



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA LECTINA DA ESPONJA
MARINHA *Haliclona caerulea* (Halilectina – 2)

FORTALEZA

2024

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA LECTINA DA ESPONJA
MARINHA *Haliclona caerulea* (Halilectina – 2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

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)

- C223a Cândia, José Gabriel de Sousa.
Avaliação do potencial antibacteriano da lectina da esponja marinha *Haliclona caerulea* (Halilectina-2) /
José Gabriel de Sousa Cândia. – 2024.
56 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.
1. Esponjas marinhas. 2. Lectinas. 3. Sinergismo. 4. Atividade antibacteriana. I. Título.
CDD 660.6
-

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA LECTINA DA ESPONJA
MARINHA *Haliclona caerulea* (Halilectina – 2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: xx/xx/xxxx.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dr. Francisco Regivânio N. Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe, aos meus irmãos e a minha
vozinha e ao meu irmão Ronielle (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois sem Ele essa etapa não seria possível.

A minha mãe Salete, por ter sido a minha base, minha inspiração e por me aconselhar durante toda essa trajetória. Agradeço a ela também por todo o incentivo para seguir em frente, por segurar as “pontas” quando as coisas não estavam fáceis e por toda oração que ela pedia a Deus para me guiar os meus passos nesta jornada. Obrigado por tudo, eu amo a senhora.

Aos meus irmãos Samuel e Danielle, visto que só nós sabemos quão foi difícil esses dois para a nossa família. Ao meu irmão Ronielle (*in memoriam*), por sempre ter reafirmado que eu iria longe. Queria muito que você estivesse aqui para contemplar mais essa vitória, esse título é pra VOCÊ.

Ao meu orientador, Professor Alexandre Holanda Sampaio, pela oportunidade de ser seu orientando e por toda ajuda no decorrer dessa trajetória.

Ao meu coorientador, Professor Rômulo Farias, pelo convite para participar do grupo, pelos ensinamentos, pelos chamados de atenção e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Celso Nagano, pelos ensinamentos e por toda ajuda para a construção deste trabalho. À Renata Pinheiro Chaves, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros de bancada, Vinícius, Juliana, Bianca e Ellen, obrigado por dividir todos esses momentos em bancada e pelos momentos compartilhados fora do laboratório. Ao meu companheiro de graduação e mestrado, Pedro Arthur. Amigo, obrigado por todo apoio, ajuda e toda paciência no decorrer desses dois anos.

As minhas amigas Gisele e Thifany, por todo apoio e companheirismo no decorrer dessa trajetória. Vocês foram peça chave na obtenção deste título.

Ao Pedro Bezerra, que já chegou ali no finalzinho do segundo tempo, mas já chegou agregando em todas as instâncias da minha vida. Obrigado pela paciência, pelos dias e noites ouvindo os meus anseios, pelos cafés nos dias de escrita e por ficar acordado comigo nas noites de escritas e nos dias que a ansiedade vinha a todo vapor. Que Deus te

abençoe mais e mais. Espero um dia por te retribuir pelo menos metade disso tudo. Conte comigo sempre!

Aos Professores Mayron Vasconcelos e Alexandre Andrade, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização do Mestrado.

E a todos que contribuíram indiretamente e diretamente para a realização deste trabalho e na minha formação acadêmica.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento deste trabalho.

Isaías 60:22

RESUMO

As esponjas, filo Porífera (do latim *porus*, poro + *fera*, portador de), são seres multicelulares, cujo corpo consiste em uma massa de células imersa em uma matriz gelatinosa, e perfurada por um complexo sistema de canais. O gênero *Haliclona*, inclui espécies amplamente distribuídas por todos os oceanos, ocorrendo em diferentes profundidades e apresentando uma variedade de cores. Ao longo da evolução, as esponjas desenvolveram diversas adaptações fisiológicas e fenotípicas para se manterem no ambiente marinho. Uma dessas adaptações foi a produção de metabolitos, entre os quais se destacam as lectinas. Essas proteínas de origem não imune, possuem a capacidade de se ligar de forma específica e reversível a carboidratos. Já foram descritas diversas atividades biológicas associada à essas moléculas, incluindo propriedades anticancerígenas, antivirais, antifúngicas e antibacterianas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme da Halilectina (H-2), presente na esponja *Haliclona caerulea*. H-2 é uma proteína homodimérica com monômeros de 15 kDa interligados por ligações de interações fracas que se oligomeriza formando um dímero de 29 kDa. A lectina apresentou afinidade pelas glicoproteínas asialofetuína, fetuína, mucina estômago de porco tipo II e tipo III (PSM - *porcine stomach mucin*). A análise de dicroísmo circular demonstrou a presença predominante de estruturas β -folhas com espectros de proteínas- β_1 . A H-2 foi capaz de aglutinar células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303. A lectina apresentou potencial antibacteriano, visto que quando associada com tetraciclina a proteína potencializou o efeito do antibiótico, além de inibir a formação de biofilme. Assim, H-2 demonstrou ser uma lectina com elevado potencial biotecnológico com ação antibacteriana em associação ao antibiótico tetraciclina.

