoméricas e a maioria exibe maior especificidade por glicoproteínas ou carboidratos mais complexos (Hori *et al.*, 1990; Rogers; Hori, 1993; Singh; Thakur; Bansal, 2015).

A especificidade da ligação entre a proteína e o carboidrato define os tipos de atividades biológicas que a lectina vai possuir. Alterações nos sítios de ligação irão afetar o reconhecimento entre as moléculas, podendo reduzir ou inibir toda sua funcionalidade (Singh; Thakur; Bansal, 2015).

Com base na sua especificidade de ligação às glicoproteínas, as lectinas de algas podem ser categorizadas como específicas a *N*-glicanos do tipo *high-mannose* (HM), do tipo

complexo ou do tipo híbrido, com maior representatividade do tipo HM (Hori; Miyazawa; Ito, 1990; Higel *et al.*, 2016) (FIGURA 2). Além disso, devido ao seu tamanho e presença de pontes dissulfeto estas moléculas são altamente estáveis, tornando-as eficientes em testes para reconhecimento de carboidratos na superfície das células (como determinação de tipagem sanguínea) e tratamentos com base em *drug delivery* (Nascimento *et al.*, 2006; Singh; Walia, 2018).

Figura 2 – Diferentes tipos de oligossacarídeos *N*-glicanos.



Fonte: Adaptado de HIGEL *et al.* (2016).

Lectinas de algas já demonstraram uma funcionalidade biológica diversificada, bem como múltiplas aplicações biotecnológicas e biomédicas, tais como atividade antitumoral, anti-HIV, anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana, além de ampla aplicação nos campos da alimentação, glicobiologia e bioquímica (Praseptianga, 2017; Singh; Walia, 2018).

A presença de lectinas em algas marinhas foi reportada pela primeira vez por Boyd, Almodóvar e Boyd (1966) e, posteriormente, os trabalhos de detecção destas proteínas se desenvolveram gradativamente. No Brasil, o primeiro trabalho relacionado com lectinas de algas marinhas data do início da década de 1990, quando Ainouz e Sampaio (1991) relataram a ocorrência destas moléculas em cerca de vinte espécies, dentre as quais estavam presentes rodófitas e clorófitas. Os extratos foram eficazes para aglutinar eritrócitos de coelho, galinha, vaca e ovelha, além de eritrócitos humanos dos tipos A, B e O.

Calvete *et al.* (2000) determinaram pela primeira vez a estrutura primária de uma lectina de alga extraída de *Bryothamnion triquetum* (BTL) capaz de aglutinar eritrócitos de diversos animais e do tipo ABO. Posteriormente, Nagano *et al.* (2005) também determinaram as estruturas primárias de outras duas lectinas extraídas de *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis* (HCA e HML, respectivamente), através da combinação do uso de degradação de Edman e espectrometria de massas (MALDI-ToF). Além disso, HML apresentou atividade antifúngica

contra *Trichophyton rubrum* e *Colletotrichum lindemuthianum* (Melo *et al.*, 1997) e HCA exibiu atividade antinociceptiva (Bringel *et al.*, 2020).

Dentre as algas vermelhas, a GRFT é uma das lectinas mais estudadas ao longo dos anos. A GRFT foi isolada de *Griffithsia* sp. por Mori *et al.* (2005), sendo inibida preferencialmente por N-glicanos do tipo HM, possuindo diversas características interessantes como alto nível de rentabilidade, estabilidade estrutural e funcionalidade biológica. Esta proteína exibe atividade antiviral, especialmente contra o HIV (através da interação com a glicoproteína do capsídeo viral gp120, rica em oligossacarídeos do tipo HM), hepatite C, herpes tipo 2 (HSV-2), encefalite japonesa (JEV) e coronavírus (SARS-CoV) (Lee, 2019).

Várias lectinas de algas também já foram estudadas quanto às suas propriedades anti-inflamatórias, tais como a BTL (Fontenelle *et al.*, 2018), CiL-1 de *Codium ishtmocladum* (Alves *et al.*, 2022) e CCL de *Caulerpa cupressoides* (Rivanor *et al.*, 2018). As lectinas de *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e de *Hizikia fusiformis* exibiram atividade antioxidante (Alves *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2016). BSL e BTL também apresentaram capacidade de reconhecimento de células de carcinoma de cólon humano, diferenciando-as das demais células devido a sua especificidade aos glicoreceptores da membrana (Pinto *et al.*, 2009). Atividade inseticida foi reportada por Lima *et al.* (2005) e Leite *et al.* (2005) para lectinas de algas do gênero *Gracilaria*.

Recentemente, algumas algas verdes tiveram lectinas extraídas e propriamente caracterizadas, além de suas aplicações biológicas. Carneiro *et al.* (2020) isolaram duas lectinas de *Codium ishtmocladum* (CiL-1 e CiL-2). CiL-1 exibiu especificidade por galactosídeos e fetuína, enquanto CiL-2 exibiu preferência por galactosamina e PSM tipo 2. Ambas as lectinas apresentaram massas aproximadas de 12 kDa e mostraram-se eficazes na inibição de formação de biofilmes bacterianos de *Staphylococcus* spp.

Kumar e Barros (2020) isolaram uma lectina de *Ulva fasciata* (UFH), capaz de aglutinar eritrócitos do sistema ABO e possuindo cerca de 14,5 kDa, além de exibir boa estabilidade, tanto em alterações de temperatura e pH. Contudo, ainda são necessários mais testes para elucidar a estrutura da proteína e observar suas atividades biológicas *in vitro*.

Lee *et al.* (2022) demonstraram o potencial anticâncer de uma lectina extraída de *B. plumosa* (BPL2), onde a proteína se mostrou eficaz contra células tumorais pulmonares, mas baixa toxicidade contra células não-tumorais. Além disso, BPL2 exibiu efeito sinérgico com o fármaco gefitinibe, com cerca de 80% de redução da viabilidade celular, contra uma das linhagens de células utilizadas.

Em contrapartida, há conhecimento de apenas três lectinas derivadas de algas pardas, extraídas de *H. fusiformis*, *Padina australis* e *P. minor* (Fajarningsih *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2016). De acordo com Harrysson *et al.* (2018), o isolamento destas proteínas em algas pardas é afetado pela alta quantidade de compostos de natureza não-proteica, como polifenóis e polissacarídeos, que mascaram a atividade lectínica, tornando-as difíceis de serem identificadas.

Entre as lectinas de cianobactérias destacam-se as extraídas de *Nostoc ellipsoforum* (Boyd *et al.*, 1997), *Scytonema varium* (Bokesch *et al.*, 2003), *Microcystis viridis* (Bewley *et al.*, 2004), *M. aeruginosa* (Huskens *et al.*, 2010) e de *O. agardhii* (Sato; Okuyama; Hori, 2007) por suas atividades contra o HIV. Autores apontam que esta característica possa estar de alguma forma relacionado à presença de domínios repetidos em suas estruturas primárias (Huskens; Schols, 2012), além de suas especificidades à *N*-glicanos ricos em manose.

A função fisiológica das lectinas em algas marinhas ainda carece de um entendimento mais específico. Poucos estudos realizados evidenciam funções fisiológicas distintas como agregação de organelas e envolvimento no processo de reconhecimento de gametas. Uma lectina da alga verde *Bryopsis plumosa*, a bryohealina, foi isolada e estudada quanto sua participação na agregação de organelas e regeneração do protoplasto mediante ruptura do talo. Além disso, exibiu atividade antibacteriana para prevenir contaminação por patógenos (Klochkova *et al.*, 2005). A mesma funcionalidade já foi observada anteriormente em outras algas cenocíticas, como *Microdictyon umbilicatum* e *Chaetomorpha aerea* (Kim; Klochkova; West, 2002; Klochkova *et al.*, 2003). Nas rodófitas, observou-se que as lectinas das algas *Aglaothamnion callophyllidicola* e *A. oosumiense* estavam envolvidas no reconhecimento dos gametas masculinos e femininos (Han *et al.*, 2012a; Han *et al.*, 2012b), sugerindo uma estratégia adquirida pelo organismo para melhorar as taxas de sucesso reprodutivo.

Mesmo após meio século desde a primeira detecção destas proteínas em algas marinhas e apesar das mais de 17.500 espécies catalogadas atualmente (Algaebase, 2023a), apenas cerca de 60 lectinas oriundas destes organismos foram isoladas (Carneiro *et al.*, 2020). Assim, estas moléculas ainda carecem de estudos acerca de suas funcionalidades e caracterizações estruturais.

### **1.5 Lectinas da Família OAAH (Homólogas à aglutinina de *Oscillatoria agardhii*)**

As lectinas da família OAAH são proteínas que compartilham características estruturais semelhantes: repetições em tandem com cerca de 66 aminoácidos, onde cada repetição está ligada a um domínio de reconhecimento a carboidratos, preferência por ligação a resíduos de manose ou manopentosídeos e sua conformação estrutural se assemelha a um  $\beta$ -barril, além de diversas dessas proteínas apresentarem atividade antiviral, especialmente contra o HIV (Koharudin *et al.*, 2012).

A precursora desta família de lectinas foi a OAA, isolada da cianobactéria *Oscillatoria agardhii*, que também exibe alta especificidade para *N*-glicanos do tipo HM e, conseqüentemente, o reconhecimento de gp120 do envelope do vírus HIV (Sato; Hori, 2009; Sato; Okuyama; Hori, 2007). Contudo, genes que codificam proteínas homólogas a OAA já foram descobertas em um grande número de organismos, incluindo procariotos (cianobactérias, proteobactérias e clorobactérias) e também em algas vermelhas marinhas (Koharudin *et al.*, 2012).

As lectinas presentes nas algas vermelhas *Kappaphycus alvarezzi* e *Eucheuma serra* (KAA-2 e ESA-2, respectivamente), que também pertencem ao grupo das OAAH, exibiram atividade anti-influenza e isto pode estar relacionado com a especificidade de ambas por *N*-glicanos do tipo HM e preferência pela ligação  $\alpha$ 1-3 (Sato *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2015; Hirayama *et al.*, 2016). As lectinas EDA, de *Eucheuma denticulatum*, e KSA, de *Kappaphycus striatus*, também revelaram especificidade a *N*-glicanos do tipo HM (Hung *et al.*, 2015a; Hung *et al.*, 2015b), o que pode indicar que essas proteínas também exibem atividade antiviral, especialmente contra HIV e Influenza.

### **1.5.1 Lectina de *Amansia multifida* (AML)**

*Amansia multifida* (J. V. Lamouroux) (1809) é uma alga pertencente ao filo Rhodophyta, ordem Ceramiales e família Rhodomelaceae (FIGURA 3).

Figura 3 - *Amansia multifida*.



Fonte: o Autor.

A lectina de *A. multifida* foi isolada inicialmente através de precipitação proteica utilizando sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica em matriz de Dietilaminoetil (DEAE)-Celulose, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), em matriz de Phenyl-Sepharose CL-4B, e cromatografia de afinidade, em matriz de Avidina-Sepharose (Costa, 1995; Costa *et al.*, 1999).

Através de SDS-PAGE, a massa molecular estimada foi em 24,5 kDa, enquanto que por cromatografia de exclusão molecular, em coluna de Superose 12R, a massa estimada foi de 26,9 kDa. Por meio de focalização isoeétrica, verificou-se que a proteína apresentava cinco isoformas, com pontos isoeétricos variando entre 5,45 e 6,25 (Costa *et al.*, 1999).

A lectina exibiu capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com tripsina, contudo perdia sua eficácia quando aquecida acima de 40 °C, com perda total de sua atividade em 50 °C. A hemaglutinação não foi inibida por açúcares simples, mas a proteína mostrou uma forte afinidade por avidina, glicoproteína constituída por oligossacarídeos compostos por resíduos de manose e *N*-acetilglicosamina (Bruch; White, 1982; Costa *et al.*, 1999).

Lima *et al.* (1998) reportaram a capacidade da AML de induzir ou inibir a ativação de linfócitos humanos *in vitro*, como um uso em potencial da regulação da resposta imune. Neves *et al.* (2007) relataram as propriedades antinociceptivas da lectina em camundongos, de maneira dose-dependente, via oral ou intraperitoneal, com inibição dessa capacidade funcional na presença de avidina e manose.

Silva (2016) determinou a estrutura primária da AML, estabelecendo que a proteína pertence à família OAAH. AML possui quatro domínios repetidos na sua sequência de aminoácidos, além de um sítio de ligação a carboidrato bem conservado e com alta identidade com as lectinas do grupo. A proteína também foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células de câncer colorretal, de reduzir o número de células viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como apresentar atividade contra o HIV e possuir atividade antioxidante.

Mesquita *et al.* (2021) caracterizaram a AML estruturalmente, determinando os vinte primeiros aminoácidos do N-terminal. Os autores ainda determinaram a estrutura secundária por dicroísmo circular: composta por 4% de hélices- $\alpha$ , 43% de folhas- $\beta$ , 21% de voltas e 32% de estruturas aleatórias. A proteína se manteve estável até 42 °C, mas com completa desnaturação a 85 °C; por outro lado a variação de pH entre 3 e 11 não afetou a estrutura da molécula. Além disso, os autores também destacaram a capacidade anti-

inflamatória da lectina em camundongos em modelo de edema plantar, devido à modulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

### 1.5.2 Lectina de *Meristiella echinocarpa* (MEL)

*Meristiella echinocarpa*, atualmente denominada *Meristotheca gelidium* (J. Agardh) Faye & Masuda (2004), pertence ao filo Rhodophyta, ordem Gigartinales e família Solariaceae (FIGURA 4).