Palavras-chave: esponjas marinhas; lectinas; sinergismo; atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Sponges, phylum Porifera (from the Latin porus, pore + beast, bearer), are multicellular beings whose body consists of a mass of cells immersed in a gelatinous matrix and perforated by a complex system of canals. The genus *Haliclona* includes species widely distributed throughout the oceans, occurring at different depths and presenting a variety of colors. Throughout evolution, sponges have developed several physiological and phenotypic adaptations to maintain themselves in the marine environment. One of these adaptations was the production of metabolites, among which lectins stand out. These proteins of non-immune origin have the ability to bind specifically and reversibly to carbohydrates. Several biological activities associated with these molecules have been described, including anticancer, antiviral, antifungal and antibacterial properties. The present study aims to evaluate the antibacterial and antibiofilm potential of Halilectin (H-2), present in the sponge *Haliclona caerulea*. H-2 is a homodimeric protein with 15 kDa monomers interconnected by weakly interacting bonds that oligomerize to form a 29 kDa dimer. The lectin showed affinity for the glycoproteins asialofetuin, fetuin, and porcine stomach mucin type II and type III (PSM). Circular dichroism analysis demonstrated the predominant presence of β -sheet structures with spectra of β 1 proteins. H-2 was able to agglutinate *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, and *Escherichia coli* ATCC 11303 cells. The lectin showed antibacterial potential, since when associated with tetracycline, the protein potentiated the effect of the antibiotic, in addition to inhibiting biofilm formation. Thus, H-2 was shown to be a lectin with high biotechnological potential with antibacterial action in association with the antibiotic tetracycline.

Keywords: marine sponges; lectins; synergism; antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação da esponja marinha <i>Haliclona caerulea</i>	14
Figura 2	– Organização do DRC dos tipos de galectinas.....	18
Figura 3	– Etapa de preparação do extrato proteico.....	25
Figura 4	– Fracionamento do extrato proteico com acetona.....	26
Figura 5	– Representação das etapas cromatográficas.....	27
Figura 6	– Representação do método quantificação de células viáveis nos biofilmes.....	31
Figura 7	– Representação esquemática do teste de antibacteriano combinado a diferentes concentrações de antibiótico e lectina.....	32
Figura 8	– Cromatografia de troca iônica em matriz Hitrap TM Q-Sepharose.....	33
Figura 9	– Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S200.....	34
Figura 10	– Eletroforese da H-2 em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE).....	38
Figura 11	- Estimativa da massa molecular nativa de H-2 por cromatografia de exclusão molecular.....	39
Figura 12	– Espectro de Dicroísmo Circular de H-2.....	40
Figura 13	– Teste de aglutinação da H-2 contra diferentes cepas bacterianas.....	41
Figura 14	– Efeito da H-2 sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	43
Figura 15	– Número de células viáveis de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> com H-2.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Representantes de lectinas do Tipo C, Tipo S (Galectinas) e Tachylectinas isoladas de esponjas marinhas.....	16
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante	35
Tabela 2 – Tabela de purificação da H-2	36
Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante da H-2 por glicoproteínas.....	36
Tabela 4 – Efeito da lectina H-2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tretaciclina sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. coli</i>	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Esponjas	15
1.1.1	<i>Haliclona caerulea</i>.....	15
1.2	Lectinas.....	16
1.3	Lectinas de esponjas.....	16
1.4	Lectinas de <i>Haliclona</i>	
1.5	Propriedades biotecnológicas de lectinas de esponjas	
1.6	Resistência bacteriana e biofilmes bacterianos	
1.6.1	<i>Resistência bacteriana</i>	
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivo específicos.....	22
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	Coleta do material.....	24
3.2	. Purificação da lectina....	25
3.3	Atividade hemaglutinante.....	26
3.4	Ensaio de inibição de carboidratos	
3.5	Estimativa da massa molecular	
3.6	Dicroísmo circular	
3.7	Atividade antibacteriana	
3.7.1	<i>Ensaio de aglutinação bacteriana</i>	
3.8	Microrganismos e condições de cultura	
3.8.1	<i>Ensaio de formação de biofilme</i>	
3.8.2	<i>Quantificação da massa de biofilme</i>	
3.8.3	<i>Quantificação de células viáveis nos biofilmes</i>	
3.9	Atividade antibacteriana da lectina em associação a antibióticos	
3.10	Análise estatística	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Purificação da lectina	
4.2	Atividade hemaglutinante do extrato e das frações contra eritrócitos de coelho	
4.3	Ensaio de inibição de carboidratos	