Figura 4 - *Meristiella echinocarpa*.



Fonte: o Autor.

Ainouz *et al.* (1992) testaram a presença de lectinas em diversas espécies de algas e detectaram que o extrato de *M. echinocarpa* aglutinava eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Posteriormente, Farias (1995) isolou a lectina, denominada MEL, a partir da combinação de cromatografias de troca iônica em matriz de DEAE-Sepharose e de afinidade em matriz de Manana-Sepharose CL-4B. Foi observado que a proteína apresentava um peso molecular de aproximadamente 30 kDa (estimada por SDS-PAGE). Através de focalização isoeletrica, foi detectada a presença de cerca de cinco bandas proteicas, sugerindo a existência de isoformas. Cada isolectina exibiu potencial mitogênico sobre linfócitos de humanos em baixas concentrações.

Chaves *et al.* (2018a) também isolaram a lectina de modo semelhante a Farias (1995), através de extrações etanólicas e por meio de cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sepharcel. A atividade hemaglutinante de MEL foi observada apenas em eritrócitos de coelho tratados com papaína e foi inibida apenas por manana de levedura.



Através de SDS-PAGE, os autores estimaram que MEL teria massa molecular com cerca de 30 kDa e por meio de espectrometria de massas (MALDI-ToF) teria 28,9 kDa. Por combinação de espectrometria de massas e clonagem de DNA, verificou-se que a proteína possui 267 resíduos de aminoácidos, com presença de apenas uma cisteína, indicando que não haveria ligações dissulfeto na molécula (Chaves *et al.*, 2018a).

Constatou-se ainda que MEL seria uma lectina da família OAAH, por meio do alinhamento com proteínas da mesma família com estrutura primária elucidada, como KAA-1, KAA-2, KSA-2 e ESA-2 (Chaves *et al.*, 2018a).

### 1.5.3 Lectina de *Solieria filiformis* (SfL)

*Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (1985) pertence ao filo Rhodophyta, ordem Gigartinales e família Solieriaceae (FIGURA 6).

A lectina de *S. filiformis* (SfL) foi purificada inicialmente por Benevides, Leite e Freitas (1996) através da utilização de técnicas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose e de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B. Em SDS-PAGE a massa estimada de SfL foi de 29 kDa.

Figura 5 - *Solieria filiformis*.



Fonte: o Autor

Benevides *et al.* (1998) estudaram as características tóxicas e antinutricionais de espécies algais do litoral cearense e observaram que o extrato de *S. filiformis* exibia toxicidade em camundongos e que aglutinava eritrócitos de coelho e humano do tipo O, tratados enzimaticamente com tripsina.

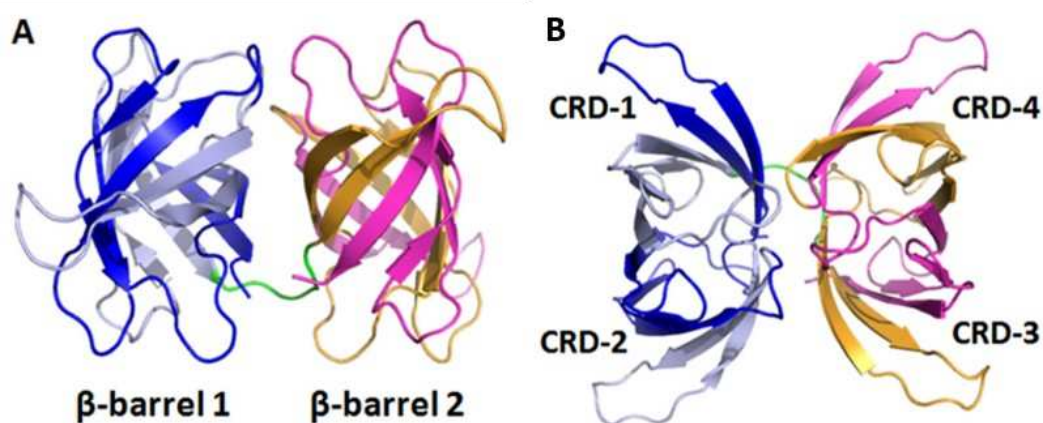
Holanda *et al.* (2005) observaram a capacidade inibitória da lectina sobre bactérias patogênicas. A proteína reduziu a densidade de diversas bactérias Gram-negativas, como *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e os autores sugeriram

que essa atividade esteja relacionada com a interação entre a lectina e os receptores presentes na membrana das cepas testadas.

Em estudos posteriores, Abreu (2012) relatou a presença de seis isoformas da proteína na alga, com um peso molecular médio aproximado de 26,2 kDa. A lectina também possui propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e efeitos imunomodulatórios, além de efeitos antidepressivos, representando um potencial agente terapêutico em diversos tratamentos (Abreu *et al.*, 2016; Abreu *et al.*, 2018).

Chaves *et al.* (2018b) identificaram duas isoformas de SfL, destacando que são pertencentes à família OAAH, e também avaliaram o efeito anticâncer das isolectina sobre células de câncer de mama (linhagem MCF-7). Posteriormente, Chaves *et al.* (2023) produziram uma das isoformas recombinantes de SfL (rSfL-1), além da estrutura tridimensional da proteína, determinada por cristalografia de raios X (FIGURA 7). Foi observado que a estrutura tridimensional de rSfL-1 (PDB ID: 7UMJ) se assemelha a dois  $\beta$ -barris, unidos por um curto peptídeo, cada um formado por cinco fitas antiparalelas. Foi verificado ainda que a proteína foi capaz de aglutinar células bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, bem como possui efeito cicatrizante, na redução da resposta inflamatória, ativação e proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno.

Figura 6 – Estruturas tridimensionais da isoforma rSfL-1.



Fonte: Adaptado de Chaves *et al.* (2023). Legenda: A – A isoforma se apresentam como duas estruturas de  $\beta$ -barril, formadas por dez fitas- $\beta$  antiparalelas. B – Em destaque os quatro domínios de reconhecimento a carboidratos nas extremidades superiores e inferiores.

## 1.6 Micro-organismos patogênicos: um problema de saúde mundial

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Flemming em 1928, são cada vez mais comuns os relatos da presença de cepas bacterianas resistentes à determinados grupos de antibióticos. Como forma de controle das infecções bacterianas causadas por cepas resistentes, novos agentes terapêuticos foram descobertos, como a vancomicina em 1958 e a meticilina em 1959. Contudo, poucas décadas depois já surgiam relatos de linhagens bacterianas multirresistentes aos diversos medicamentos (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

De acordo com Lee (2019) a resistência aos antibióticos pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca pode ser definida como aquela em que existem propriedades inerentes a própria bactéria, como a seletividade de entrada exibida na membrana das células Gram-negativas. A resistência adquirida é a forma mais comum, quando uma bactéria adquire um fator de resistência a determinado agente antibacteriano e transfere seu novo material genético para as novas células (transferência de plasmídeos por conjugação) ou também por mutação. Já a resistência adaptativa seria um resultado de modulações nas expressões genéticas como uma resposta às mudanças ambientais (pH do meio, concentração de íons e nutrientes, subníveis inibitórios de antibióticos entre outros). Segundo Motta, Cluzel e Aldana (2015), a modulação da expressão das bombas de efluxo e das porinas são um tipo de resistência adaptativa.

Comumente a resistência aos antibióticos é resultado da destruição ou modificação do agente, alterações do sítio de ligação, inativação enzimática ou alterações no sistema de transporte e bombas de efluxo (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

As  $\beta$ -lactamases, por exemplo, são enzimas produzidas pelas bactérias, capazes de destruir a ligação amida presente no anel  $\beta$ -lactâmico, responsáveis pela ação antimicrobiana. Em bactérias Gram-negativas a membrana externa é mais complexa e a baixa permeabilidade impede a entrada de agentes antibióticos específicos, contribuindo para o desenvolvimento da resistência adquirida (Breijyeh; Jubeh; Karaman, 2020).

As bombas de efluxo foram registradas inicialmente por Ball, Shales e Chopra (1980), quando fora observado que *E. coli* expulsava moléculas de tetraciclina para fora da célula bacteriana. Desde então diversos relatos de sistemas de efluxo foram identificados em ambos os tipos de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) (Floyd *et al.*, 2010; Zgurskaya, 2009; Machado, *et al.* 2018).

A emergência de grupos de micro-organismos resistentes a antibióticos foi alavancada principalmente por conta da facilidade de acessos a estes medicamentos em áreas fora do meio hospitalar, como na agricultura, aquicultura, pecuária, medicina veterinária,

controle de pragas e indústria farmacêutica (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020). A transmissão horizontal dos genes através dos plasmídeos teve papel-chave na propagação das cepas resistentes, que podem ser patogênicas ou virulentas (Davies; Davies, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2023), bactérias resistentes a antimicrobianos contribuem com cerca de 5 milhões de mortes anuais, estando entre os 10 principais motivos de ameaça a saúde pública. Estimativas apontam ainda que até 2050, as mortes associadas poderão atingir até 10 milhões de vítimas por ano (O'Neill, 2016). Sete patógenos foram responsáveis por mais de 670 mil mortes associadas a bactérias resistentes na Europa em 2019, sendo as duas principais *E. coli* e *S. aureus*. Como causas principais estão a infecção da corrente sanguínea, intra-abdominal e do trato respiratório (Mestrovic *et al.*, 2022).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, componente natural da microbiota humana, estando presente em diferentes partes do corpo, principalmente mucosas nasais, mucosa bucal e pele. Apesar disso, *S. aureus* pode se tornar patogênica após colonização acelerada e infecções nessas regiões (Pidwill *et al.*, 2021).

Doenças humanas causadas por *S. aureus* que variam desde pequenas infecções de pele a pneumonia, bacteremia (infecção na corrente sanguínea) e meningite (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015). Um dos fatores que contribui para a alta taxa de mortalidade por infecções bacterianas é o surgimento e o aumento do número de cepas resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que confere um elevado grau de mortalidade, variando entre 30 a 40% (Kim *et al.*, 2019).

Para combater infecções causadas por MRSA e em pacientes alérgicos a penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, a vancomicina, um antibiótico pertencente ao grupo dos glicopeptídeos começou a ser utilizada na década de 1980 como agente terapêutico (Cong; Yang; Rao, 2020; Rubinstein; Keynan, 2014; Stogios; Savchenko, 2020). A vancomicina atua na interrupção da síntese da parede celular bacteriana, com maior eficácia contra bactérias Gram-positivas e menor eficácia contra Gram-negativas, por conta de sua difícil entrada na parede celular externa (Cong; Yang; Rao, 2020).

Segundo levantamento de Cong, Yang e Rao (2020), cerca de 52 cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) foram reportadas desde 2002 em várias regiões do mundo. Por conta da escassez de informações, não existem protocolos de tratamentos para VRSA, mas recomenda-se a utilização de outros agentes terapêuticos, como daptomicina e linezolida, além do tratamento de feridas expostas e prevenções de infecções hospitalares.

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae* que coloniza o trato gastrointestinal humano, sem causar malefícios ao hospedeiro. Contudo, *E. coli* pode causar infecções intestinais ou extraintestinais, incluindo bacteremia e sepse, quando se reproduz demasiadamente ou invade outros tecidos. Com exceção de *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* é a causa mais comum de bacteremia em diversos países, além de ser a principal causa de meningite em recém-nascidos (Bonten *et al.*, 2021).

Viancelli *et al.* (2022) isolaram cepas de *Staphylococcus*, *Acinetobacter* e *Listeria* resistentes à oxacilina em diversos equipamentos médicos utilizados em emergências. A oxacilina é um antibiótico de curto-espectro de uso hospitalar, indicado principalmente contra cocos Gram-positivos, como estafilococos, estreptococos e pneumococos, produtores de penicilinase, uma enzima que degrada a penicilina (pertencente ao grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos). A penicilina atua na ativação de enzimas autolíticas que destroem a parede celular das bactérias. (Khanna; Gerriets, 2022)

Gasparrini *et al.* (2020) identificaram enzimas em bactérias patogênicas presentes no ambiente e em humanos que conferem resistência contra tetraciclina, além de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao mesmo fármaco, em ambiente hospitalar. A tetraciclina impede que as bactérias sintetizem as proteínas necessárias para o crescimento e reprodução, além de sua utilização contra infecções cutâneas, causadas por bactérias resistentes como MRSA (Balsalobre, 2014).

A resistência microbiana se tornou um dos maiores problemas de saúde global, que ainda carece de uma solução. Os atuais esforços estão focados no melhor diagnóstico das doenças, na melhor prescrição dos medicamentos e estratégias de prevenção de infecções. Além disso, existem diversos estudos acerca da prospecção de novas moléculas, de fontes naturais, com potencial antibacteriano. Contudo, poucos destes compostos estão sendo utilizados em fases clínicas (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Purificar as lectinas das algas vermelhas *Amansia multifida*, *Meristiella echinocarpa* e *Solieria filiformis*, produzir modelos de suas estruturas tridimensionais, além de avaliar seus efeitos antibacterianos em associação a antibióticos de diferentes classes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar as proteínas de interesse, AML, MEL e Sfl;
- Realizar a modelagem da estrutura tridimensional de AML e MEL, e verificar os possíveis sítios de reconhecimento aos carboidratos ou glicoproteínas;
- Construir uma árvore filogenética com base nas sequências de aminoácidos de lectinas pertencentes à família OAAH;
- Avaliar o potencial antibacteriano de cada lectina, contra as cepas *E. coli* ATCC 11303, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA), associadas aos antibióticos oxacilina e tetraciclina.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta do material biológico

A coleta das algas foi realizada nas praias do Pacheco e Paracuru, no litoral do estado do Ceará, Brasil, durante o período de maré-baixa de sizígia. Os espécimes foram transportados em sacos plásticos acondicionados em caixa térmica, contendo bolsas de gelo, até o Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar – Lab), no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde foram armazenados em *freezer* a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até sua utilização posterior. As coletas e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados pelos órgãos competentes (SISBIO ID: 33913-12; SISGEN ID: A1792FE).

#### 3.2 Purificação da AML

Para obtenção da AML foi utilizado o protocolo de Silva (2016), com modificações. As algas foram limpas manualmente, removendo sujeiras e organismos epífitos com auxílio de água destilada. Em seguida, as algas foram pesadas, cortadas em pequenos pedaços e maceradas utilizando nitrogênio líquido até a formação de um pó fino e, posteriormente, homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 contendo NaCl 150 mM (PBS), na proporção 1:3 (peso/volume) submetidos a agitação em incubadora orbital a 180 rpm por um período de 4 h. O material homogeneizado foi filtrado em malha de *nylon* e submetido a centrifugação a  $9000\times g$  por 25 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ao final desse processo o sobrenadante (extrato bruto) foi recuperado e guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até uso posterior.

O extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio na saturação de 70% por 4 h a uma temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após esse período o material foi novamente centrifugado a  $9000\times g$  por 25 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o resíduo precipitado foi solubilizado com tampão de extração (PBS), no menor volume possível, e foi denominado fração 0/70 (F 0/70). Essa fração foi dialisada contra água destilada por 8 h e a última troca foi realizada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,6 (PB).

Para o isolamento da lectina foi utilizada uma coluna de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel (2,0 cm x 5,0 cm), previamente equilibrada com PB. A fração contendo a lectina (P1) foi eluída com o mesmo tampão de equilíbrio e as demais proteínas retidas foram removidas com tampão PB contendo 1 M de NaCl (P2). As frações foram coletadas a cada 5

mL e monitoradas através de absorbância a 280 nm, em espectrofotômetro. A fração ativa (P1) foi dialisada e liofilizada e, por fim, submetida a teste de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho.

### 3.3 Purificação da MEL

Para a obtenção da MEL foi utilizado o protocolo de Chaves *et al.* (2018a). A alga foi limpa de sujeiras e organismos epífitos e macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi homogeneizado em etanol 70% frio na proporção 1:20 (peso/volume) e a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, a solução foi filtrada em membrana de *nylon* e os resíduos sólidos foram novamente suspensos em etanol 70%, como descrito acima, mais duas vezes, para remoção dos carboidratos. Por fim, os resíduos recuperados por filtração foram suspensos com etanol 20% na proporção 1:10 (peso/volume) e mantidos sob agitação por 4 h a 4 °C, para extração das proteínas. A mistura foi filtrada e centrifugada a 9000×g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante guardado a -20 °C até uso posterior.

O extrato de *M. echinocarpa* foi dialisado contra PB e submetido à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel (2,0 cm x 5,0 cm), previamente equilibrada com PB. Proteínas que não se ligaram à coluna foram removidas com tampão de equilíbrio e as frações retidas foram eluídas utilizando tampão PB com adição de 0,5 M de NaCl (P2) e com tampão PB contendo 1 M de NaCl (P3). A absorbância das frações coletadas foi analisada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 280 nm. A fração contendo a lectina (P2) foi dialisada e liofilizada e, posteriormente, submetida a teste de atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos de coelho.

### 3.4 Purificação da SfL

Para a obtenção da SfL foi utilizado o protocolo de Chaves *et al.* (2018b), com modificações. As algas foram limpas de sujeiras e organismos epífitos utilizando água destilada e maceradas com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O material foi homogeneizado em tampão PBS e submetido à agitação por 4 h em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi filtrada em malha de *nylon* e centrifugada a 9000×g por 25 min. Posteriormente, o sobrenadante foi recuperado e foi submetido à precipitação com sulfato de



amônio na saturação de 70% por 4 h e, em seguida, foi centrifugado a  $9000\times g$  por 25 min. O material precipitado foi solubilizado em PBS (Fração 0/70) e dialisado contra água destilada e a última troca foi realizada com PB.

Após centrifugação, a fração 0/70 foi submetida à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel (2,0 cm x 5,0 cm), previamente equilibrada com PB. A fração contendo a lectina (P1) foi eluída com tampão de equilíbrio e as demais proteínas retidas foram lavadas com PB contendo 1 M de NaCl (P2). As frações coletadas em tubos foram analisadas através da leitura de suas absorbâncias a 280 nm, em espectrofotômetro. A fração contendo a lectina (P1) foi dialisada e liofilizada e, posteriormente, testada através de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho.

### **3.5 Atividade hemaglutinante**

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados utilizando eritrócitos de coelhos, mantidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. As coletas foram regulamentadas e autorizadas pelos órgãos competentes (CEUAP nº 2211202101). Os testes foram realizados com ambos os eritrócitos, nativos e tratados com as enzimas papaína e tripsina, seguindo o método da diluição seriada, em placas de microtitulação de fundo “em V”, segundo Sampaio, Rogers e Barwell (1998).

### **3.6 Avaliação da homogeneidade das lectinas**

A massa molecular das lectinas e os seus respectivos graus de pureza foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), corado com *Coomassie Brilliant Blue*, por meio da correlação da migração da proteína no gel com a migração dos marcadores moleculares de massa molecular conhecida, em condições não redutoras. As amostras foram previamente aquecidas a 100 °C durante 5 min e centrifugadas posteriormente para aplicação no gel (Laemmli, 1970).

### **3.7 Modelagem da estrutura tridimensional**

A predição estrutural das proteínas AML e MEL foi realizada pelo servidor *online* I-TASSER como descrito por Zheng *et al.* (2019), utilizando as sequências de aminoácidos das

proteínas resolvidas por Silva (2016) e Chaves *et al.* (2018a). Foram aceitos valores de C-score entre [-1 e 2] e TM-score entre [0,5 e 1]. Através da ferramenta COACH foi possível prever o sítio de ligação das lectinas a variados carboidratos. Os melhores modelos obtidos foram examinados visualmente utilizando o *software* PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

### 3.8 Análise da sequência de aminoácidos e relação filogenética entre as proteínas

Para o alinhamento entre as estruturas primárias das lectinas do grupo OAAH foi utilizado o servidor *online* MultAlin, empregando a matriz Blosum62-12-2, em conjunto com a ferramenta ESPript 3.0, com score global de 0.5 (Corpet, 1988; Robert; Gouet, 2014).

A relação filogenética entre AML, MEL e SfL com outras lectinas da família OAAH foi avaliada pela construção de uma árvore filogenética utilizando o *software* MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Lectinas de algas vermelhas pertencentes a outras famílias foram utilizadas como *outgroup*. Os múltiplos alinhamentos das sequências de AML, MEL e SfL com as demais proteínas foi realizado pela ferramenta MUSCLE. A árvore filogenética foi construída, baseada em múltiplos alinhamentos, pelo algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ). A análise de *bootstrap* de 500 replicações foram realizadas para avaliar a precisão das ramificações resultantes.

### 3.9 Atividade antibacteriana das lectinas

#### 3.9.1 *Micro-organismos e condições de cultura*

As bactérias utilizadas no estudo foram *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303, que pertencem à coleção de culturas microbiana do Laboratório de Microbiologia aplicada do Laboratório Integrado de Biomoléculas. Inicialmente, as cepas foram inoculadas em Ágar Müeller-Hinton (MHA; KASVI, Brasil) por 24 h a 37 °C. Colônias isoladas foram ativadas em 10 mL de Caldo Müeller-Hinton (MHB; KASVI, Brasil) por um período de 24 h a 37 °C. As células foram centrifugadas (5 min a 9000×g a 25 °C), ressuspensas em MHB, ajustadas para uma concentração final de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL por densidade óptica a 620 nm (as curvas de calibração foram previamente determinadas para cada bactéria) e então guardadas para uso posterior.

### 3.9.2 Atividade antibacteriana das lectinas com antibióticos

O método *checkerboard* é a técnica mais comumente utilizada para avaliação *in vitro* de sinergia entre substâncias com capacidade antibacteriana. O termo se refere a múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) para os micro-organismos 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 esta análise foi utilizada a metodologia de Duarte *et al.* (2023), onde foram avaliadas as combinações de AML, MEL e SfL com os antibióticos oxacilina e tetraciclina, contra as bactérias descritas anteriormente. Para cada combinação testada foram utilizados 25 poços da microplaca de 96 poços de fundo em "U", sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa (das linhas A à E) e as lectinas na concentração constante de 125 µg/mL (nas colunas 1 à 5). As placas foram preenchidas com 50 µL do antibiótico, 50 µL da lectina e 100 µL do inóculo bacteriano previamente ajustado ( $5,0 \times 10^5$  UFC/mL). A linha F foi utilizada como controle da CIM isolada de cada antibiótico (CIM<sub>1</sub>).

Após a montagem do experimento, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, em cada poço foi adicionado resazurina (250 µg/mL) e para determinação da nova CIM em associação com os antibióticos (CIM<sub>2</sub>) a densidade óptica foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® i3). Para bactérias que apresentaram valores iguais a  $1/2 \times$  CIM<sub>1</sub> do antibiótico considerou-se efeito aditivo e valores entre  $1/4$  e  $1/16$  como efeito sinérgico; valores  $1 \times$  CIM<sub>1</sub>,  $2 \times$  CIM<sub>1</sub>, consideramos como não interação ou efeito antagônico, respectivamente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Purificação e homogeneidade das lectinas

A lectina de *A. multifida* foi purificada através de combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, como descrito por Silva (2016). AML foi eluída da matriz utilizando tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (P1). Por meio de SDS-PAGE 15% em condições não-redutoras foi possível estimar uma massa molecular relativa de 28 kDa (FIGURA 7A e 7D).

A lectina de *M. echinocarpa* foi purificada através de combinação de extrações etanólicas e cromatografia líquida de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, como descrito por Chaves *et al.* (2018a). MEL foi eluída da matriz utilizando tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M (P2). Por meio de SDS-PAGE 15% em condições não-redutoras foi possível estimar uma massa molecular relativa de 30 kDa (FIGURA 7B).

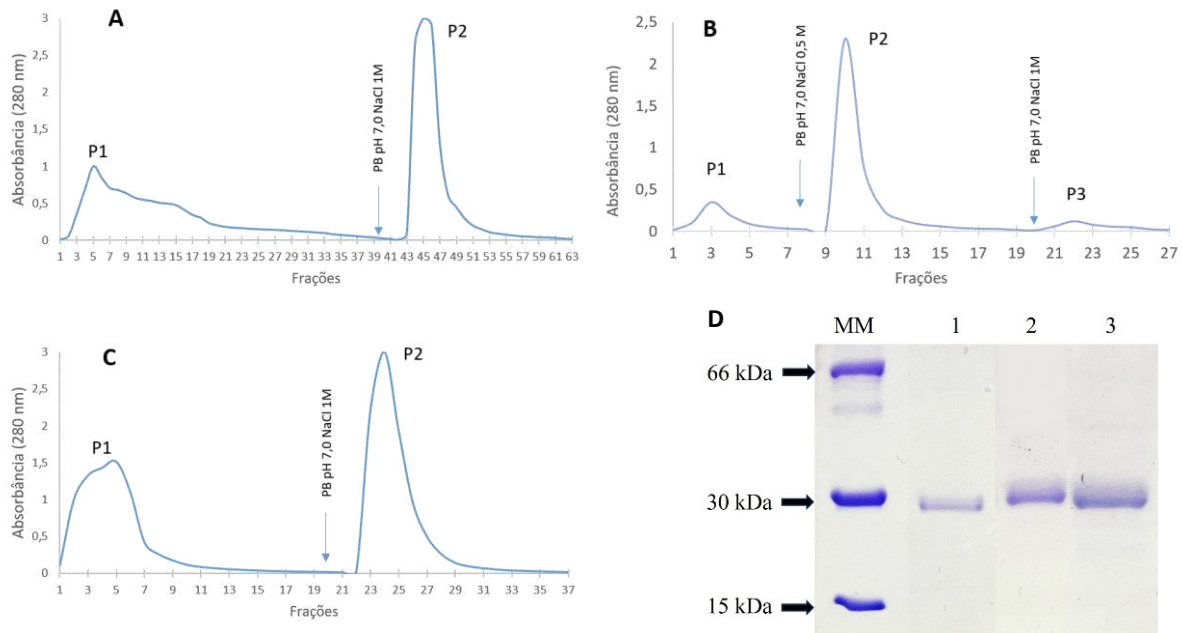
A lectina de *S. filiformis* foi purificada através de combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, como descrito por Chaves *et al.* (2018b). SfL foi eluída da matriz utilizando tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (P1). Por meio de SDS-PAGE 15% em condições não-redutoras foi possível estimar uma massa molecular relativa de 29 kDa (FIGURA 7C).

AML e MEL apresentaram atividade hemaglutinante contra os eritrócitos de coelho, ambos nativos e tratados enzimaticamente, com tripsina e papaína. Já SfL apresentou hemaglutinação apenas sobre os eritrócitos tratados com tripsina.

### 4.2 Modelagem das estruturas tridimensionais de AML e MEL

As estruturas tridimensionais de AML e MEL foram obtidas utilizando o servidor *online* I-TASSER. O melhor modelo de AML mostrou C-score = 1.14; TM-score =  $0.87 \pm 0.07$  e; RMSD =  $3.7 \pm 2.5$  Å. O melhor modelo gerado para MEL apresentou os seguintes parâmetros: C-score = 0.99; TM-score =  $0.85 \pm 0.08$  e; RMSD =  $3.9 \pm 2.7$  Å.

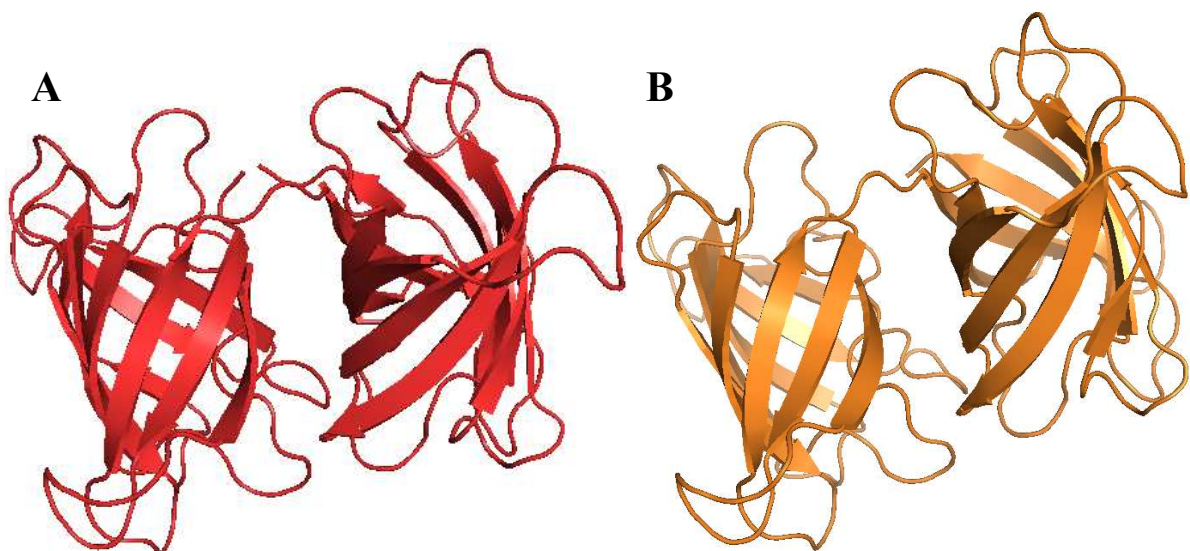
Figura 7 – Cromatografias de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel de AML, MEL e SfL e SDS-PAGE 15%.



Fonte: o Autor. As cromatografias foram realizadas com os seguintes parâmetros: volume de matriz = 15 mL ( $2,0 \times 5,0$  cm); volume de amostra = 30 mL; volume das frações eluídas = 100 mL. Legenda: MM (marcador molecular: HSA 66 kDa, rSfL 30 kDa e CcL 15 kDa); Linha 1 – AML não reduzida (50  $\mu$ g); Linha 2 – MEL não reduzida (50  $\mu$ g); Linha 3 – SfL não reduzida (50  $\mu$ g).

De acordo com os resultados obtidos, ambos os modelos estruturais de AML e MEL possuem duas cadeias em arranjo do tipo  $\beta$ -barril, formado por cerca de 10 fitas- $\beta$  antiparalelas, unidas por uma curta ligação peptídica entre as cadeias (FIGURAS 8A e 8B).

Figura 8 – Predição da estrutura tridimensional de AML e MEL.

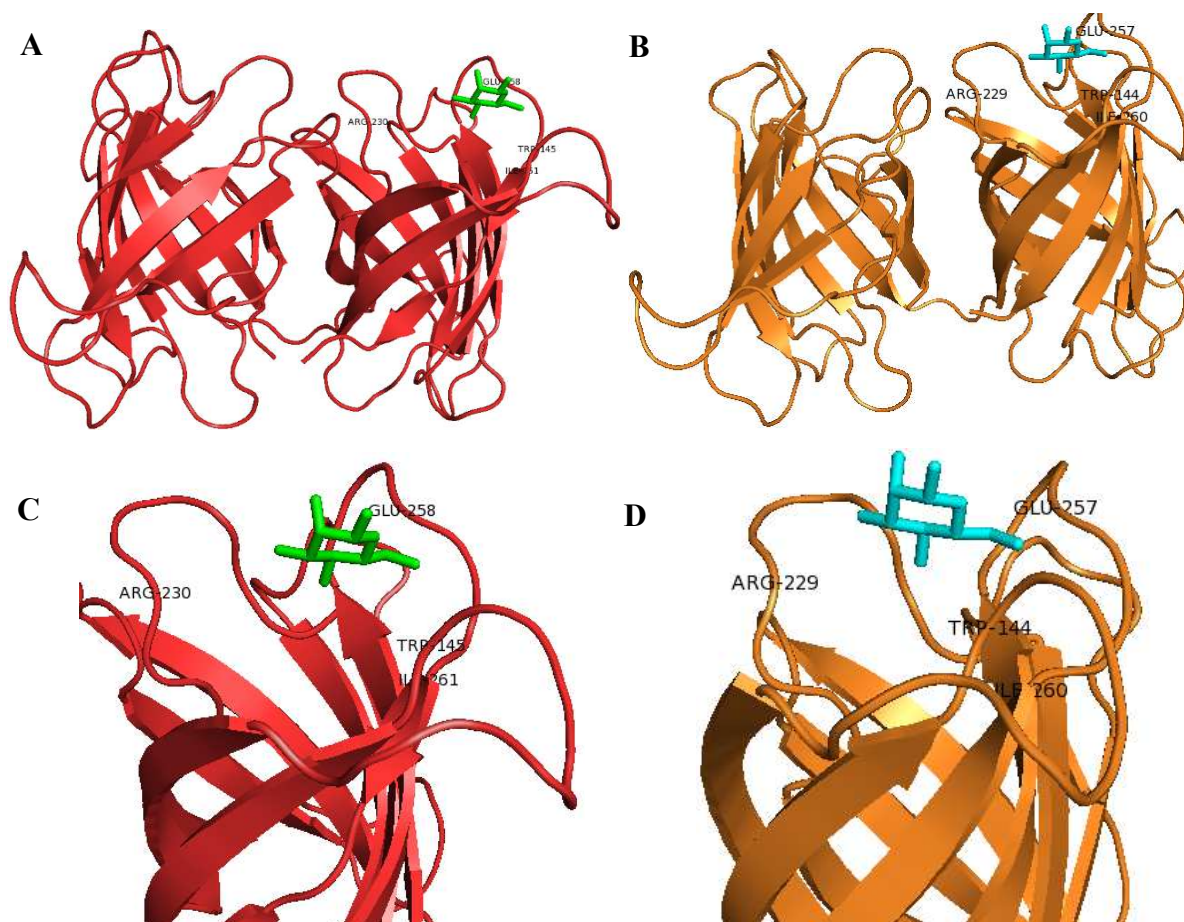


Fonte: o Autor. (A) AML: A primeira cadeia contendo 10 fitas- $\beta$  antiparalelas e a segunda cadeia contendo 10 fitas- $\beta$  antiparalelas, unidas por uma curta ligação peptídica; (B) MEL: A primeira cadeia contendo 9 fitas- $\beta$  antiparalelas e a segunda cadeia contendo 10 fitas- $\beta$  antiparalelas, unidas por uma curta ligação peptídica.

Através da ferramenta COACH foi possível prever o domínio de reconhecimento a carboidratos de cada proteína. Em AML foi prevista a ligação com o monossacarídeo D-manose (PubChem: 439680) e os resíduos envolvidos na ligação previsto pelo servidor foram: W<sup>145</sup>, R<sup>230</sup>, E<sup>258</sup> e I<sup>261</sup> (FIGURA 9A), com C-score = 0.25. De modo similar, em MEL também foi prevista a ligação com D-manose e os resíduos envolvidos na ligação previsto pelo servidor foram: W<sup>144</sup>, R<sup>229</sup>, E<sup>257</sup> e I<sup>260</sup> (FIGURA 9B), com C-score = 0.30.

Ainda de acordo com a ferramenta COACH, as estruturas de BOA (Agglutinina de *Burkholderia oklahomensis*, PDB ID: 4GK9) e MBHA (Hemaglutinina da mixobactéria *Myxococcus xanthus*, PDB ID: 4FBR) mostraram as maiores analogias com as estruturas previstas, tanto de AML (TM-score = 0.989 e 0.957, respectivamente) quanto de MEL (TM-score = 0.983 e 0.976, respectivamente).

Figura 9 – Previsão do sítio de ligação das lectinas aos carboidratos.



Fonte: o Autor. (A) AML e D-manose (em verde); (B) MEL e D-manose (em ciano). (C) Vista ampliada do sítio de ligação de AML; (D) Vista ampliada do sítio de ligação de MEL.

### 4.3 Análise da sequência de aminoácidos e relação filogenética

Na Figura 10, encontra-se o alinhamento entre as estruturas primárias das lectinas da família OAAH, utilizando o servidor MultAlin em conjunto com ESPrpt 3.0. Além disso, a Figura 11 exibe a árvore filogenética de proteínas da família OAAH, e demais proteínas oriundas de algas vermelhas, bactérias e cianobactérias (*outgroup*).

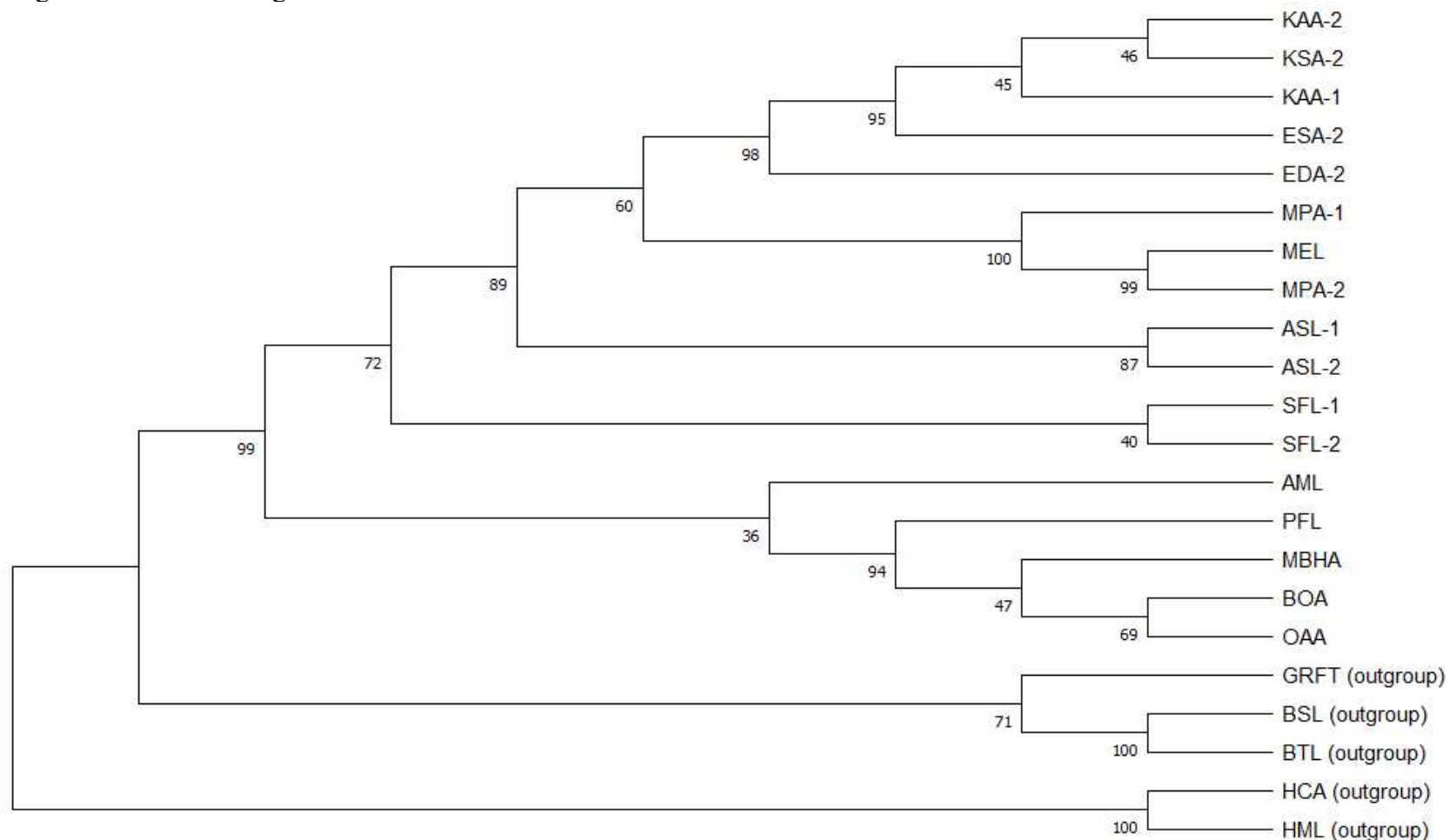
Figura 10 – Alinhamento das estruturas primárias de lectinas da família OAAH.

		1	10	20	30	40
AML	.....	G	R	R	Y	T
MEL	.....	.	G	R	Y	T
MPA-1	.....	M	G	R	Y	T
MPA-2	.....	M	G	R	Y	T
KAA-1	.....	M	G	R	Y	T
KAA-2	.....	M	G	R	Y	T
KSA-2	.....	M	G	R	Y	T
ESA-2	.....	.	G	R	Y	T
EDA-2	.....	M	G	R	Y	T
ASL-1	.....	M	G	R	Y	T
ASL-2	.....	M	A	R	Y	T
SFL-1	.....	.	G	R	Y	T
SFL-2	.....	.	G	R	Y	S
MBHA	.....	M	A	A	Y	L
BOA	S	V	D	M	T	K
OAA	.....	.	A	L	Y	N
PFL	.....	M	S	K	Y	A
consensus>50	.....	m	g	r	y	t
		50	60	70	80	90
AML		L	T	G	T	M
MEL		L	S	G	T	M
MPA-1		L	T	G	T	M
MPA-2		L	T	G	T	M
KAA-1		L	N	G	T	M
KAA-2		L	N	G	T	M
KSA-2		L	N	G	T	M
ESA-2		L	N	G	T	M
EDA-2		L	G	T	M	T
ASL-1		L	T	G	T	M
ASL-2		L	T	G	T	M
SFL-1		L	T	G	T	M
SFL-2		L	T	G	T	M
MBHA		L	K	G	T	M
BOA		L	T	G	T	M
OAA		L	N	G	T	M
PFL		F	T	G	T	M
consensus>50		l	t	g	t	m
		110	120	130	140	150
AML		L	K	I	K	S
MEL		L	D	I	K	S
MPA-1		L	D	I	K	S
MPA-2		L	D	I	K	S
KAA-1		V	N	I	T	S
KAA-2		V	N	I	T	S
KSA-2		V	N	I	T	S
ESA-2		V	N	I	T	S
EDA-2		L	N	V	S	S
ASL-1		L	D	V	N	S
ASL-2		L	D	V	N	S
SFL-1		V	D	V	N	S
SFL-2		M	N	V	T	S
MBHA		V	S	I	K	S
BOA		L	D	I	E	S
OAA		I	N	V	E	S
PFL		L	S	V	T	S
consensus>50		l	n	!	s	s





Figura 11 – Árvore filogenética de lectinas da família OAAH.



Fonte: o Autor. Cladograma construído pelo *software* MEGA X. **KAA-1** e **KAA-2** – Lectinas de *Kappaphycus alvarezzi*; **KSA-2** – Lectina de *Kappaphycus striatus*; **ESA-2** – Lectina de *Eucheuma serra*; **EDA-2** – Lectina de *Eucheuma denticulatum*; **MPA-1** e **MPA-2** – Lectinas de *Meristotheca papulosa*; **MEL** – Lectina de *Meristiella echinocarpa*; **ASL-1** e **ASL-2** – Lectinas de *Agardhiella subulata*; **SFL-1** e **SFL-2** – Lectinas de *Solieria filiformis*; **AML** – Lectina de *Amansia multifida*; **MBHA** – Hemaglutinina da mixobactéria *Myxococcus xanthus*; **PFL** – Lectina de *Pseudomonas fluorescens*; **BOA** – Aglutinina de *Burkholderia oklahomensis*; **OAA** – Aglutinina de *Oscillatoria agardhii*; **GRFT** – Lectina de *Griffithsia* sp.; **BSL** – Lectina de *Bryothamnion seaforthii*; **BTL** – Lectina de *Bryothamnion triquetum*; **HCA** – Lectina de *Hypnea cervicornis*; **HML** – Lectina de *Hypnea musciformis*.

#### 4.4 Efeito antibacteriano das lectinas em associação com antibióticos

Os resultados dos ensaios avaliando os efeitos das lectinas sobre cepas patogênicas estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3. AML e MEL não exibiram atividade antibacteriana em combinação com o uso de oxacilina, com CIM<sub>2</sub> mais elevada que o uso o antibiótico isolado (CIM<sub>1</sub>) para as três cepas testadas. Contudo, ambas as proteínas apresentaram atividade sinérgica, em conjunto com tetraciclina, contra *S. aureus* ATCC 25923 (redução de 0,250 µg/mL para 0,0625 µg/mL) e atividade aditiva contra *S. aureus* 700698 (redução de 128 µg/mL para 64 µg/mL) e *E. coli* ATCC 11303 (redução de 1 µg/mL para 0,5 µg/mL).

De modo semelhante, SfL, em combinação com oxacilina, exibiu efeito antagônico contra as cepas Gram-positivas e não interagiu com a cepa Gram-negativa; porém em combinação com tetraciclina, a lectina exibiu atividade sinérgica e aditiva contra *S. aureus* ATCC 25923 (redução de 0,250 para 0,0318 µg/mL) e *S. aureus* 700698 (redução de 128 µg/mL para 64 µg/mL), respectivamente, mas não houve melhoria nos efeitos inibitórios contra *E. coli*.

Tabela 1 – Efeito da lectina AML combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

BACTÉRIAS	OXACILINA			EFEITO	TETRACICLINA			EFEITO
	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	0,250	1	Não interação	0,250	0,0625	1/4	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	256	2	Antagônico	128	64	1/2	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	512	2	Antagônico	1	0,5	1/2	Aditivo

Fonte: o Autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina AML, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 512 a 0,250 µg/mL para oxacilina e de 128 a 0,250 µg/mL para tetraciclina. A concentração de AML 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 ou antagônico.

Tabela 2 – Efeito da lectina MEL combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia. coli*.

BACTÉRIAS	OXACILINA			EFEITO	TETRACICLINA			EFEITO
	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	0,250	1	Não interação	0,250	0,0625	1/4	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	256	2	Antagônico	128	64	1/2	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	512	2	Antagônico	1	0,5	1/2	Aditivo

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina MEL e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 512 a 0,250 µg/mL para oxacilina e de 128 a 0,250 µg/mL para tetraciclina. A concentração de MEL 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 ou antagônico.

Tabela 3 – Efeito da lectina SFL combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

BACTÉRIAS	OXACILINA			EFEITO	TETRACICLINA			EFEITO
	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	0,5	2	Antagônico	0,250	0,0312	1/8	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	256	2	Antagônico	128	64	1/2	Aditivo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	256	1	Não interação	1	1	1	Não interação

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina SFL e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 512 a 0,250 µg/mL para oxacilina e de 128 a 0,250 µg/mL para tetraciclina. A concentração de SFL 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 ou antagônico.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, três lectinas de algas marinhas vermelhas foram purificadas e, com base em sua estrutura primária, estudos estruturais foram realizados, além de evidenciar os seus potenciais antibacterianos contra cepas patogênicas.

O perfil eletroforético das lectinas em SDS-PAGE se manteve próximo ao encontrado na literatura, com pesos moleculares variando entre 28 e 30 kDa, como já havia sido relatado em trabalhos anteriores (Benevides *et al.*, 1996; Chaves *et al.*, 2018a; Chaves *et al.*, 2018b; Farias, 1995; Mesquita *et al.*, 2021; Silva, 2016). Lectinas membros da família OAAH, como KAA-2, KSA-2, ESA-2, EDA-2, também possuem massas moleculares similares às encontradas neste estudo (Sato; Hori, 2011; Hung *et al.*, 2015a; Hung *et al.*, 2015b; Sato *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2015).

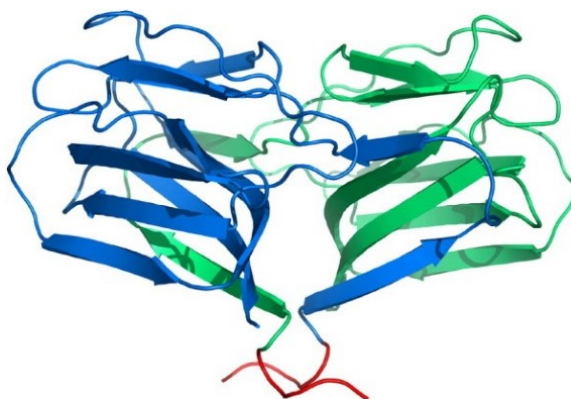
As lectinas da família OAAH possuem cerca de 66 aminoácidos em sua cadeia, que podem se repetir, originando proteínas de tamanhos variados (Koharudin *et al.*, 2012). AML, MEL e Sfl possuem em sua estrutura 269, 267 e 268 resíduos de aminoácidos, respectivamente, significando cerca de quatro repetições de domínio. MBHA e BOA, que também integram a família OAAH, possuem em suas sequências 267 e 279 aminoácidos, respectivamente. O mesmo ocorre com ASL, EDA-2, ESA-2, KAA-2, KSA-2, KSL e MPA, lectinas isoladas de macroalgas vermelhas, que possuem cerca de 268 aminoácidos em sua estrutura (Hirayama; Teramoto; Hori, 2014; Hori; Hirayama; Shibata, 2014; Hung *et al.*, 2015a; Hung *et al.*, 2015b; Hung; Trinh, 2021; Sato *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2015).

Por outro lado, PFL e a própria OAA possuem, respectivamente, 133 e 132 resíduos na sequência, significando duas repetições de domínio de 66 aminoácidos. Isso se reflete na estrutura tridimensional das moléculas, onde os domínios estão associados a conformações de fitas- $\beta$ . Em PFL e OAA existem 10 fitas- $\beta$  antiparalelas que, em conjunto, estruturam um único  $\beta$ -barril (Koharudin; Furey; Gronenborn, 2011; Koharudin *et al.*, 2012). Entretanto, nas demais lectinas da família OAAH que possuem mais de 260 aminoácidos em sua sequência, o que se percebe são duas conformações de  $\beta$ -barril, construídas de fitas- $\beta$  antiparalelas e unidas por uma curta ligação peptídica (Koharudin *et al.*, 2012; Whitley *et al.*, 2013).

De acordo com a predição estrutural realizada pelo servidor online I-TASSER a partir das estruturas primárias fornecidas, AML e MEL seguem conformações estruturais similares às de outras proteínas da família OAAH.

A primeira estrutura tridimensional de uma lectina de alga vermelha foi resolvida por Ziólkowska *et al.* (2006) para a lectina GRFT (NCBI ID: P84801), de *Griffithsia* sp. A proteína possui uma conformação estrutural, caracterizada como um prisma- $\beta$ , do tipo jacalina, consistindo de três repetições de quatro fitas- $\beta$  antiparalelas (FIGURA 12).

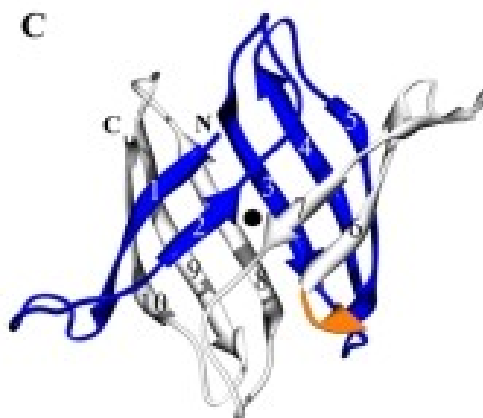
Figura 12 – Estrutura tridimensional de GRFT.



Fonte: Ziólkowska *et al.* (2006).

A primeira estrutura tridimensional de uma proteína membro da família OAAH foi descrita por Koharudin, Furey e Gronenborn (2011) para OAA (FIGURA 13; PDB ID: 3OBL). A proteína foi produzida de forma recombinante, utilizando *E. coli* e marcação com selenometionina para os ensaios cristalográficos. Segundo os autores, OAA possui uma conformação estrutural compacta do tipo  $\beta$ -barril, com 10 fitas- $\beta$  antiparalelas, formando apenas um único domínio.

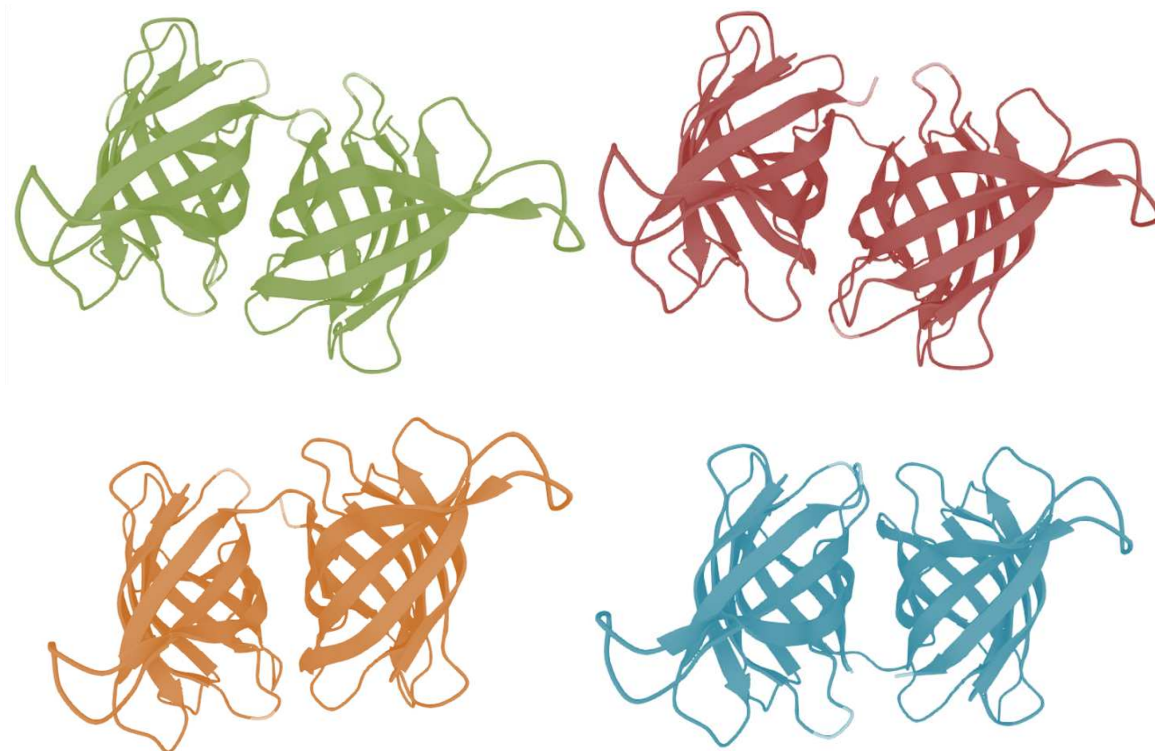
Figura 13 – Estrutura tridimensional de OAA.



Fonte: Adaptado de Koharudin, Furey e Gronenborn (2011).

Modelos tridimensionais das demais proteínas da família OAAH também já foram preditas por outros servidores *in silico* (FIGURA 14), como é o caso de ASL-1 (AlphaFold ID: A0A1V1FYQ3) e ASL-2 (AlphaFold ID: A0A1V1G208), MPA-1 (AlphaFold ID: A0A1V1FLU0) e MPA-2 (AlphaFold ID: A0A1V1FN78), ESA-2 (AlphaFold ID: P84331) e EDA-2 (AlphaFold ID: A0A0H5AVG8). Todas as estruturas modeladas se assemelham a conformação de  $\beta$ -barril.

Figura 14 – Modelagens estruturais putativas de ASL-1, EDA-2, ESA-2 e MPA-1.



Fonte: o Autor. Modelagens obtidas no servidor *online* UniProt. Em **verde** – **ASL-1** (lectina de *Agardhiella subulata*, ID: A0A1V1FYQ3); em **vermelho** – **EDA-2** (lectina de *Eucheuma denticulatum*, ID: A0V0H5AVG8); em **laranja** – **ESA-2** (lectina de *Eucheuma serra*, ID: P84331); em **ciano** – **MPA-1** (lectina de *Meristotheca papulosa*, ID: A0A1V1FLU0).

Em sua maioria, as regiões de aminoácidos conservados nos modelos de AML e MEL estão nas posições <sup>8</sup>NQWGG<sup>13</sup>, <sup>49</sup>GTMTY<sup>53</sup>, <sup>55</sup>EGPIGF<sup>61</sup>, <sup>77</sup>QWGG<sup>80</sup> e <sup>125</sup>GPIGF<sup>129</sup>. Os domínios de reconhecimento das lectinas da família OAAH possuem consensos na sequência que incluem três regiões específicas: <sup>7</sup>NQWGG<sup>11</sup>, <sup>93</sup>GxRxQxV<sup>99</sup> e <sup>122</sup>GEGPIGF<sup>128</sup>. Essas regiões costumam estar inseridas em regiões entre as fitas- $\beta$ , com repetições que variam de acordo com o total de aminoácidos da proteína (Mitchell; Ramessar; O’Keefe, 2017).

MEL foi agrupada na família OAAH por possuir estrutura primária similar a MPA-2, MPA-1, ASL-1, ASL-2, KAA-2, KSA-2 e EDA-2, com identidades variando entre 84% e

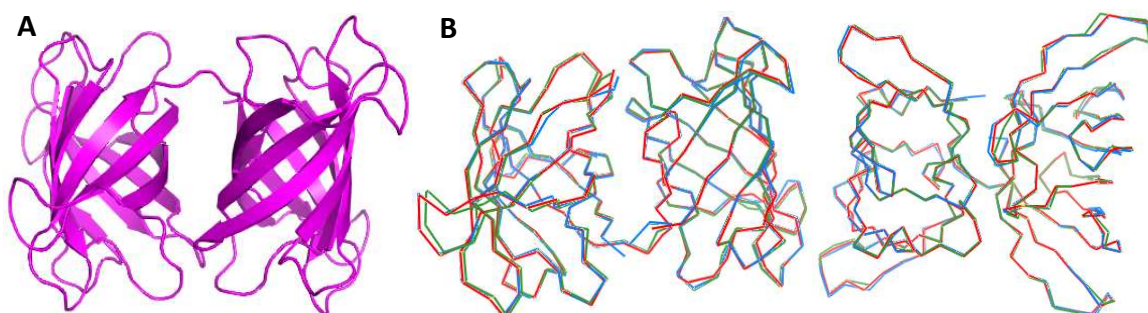


97% (Chaves *et al.*, 2018a). Entre essas proteínas, destacam-se as sequências “NQWGGSSAPW” e “EGPIGF”. De acordo com o previsto pela ferramenta COACH, os aminoácidos envolvidos no reconhecimento aos carboidratos em AML e MEL se situam nas posições W<sup>145/146</sup>, R<sup>230/231</sup>, E<sup>258/259</sup> e I<sup>261/262</sup>, respectivamente. Os aminoácidos estão inclusos nos motivos conservados “NQWGG”, “GDR” e “EGPIGF” da família OAAH. Whitley *et al.* (2013) apontam que essas regiões também representam sítios de ligação a carboidrato em BOA.

Em AML e MEL foi prevista a ligação com o monossacarídeo D-manose, envolvendo os aminoácidos mencionados anteriormente, com C-score = 0.25 e 0.30, respectivamente. O C-score possui valor entre [-5 e 2], onde quanto maior o valor, maior será a qualidade do modelo (Zheng *et al.*, 2019). Dessa forma, os modelos obtidos apresentaram uma boa topologia global. As estruturas de BOA e MBHA mostraram as maiores analogias com as estruturas previstas, tanto de AML quanto de MEL, com TM-score  $\geq 0.916$ . Os valores de TM-score (que variam de 0 à 1) indicam que as estruturas tiveram um ótimo alinhamento por homologia com os modelos utilizados.

Para uma maior relevância dos modelos estruturais obtidos da ferramenta I-TASSER, um modelo de SfL também foi submetido a análise *in silico*. Além disso, também foi realizada a sobreposição dos três modelos das lectinas, AML, MEL e SfL, para comparação dos resultados (FIGURA 15). O C-score obtido para o modelo de SfL foi de 0.79, inferior aos encontrados para AML e MEL, mas ainda de boa qualidade. O TM-score estimado foi de  $0.82 \pm 0.08$ , possuindo as maiores analogias com BOA e MBHA.

Figura 15 – Modelo estrutural de SfL e sobreposição das estruturas de AML, MEL e SfL.



Fonte: o Autor. Modelos obtidos através da ferramenta *online* I-TASSER e visualização através do *software* PyMOL. Legenda: **A** – Modelo estrutural de SfL; **B** – Sobreposição dos modelos estruturais de AML (em azul), MEL (em verde), SfL (em vermelho).

Chaves *et al.* (2018) realizaram estudos sobre modelagem tridimensional de duas isoformas de SfL, utilizando a estrutura cristalográfica de BOA ligada a 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -manopentose como modelo estrutural e verificou que o melhor RMSD calculado entre as estruturas foi de 1.3 Å. Posteriormente, Chaves *et al.* (2023) determinaram que a estrutura cristalográfica de rSfL-1 possuía resolução de 1.88 Å (PDB ID: 7UMJ) e verificaram que as maiores analogias entre rSfL-1, BOA e MBHA resultaram em um RMSD de 0.943 Å e 1.069 Å, respectivamente. No presente trabalho, as melhores resoluções de AML e MEL foram determinadas como 3.7 Å e 3.9 Å, respectivamente. As diferenças entre os resultados podem estar relacionadas com os *softwares* utilizados, bem como na metodologia empregada em cada ensaio.

A maioria das lectinas de macroalgas vermelhas não reconhecem carboidratos simples, mas podem reconhecer estruturas complexas de glicoproteínas (Singh; Walia, 2018). Lectinas membros da família OAAH compartilham uma característica de ligação a manosídeos e *N*-glicanos do tipo HM (Chaves *et al.*, 2018a; Chaves *et al.*, 2018b; Sato *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2015; Silva, 2016; Whitley *et al.*, 2013). Essa similaridade também foi encontrada em lectinas de cianobactérias (MVN, SVN e CV-N), rodófitas (GRFT) e clorófitas (BCA) (Bewley; Otero-Quintero, 2001; Bolmstedt *et al.*, 2001; Garrison *et al.*, 2014; Kehr *et al.*, 2006).

Pelo cladograma da árvore filogenética das proteínas da família OAAH construído é possível observar que grande parte das lectinas (KSA, KAA, ESA, EDA, MPA, ASL, MEL e SfL) foram agrupadas em um mesmo clado, indicando proximidade evolutiva entre as espécies de algas vermelhas.

*Kappaphycus*, *Eucheuma*, *Meristotheca*, *Agardhiella*, *Meristiella* e *Solieria* são gêneros de rodófitas pertencentes a ordem Gigartinales e família Solieriaceae. Segundo análise da sequência de aminoácidos pela ferramenta *online* UniProt, as lectinas dessas algas compartilham de identidades que variam entre 75% e 99% (Uniprot, 2023). Contudo, HML e HCA, isoladas de algas do gênero *Hypnea*, (ordem Gigartinales, família Cystocloniaceae) não exibem qualquer similaridade com as demais lectinas, mas possuem similaridade de 80% entre si (Nagano *et al.*, 2005).

Atualmente, a ordem Gigartinales abrange cerca de 40 famílias e quase 1.000 espécies de algas vermelhas. A categorização das famílias é baseada no desenvolvimento de características do sistema reprodutivo feminino, como a estrutura do carpogônio, localização das células auxiliares e a formação das células de fusão e filamentos gonimoblastos iniciais (Algaebase, 2023b; Skriptsova, 2021).

Curiosamente, AML foi agrupada mais próxima às lectinas de bactérias (PFL, MBHA e BOA) e cianobactérias (OAA). Vale ressaltar que uma das características que estes grupos compartilham é a presença de pigmentos característicos. Ficobiliproteínas são pigmentos acessórios presentes principalmente em cianobactérias e rodófitas, mas também em bactérias (*Pseudomonas* sp.). Elas incluem a ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (Fernandes; Ramos; Nascimento, 2022; Ferreira; Gouveia, 2020). Acredita-se que as ficobiliproteínas foram adquiridas durante a evolução endossimbiótica e são parte dos ficobilissomos, que são complexos proteicos associados a superfície da membrana dos tilacóides (Montoya *et al.*, 2021).

*A. multifida* é uma alga vermelha da ordem Ceramiales, família Rhodomelaceae, assim como macroalgas do gênero Bryothamnion (Família Rhodomelaceae) e *Griffithsia* sp. (família Wrangeliaceae). A ordem Ceramiales, compreende cerca de 2.652 espécies atualmente aceitas e representa mais de 1/3 da diversidade de algas vermelhas. As algas dessa ordem são definidas morfológicamente por uma estrutura de talo uniaxial, a presença de células periaxiais e formação de células auxiliares pós-fertilização (Algaebase, 2023c; Díaz-Tapia *et al.*, 2019). Entretanto, apesar das semelhanças morfológicas entre as espécies, AML não compartilha similaridades estruturais com BSL, BTL ou GRFT.

A variação de características entre lectinas não é isolada de uma família para outra. Lectinas oriundas de uma mesma espécie podem apresentar características diferentes. Um exemplo disso são as lectinas CiL-1 e CiL-2 isoladas de *C. ishtmo cladum*, onde CiL-1 reconhece galactosídeos e fetuína, enquanto CiL-2 reconhece *N*-acetil-galactosamina e mucina submaxilar de porco; além disso, pelas sequências parciais de aminoácidos, verificou-se que CiL-2 não exibe semelhanças com CiL-1, mas com lectinas do Tipo-H, derivadas do molusco *Helix pomatia* (Carneiro *et al.*, 2020; Costa Filho, 2024).

Outro exemplo muito característico envolvem as BPLs, isoladas de *B. plumosa*. BPL2 reconhece carboidratos simples, como manose, fucose e glicose; por outro lado Bryohealina, BPL3 e BPL4 têm uma maior preferência por *N*-acetil-galactosamina e *N*-acetil-glicosamina, além de grandes variações em seus pesos moleculares, o que indica sequências de aminoácidos diferentes (Han *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012c; Kim; Klochkova, 2005; Yoon *et al.*, 2008).

Vários estudos comprovam o potencial biomédico e antiviral de lectinas que possuem especificidade de ligação a *N*-glicanos do tipo HM ou manosídeos contra agentes virais, como por exemplo o HIV, SARS-CoV e Influenza (Mitchell; Ramessar; O'Keefe, 2017;

Singh; Walia, 2018). Alguns trabalhos também destacam o potencial antibacteriano de outras lectinas de algas vermelhas, como GMA (extraída de *Galaxaura marginata*), ESA, GPE (extraída de *Gracilaria fisheri*) e SfL (Boonsri *et al.*, 2017; Holanda *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2003).

Visando uma nova alternativa no combate a cepas bacterianas patogênicas, o presente trabalho teve como objetivo verificar se o uso de dois antibióticos de diferentes classes em associação com lectinas de algas vermelhas resultaria em uma maior eficácia dos fármacos. Por meio da combinação das moléculas, é possível obter informações sobre o potencial dessa combinação para o tratamento de infecções (Medeiros, 2012; Oliveira *et al.*, 2021).

Pôde-se observar um efeito sinérgico contra *S. aureus* ATCC 25923 quando as lectinas (AML, MEL e SfL) foram incubadas com tetraciclina e um efeito aditivo contra *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303, utilizando o mesmo antibiótico.

AML foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *S. aureus* e *E. coli*, além de apresentar atividade contra HIV-1 e HIV-2 (Silva, 2016). MEL foi capaz de reconhecer e aglutinar cepas bacterianas patogênicas de *Vibrio alginolyticus* e multirresistentes de *Salmonella* (Chaves *et al.*, 2018a). Holanda *et al.* (2005) destacam que SfL foi capaz de inibir o crescimento de cepas Gram-negativas de *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* sp, e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não teve efeito sobre *E. coli* nem sobre as cepas Gram-positivas de *S. aureus* e *Bacillus subtilis*.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular espessa e formada por peptidoglicanos, que são macromoléculas formadas por repetições de dissacarídeos (*N*-acetilglicosamina-[ $\beta$ 1-4]-*N*-acetilmurâmico)<sub>n</sub> ligado a um tetrapeptídeo formando pequenas ramificações. Já as Gram-negativas possuem uma camada mais fina de peptidoglicano, envolta por uma camada complexa de lipopolissacarídeos (Cortelazzo, 2013).

Como algumas lectinas de algas vermelhas (AML, MEL e SfL), bactérias (MBHA e BOA) e cianobactérias (OAA) possuem uma maior especificidade para reconhecer carboidratos e oligossacarídeos complexos, pode-se sugerir que essas proteínas tenham melhor capacidade para reconhecer a parede celular de bactérias Gram-negativas. Reconhecendo essa estrutura, as proteínas poderiam aglutinar esses micro-organismos e facilitar a ação antibacteriana dos antibióticos, aumentando a permeabilidade da membrana e facilitando a entrada da molécula.

A conjugação com AML e MEL aumentou a eficácia da ação da tetraciclina sobre *E. coli*. Além disso, pode-se destacar o efeito sobre a cepa resistente *S. aureus* ATCC 700698 quando o fármaco foi utilizado em conjunto com as três lectinas.

As tetraciclinas são os antibióticos mais comuns utilizados mundialmente. O composto ativo é caracterizado como sendo de amplo-espectro, inibindo a síntese proteica de diversas cepas sendo eficaz contra infecções bacterianas. As tetraciclinas são derivadas de *Streptomyces* spp., compostas de um anel tetracíclico, com agrupamentos funcionais de hidroxila, metil e dimetilamino (Ahmad; Zhu; Sun, 2021).

As tetraciclinas têm sido amplamente utilizadas em tratamento de doenças humanas, na aquicultura e em animais domésticos, por conta de seu baixo preço de produção, alta qualidade e pureza (Hou *et al.*, 2016). Contudo, devido seu uso indiscriminado no tratamento de doenças, o fármaco pode acabar se tornando um grave problema ambiental e de saúde pública, em especial por conta do surgimento de cepas resistentes (Ahmad; Zhu; Sun, 2021).

De acordo com Gomes *et al.* (2013) e Coelho (2017) as lectinas estão envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas e animais, que podem envolver sua capacidade de aglutinar e imobilizar células como também oferecer toxicidade aos micro-organismos.

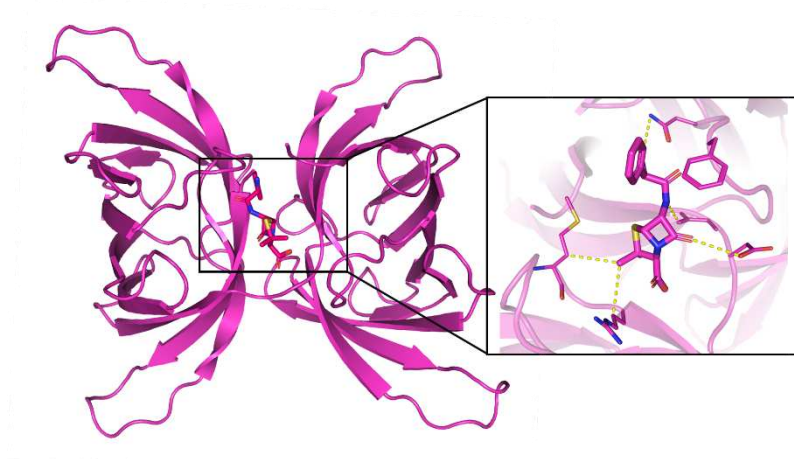
Autores também propõem que o aumento da ação do antibiótico contra cepas resistentes está relacionado: às interações entre as lectinas com os componentes da membrana celular bacteriana (ácidos teicóicos, peptidoglicano e lipopolissacarídeos), às alterações na permeabilidade celular e às interações com receptores de membrana que desencadeiam respostas intracelulares (Santos *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

Algumas lectinas podem estar correlacionadas com a formação de poros na membrana bacteriana, como a RegIII $\alpha$  (Coelho *et al.*, 2018), causando uma maior permeabilização e facilidade de acesso do medicamento ao interior da célula.

Silva (2023) realizou estudos sobre *docking* molecular empregando as lectinas AML e MEL, e quatro diferentes fármacos, incluindo oxacilina e tetraciclina, objetivando identificar os potenciais sítios de ligação para os fármacos e selecionar quais seriam os sítios mais promissores. Os resultados revelaram que todos os fármacos avaliados foram inicialmente capazes de se ligar aos quatro sítios de ligação à carboidratos presentes nas lectinas. No entanto, um quinto sítio de ligação, denominado sítio 5, localizado entre os domínios  $\beta$ -barril das lectinas, foi identificado como alvo adicional dos fármacos, conforme ilustrado na Figura 5.

Notavelmente, os resultados mais promissores e conformações mais favoráveis para os fármacos continuaram sendo observados no sítio 5, o que foi a base da escolha deste sítio para análises posteriores envolvendo os fármacos em questão.

Figura 16 – Sítio 5 de ligação entre AML e ampicilina.



Fonte: Silva (2023).

Trabalhos recentes destacam o potencial antibacteriano de lectinas de invertebrados marinhos em combinação com antibióticos. Duarte *et al.* (2023) observaram que ALL, lectina da esponja *Aplysina lactuca*, exibiu atividade sinérgica com ampicilina contra *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303, além de efeito aditivo contra as mesmas cepas quando combinada com tetraciclina.

Oliveira Neto (2023) destaca que AFL, lectina de *Aplysina fulva*, potencializou o efeito dos antibióticos ampicilina e tetraciclina frente a *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* ATCC 11303. Oton (2023) também aponta que ACL, lectina de *Aplysina cauliformis*, em combinação com ampicilina e tetraciclina, exibiu resultados positivos contra as cepas bacterianas mencionadas anteriormente.

## 6 CONCLUSÃO

AML, MEL e Sfl foram purificadas com sucesso através de cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, apresentando uma única banda em SDS-PAGE 15%. De acordo com a modelagem da estrutura tridimensional realizada *in silico*, as conformações de AML e MEL se assemelham a um  $\beta$ -barril, característico de lectinas da família OAAH. Pela predição do domínio de reconhecimento a carboidrato, quatro aminoácidos de AML e MEL estariam envolvidos na ligação ( $W^{145/144}$ ,  $R^{230/229}$ ,  $E^{258/257}$  e  $I^{261/260}$ , respectivamente). De acordo com a árvore filogenética construída, MEL e Sfl estariam agrupadas no mesmo clado de outras lectinas de algas que fazem parte da família OAAH, porém AML estaria mais próxima, evolutivamente, das lectinas de bactérias e cianobactérias (MBHA, BOA, PFL e OAA). Verificou-se também que a ação combinada das lectinas com tetraciclina melhorou o potencial do efeito do antibiótico contra cepas patogênicas de *S. aureus* e *E. coli*, além de uma cepa MRSA (ATCC 700698). Estudos mais aprofundados são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nessa interação, para que se possa otimizar o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias, utilizando compostos bioativos de fontes alternativas. Este é o primeiro trabalho que destaca o potencial antibacteriano de lectinas de algas vermelhas em associação com antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, T. C. **Efeitos da lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson na nocicepção e inflamação em animais**. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ABREU, T. C. **Lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson: caracterização parcial e efeito antidepressivo em modelos experimentais de depressão**. 2016. 134f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ABREU, T. C. *et al.* Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 534-541, 2018.
- AHMAD, F.; ZHU, D.; SUN, J. Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives. **Environmental Sciences Europe**, v. 33, 2021.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Agglutination of Enzyme Treated Erythrocytes by Brazilian Marine Algal Extracts. **Botanica Marina**, v. 35, n. 6, p. 475-480, 1992.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, n. 3, p. 211-214, 1991.
- ALGAEBASE. **AlgaeBase: Listing the World's Algae**. 2023a. Disponível em: <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- ALGAEBASE. **Taxonomy Browser: Order Gigartinales**, 2023b. Disponível em: <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#4622>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- ALGAEBASE. **Taxonomy Browser: Order Ceramiales**, 2023c. Disponível em: <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#4617>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- ALTHAGBI, H. I. *et al.* Marine-derived macrocyclic alkaloids (MDMAs): chemical and biological diversity. **Marine Drugs**, v. 18, 2020.
- ALVES, A. W. *et al.* *Codium isthmocladum* lectin 1 (CiL-1): Interaction with *N*-glycans explains antinociceptive and anti-inflammatory activities in adult zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 1082-1089, 2022.
- ALVES, M. F. *et al.* Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 773-780, 2020.
- BĂLAȘA, A. F.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Marine Biocompounds for Neuroprotection — A Review. **Marine Drugs**, v. 18, 2020.



BALL, P. R.; SHALES, S. W.; CHOPRA, I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 93, n. 1, p. 74–81, 1980.

BALSALOBRE, L. C. **Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.:** identificação e mapeamento do ambiente genético de genes *tet*. 2014. 158 p. Tese (Doutorado em Serviços de Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BENEVIDES, N. M.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 117-122, 1996.

BENEVIDES N. M. *et al.* Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten Brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 31-36, 1998.

BEWLEY C. A. *et al.* New carbohydrate specificity and HIV-fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 339, p. 901–914, 2004.

BEWLEY, C. A.; OTERO-QUINTERO, S. The potent anti-HIV protein cyanovirin-N contains two novel carbohydrate binding sites that selectively bind to Man<sub>8</sub> D1D3 and Man<sub>9</sub> with nanomolar affinity: implications for binding to the HIV envelope protein gp120. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 17, p. 3892–3902, 2001.

BIRIS-DORHOI, E. S. *et al.* Macroalgae — A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. **Nutrients**, v. 12, 2020.

BOKESCH, H. R. *et al.* A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 2578–2584, 2003.

BOLMSTEDT, A. J. *et al.* Cyanovirin-N defines a new class of antiviral agent targeting N-linked, high-mannose glycans in an oligosaccharide-specific manner. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 949–954, 2001.

BONTEN, M. *et al.* Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1211–1219, 2021.

BOONSRI, N. *et al.* Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1597–1608, 2017.

BOYD, M. R. *et al.* Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1521–1530, 1997.

BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 6, p. 82-83, 1966.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens suggested by tests with lectins. **Plant Physiology**, v.36, p. 209-234, 1954.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, 2020.

BRINGEL, P.H. S. F. *et al.* The Lectin Isolated from the Alga *Hypnea cervicornis* Promotes Antinociception in Rats Subjected to Zymosan-Induced Arthritis: Involvement of cGMP Signalization and Cytokine Expression. **Inflammation**, v. 43, p. 1446–1454, 2020.

BRUCH, R.; WHITE, H. Compositional and structural heterogeneity of Avidin glycopeptides. **Biochemistry**, v. 21, p. 5334-5341, 1982.

CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 343–350, 2000.

CARNEIRO, R. F. *et al.* New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 4263–4276, 2020.

CHAVES, R. P. *et al.* *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family. **Journal of Applied Phycology**, v.30, p. 1-10, 2018a.

CHAVES, R. P. *et al.* Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1320–1329, 2018b.

CHAVES, R. P. *et al.* Structural study and antimicrobial and wound healing effects of lectin from *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson. **Biochimie**, v. 214, p. 61-76, 2023.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, n. 88, p. 26–40, 2020.

COELHO, L. C. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. *In*: COLLINS, E. **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc, 2017, p. 69–89.

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

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169-176, 2020.

CONTE, M. *et al.* Marine-Derived Secondary Metabolites as Promising Epigenetic Bio-Compounds for Anticancer Therapy. **Marine Drugs**, v. 19, 2021.

- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- CORTELAZZO, A. L. Paredes celulares. *In*: CARVALHO H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. Barueri: Manole, 2013, p. 467-76.
- COSTA, F. H. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina mitogênica presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida* Lamouroux**. 1995. 125 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- COSTA, F. H. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999.
- COSTA FILHO, M. F. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antimicrobiano em associação com antibióticos da lectina CiL-2 de *Codium isthmocladum*, novo membro das lectinas do Tipo-H**. 2024. 174 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2010.
- DÍAZ-TAPIA, P. *et al.* Morphological evolution and classification of the red algal order Ceramiales inferred using plastid phylogenomics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 137, p. 76-85, 2019.
- DUARTE, J. A. *et al.* Structural characterization of a galectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL) with synergistic effects when associated with antibiotics against bacteria. **Biochimie**, v. 214, p. 165-175, 2023.
- FAJARNINGSIH, N. D. *et al.* Extraction and Partial Characterization of Lectin from Indonesian Brown Algae *Padina australis* and *Padina minor*. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 14, p. 103-111, 2019.
- FARIAS, W. R. L. **Purificação, caracterização parcial e atividade biológica da lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson**. 1995. 104 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- FERNANDES, L. M.; RAMOS, G. L.; NASCIMENTO, J. S. Pigmentos bacterianos e seu potencial de aplicação na indústria de alimentos e em outras áreas. **Scientia Vitae**, v. 13, n. 37, 2022.
- FERREIRA, A.; GOUVEIA, L. Microalgal biorefineries. *In*: JACOB-LOPES, E. *et al.* **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products**. Cambridge: Academic Press, 2020, p. 771-798.
- FLOYD, J. L. *et al.* LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5406–5412, 2010.

FONTENELLE, T. P. *et al.* Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1122-1130, 2018.

GARRISON, A. R. *et al.* The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent *in vitro* and *in vivo* activity against Zaire Ebola virus. **Antiviral Research**, v. 112, p. 1–7, 2014.

GASPARRINI, A. J. *et al.* Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance. **Communications Biology**, v. 3, p. 241, 2020.

GOMES, F. S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672–679, 2013.

HAMED, I. *et al.* Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 446-465, 2015.

HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, p. 143–150, 2010.

HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 745–753, 2011.

HAN, J. W. *et al.* Purification of a sex-specific lectin involved in gamete binding of *Aglaothamnion callophyllidicola* (RHODOPHYTA). **Phycological Society of America**, v. 48, p. 916-924, 2012a.

HAN, J. W. *et al.* Isolation and Characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumienses* Itono. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012b.

HAN, J. W. *et al.* Molecular characterization of a lectin, BPL-4, from the marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Algae**, v. 27, n. 1, p. 55-62, 2012c.

HARRYSSON, H. *et al.* Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 3565–3580, 2018.

HIGEL, F. *et al.* N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2016.

HIRAYAMA, M. *et al.* High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 144-160, 2016.

HIRAYAMA, M.; TERAMOTO, C.; HORI, K. **High mannose type N-glycan specific lectins isolated from edible red alga *Meristotheca papulosa***, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAX08601.1>. Acesso em: 21 dez. 2023.

HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1769-1773, 2005.

HORI, K.; HIRAYAMA, M.; SHIBATA, H. **Purification, cDNA cloning, and characterization of high mannose N-glycan specific lectin from the edible red alga *Agardhiella subulata***, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAX08598.1>. Acesso em: 21 dez. 2023.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 561-566, 1990.

HOU, G. *et al.* Tetracycline removal and effect on the formation and degradation of extracellular polymeric substances and volatile fatty acids in the process of hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 20–25, 2016.

HUNG, L. D. *et al.* Purification, primary structure, and biological activity of the high mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1657-1669, 2015a.

HUNG, L. D. *et al.* Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Phytochemistry Letters**, v.14, p. 99–105, 2015b.

HUNG, L. D.; TRINH, P. T. Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. **Journal of Natural Medicines**, v. 75, p. 223–231, 2021.

HUSKENS, D.; SCHOLS, D. Algal Lectins as Potential HIV Microbicide Candidates. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1476-1497, 2012.

HUSKENS, D. *et al.* Microvirin, a novel alpha(1,2)-mannose specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 24845-24854, 2010.

KEHR, J. C. *et al.* A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 893–906, 2006.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 49, p. 115–138, 2018.

KHANNA, N. R.; GERRIETS, V. Beta-Lactamase Inhibitors. *In*: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island, Florida: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>. Acesso em: 23 nov. 2023.

- KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; WEST, J. A. From protoplasm to swarmer: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the multicellular marine green alga *Microdictyon umbilicatum* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 38, p. 174–184, 2002.
- KIM G. H.; KLOCHKOVA T. A. Purification and Characterization of a Lectin, Bryohealin, Involved in the Protoplast Formation of a Marine Green Alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 42, p. 86–95, 2005.
- KIM, T. *et al.* Clinical and microbiological factors associated with early patient mortality from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 34, n.1, p. 184, 2019.
- KLOCHKOVA, T. A. *et al.* Cytochemical and ultrastructural studies on protoplast formation from disintegrated cells of a marine green alga *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 38, p. 205–216, 2003.
- KLOCHKOVA, T. A. *et al.* Experimental hybridization between some marine coenocytic green algae using protoplasts extruded in vitro. **Algae**, v. 20, p. 239–249, 2005.
- KOHARUDIN, L. M. *et al.* Structural insights into the anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homolog lectin family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33796–33811, 2012.
- KOHARUDIN, L. M.; FUREY, W.; GRONENBORN, A. M. Novel fold and carbohydrate specificity of the potent anti-HIV cyanobacterial lectin from *Oscillatoria agardhii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1588–1597, 2011.
- KUMAR, S.; BARROS, U. Purification and partial characterization of a haemagglutinin from *Ulva fasciata*. **Current Science**, v. 118, n. 4, p. 621, 2020.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.
- LEANDRO, A.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, A. Diverse Applications of Marine Macroalgae. **Marine Drugs**, v. 18, 2020.
- LEE, C. Griffithsin, a Highly Potent Broad-Spectrum Antiviral Lectin from Red Algae: From Discovery to Clinical Application. **Marine Drugs**, v. 17, 2019.
- LEE, J. H. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 181–184, 2019.
- LEE, J. H. *et al.* Anticancer Activity of Mannose-Specific Lectin, BPL2, from Marine Green Alga *Bryopsis plumosa*. **Marine Drugs**, v. 20, n. 12, p. 776, 2022.

- LEITE, Y. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p.137–145, 2005.
- LIAO, W. R. *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine Vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433–439, 2003.
- LIMA, H. C. *et al.* Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 153–162, 1998.
- LIMA, M. E. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6414–6419, 2005.
- LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. New York: Williams & Willkins. 851 p., 2005.
- MACHADO, D. *et al.* Insights on *Mycobacterium leprae* efflux pumps and their implications in drug resistance and virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- MALIKI, I. M. *et al.* Production of Lectins from Marine Algae: Current Status, Challenges, and Opportunities for Non-Destructive Extraction. **Marine Drugs**, v. 20, n. 2, 2022.
- MEDEIROS, M. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- MELO, V. M. *et al.* Antifungal Properties of Proteins (Agglutinins) from the Red Alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, v. 40, p. 281-284, 1997.
- MESQUITA, J. X. *et al.* Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 532-539, 2021.
- MESTROVIC, T. *et al.* The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. **Lancet Public Health**, v. 7, p. 897–913, 2022.
- MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral Research**, v. 142, p. 37–54, 2017.
- MONTOYA, E. J. *et al.* Phycobilin heterologous production from the Rhodophyta *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 341, p. 30-42, 2021.

MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 9345-9353, 2005.

MOTTA, S.; CLUZEL, P.; ALDANA, M. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–18, 2015.

NAGANO, C. S. *et al.* HCA and HML isolated from *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, v. 14, p. 2167-2176, 2005.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, p. 49–54, 2006.

NEVES, S. A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127–134, 2007.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.

OLIVEIRA NETO, J. E. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva***. 2023. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

OLIVEIRA, V. *et al.* Aplicação do método *checkerboard* para avaliação de sinergismo antibacteriano em óleos essenciais: uma revisão. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 4, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance**, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 11 dez. 2023.

OTON, L. F. **Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos**. 2023. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

PIDWILL, G. R. *et al.* The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 3506, 2021.

PINTO, V. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma. **Cells Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2009, p.1-6, 2009.

PRASEPTIANGGA, D. Development of Seaweed-based Biopolymers for Edible Films and Lectins. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 193, 2017.



PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

RIVANOR, R. *et al.* A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 331-340, 2018.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 320-324, 2014.

ROGERS D. J., HORI K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260-261, p. 589-593. 1993.

RUBINSTEIN, E.; KEYNAN, Y. Vancomycin revisited—60 years later. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 217, 2014.

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

SANTOS, A. F. S. *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide and Protein Research**, v. 15, 2014.

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

SATO, T.; HORI, K. Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fish Science**, v. 75, p. 743–753, 2009.

SATO, Y.; HORI, K. High-mannose *N*-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 855-861, 2011.

SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, p. 291–296, 2011.

SATO, Y. *et al.* Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3454-3465, 2015.

SATO, Y.; OKUYAMA, S.; HORI, K. Primary structure and carbohydrate-binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 11021–11029, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003.

SILVA, A. *et al.* Identificação dos metabólitos da espécie *Bauhinia acreana* (Fabaceae). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 5, p. 83-91, 2019.

SILVA, G. S. **Caracterização estrutural *in silico* e análise das bases moleculares de interação das lectinas das algas vermelhas *Amansia multifida* e *Meristiella echinocarpa***. 2023. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Limoeiro do Norte, 2023.

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

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

SILVA, S. R. **Determinação da estrutura primária e análise do potencial biotecnológico de uma lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux**. 2016. 91 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-26, 2018.

SINGH, R. S.; THAKUR, S. R.; BANSAL, P. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Critical Reviews in Microbiology**, 2015.

SKRIPTSOVA, A. V. The Systematics and Current Problems in the Taxonomy of Algae of the Order Gigartinales (Rhodophyta) from the Far Eastern Seas of Russia. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 47, p. 73–83, 2021.

SRINIVASAN, R. *et al.* Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds. **Marine Drugs**, v. 19, p. 530, 2021.

STILLMARK, P. H. **Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen**. 1888. 125f. Thesis (Doctos der Medicin) – University of Dorpat, Dorpat (Estonian), 1888.

STOGIOS, P. J.; SAVCHENKO, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein Science**, v. 29, p. 654–669, 2020.

SUDHAKAR, K. *et al.* An overview of marine macroalgae as bioresource. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 165-179, 2018.

TZIVELEKA, L.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 1512–1535, 2003.

UNIPROT. **Align results: Percent Identity Matrix**, 2023. Disponível em: <https://www.uniprot.org/align/clustalo-R20231227-131626-0815-79216036-p1m/percent-identity-matrix>. Acesso em: 27 dez. 2023.

VIANCELLI, A. *et al.* Contamination by pathogenic multidrug resistant bacteria on interior surfaces of ambulances. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25925>. Acesso em: 30 jan. 2024.

WHITLEY, M. J. *et al.* *Burkholderia oklahomensis* agglutinin is a canonical two-domain OAA-family lectin: structures, carbohydrate binding and anti-HIV activity. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 9, p. 2056-2067, 2013.

WU, M. *et al.* A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 201, p. 7-13, 2016.

YANG, L. *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, p. 762, 2018.

YANG, Y. *et al.* Identification and characterization of marine seaweeds for biocompounds production, **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, 2021.

YOON, K. S. *et al.* Molecular characterization of the lectin, Bryohealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 44, p. 103–112, 2008.

ZAHRA, Z. *et al.* Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. **Environments**, v. 7, n. 2, 13, 2020.

ZGURSKAYA, H. I. Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly. **Future Microbiology**, v. 4, p. 919–932, 2009.

ZHENG, W. *et al.* I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. **Future Generation Computer Systems**, v. 99, p. 73-85, 2019.

ZIÓŁKOWSKA, N. E. *et al.* Domain-swapped structure of the potent antiviral protein Griffithsin and its mode of carbohydrate binding. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1127-1135, 2006.