- 4.4 Eletroforese e estimativa da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular**
- 4.5 Dicroísmo circular**
- 4.6 Ensaio de aglutinação bacteriana**
- 4.7 Atividade antibacteriana**
- 4.8 Atividade antibacteriana da H-2 em associação a antibióticos**
- 5 CONCLUSÃO**
- REFERÊNCIAS**

1 INTRODUÇÃO

1.1 esponjas

As esponjas são organismos bentônicos e sésseis, que fazem parte do filo Porífera (do latim *porus*, poro + *fera*, portador de). Esses organismos são definidos como seres multicelulares, nos quais suas células estão embebidas em uma matriz de aspecto gelatinoso e enrijecidas por um esqueleto de espículas constituídas de carbonato de cálcio (CaCO_3) ou sílica e colágeno. A morfologia das espículas é fundamental na identificação e classificação das espécies (Hickman; Roberts; Larson, 2016).

São seres filtradores, que tem seu corpo constituído por um sistema de canais, composto por células flageladas, denominadas de coanócitos, cuja função é fazer a circulação da água no interior desse sistema (Brusca: Brusca, 2019; Pechenik, 2016). As mesmas dependem inteiramente do fluxo de água que passa através dos seus poros e é a partir desse fluxo que ocorre a obtenção do oxigênio, alimento e a eliminação de compostos tóxicos (Pechenik, 2016).

Atualmente, existem cerca de 10 mil espécies válidas de esponjas, distribuídas no ambiente aquático, onde a maioria é restrita ao ambiente marinho (De voogd *et al.*, 2023). Esses organismos possuem diferentes formas, tamanho e cores; e estão presentes em todas as profundidades oceânica e ocupando os mais variados *habitats*, desde águas tropicais a regiões polares (Hickman; Roberts; Larson, 2016).

O filo Porífera está dividido em quatro classes, fundamentadas de acordo com as suas características estruturais e de acordo com a morfologia de espículas, são classificadas em: Calcarea, tem como características espículas de carbonato de cálcio e são espécies marinhas; Hexactinellida, caracterizada por possuir espículas silicosas de seis raios, estrutura corpórea em forma de cilindro ou funil e habitando águas oceânicas profundas; Homoscleromorfa, essa classe tem como característica ausência de espículas e quando presentes são bem pequenas e de formato simples; E por último, a classe Demospongiae tem como característica espículas silicosas ou de espongina (Gazave *et al.*, 2012; Kohn *et al.*, 2020; McMurray; Blum; Pawlik, 2008). Além disso, essa classe abrange cerca de 90% das espécies de esponjas e é nesse grupo que as esponjas de habito alimentar carnívora são classificadas (Pechenik, 2016).

Os representantes dessa classe são diversos, visto que se distribuem desde águas rasas até grandes profundidades. Essas esponjas apresentam uma ampla variedade de tamanhos e formas de crescimento, variando desde exemplares incrustantes até espécies de morfologia ereta. Vale ressaltar que todas as espécies de água doce estão incluídas nessa classe, o que demonstra a sua notável variedade (Pechenik, 2016; Ruppert; Fox; Barnes, 2005).

1.1.1 *Haliclona caerulea*

Haliclona é um gênero da família Chalinidae, composto por exemplares que são distribuídos de forma heterogênea em todos os oceanos, sendo encontrados em diferentes profundidades. Essa família possui espécies de esponjas incrustantes ou de crescimento tubular com uma variedade de cores: azul ou verde, rosa, lilás e raramente branca. 27 gêneros já foram apresentados, entretanto, apenas quatro são válidos: *Calendula* Schmidt, 1868; *Cladocroce* Topsent, 1892; *Dendroxea* Cressinger, 1971 e *Haliclona* Grant, 1835 (De weerd, 2002).

A morfologia externa da esponja *Haliclona caerulea* (Figura 1) é de uma esponja maciça com ramificações lobulares ou com pequenas elevações vulcaniformes. Apresenta uma superfície macia de consistência frágil, se tornado facilmente quebrável e coloração azul turquesa *in vivo*. Além disso, a sua morfologia interna é caracterizada por óxeas retas ou levemente inclinada com arestas arredondadas ou sigmais. No Brasil, *H. caerulea* pode ser encontrada nos estados de Alagoas, Rio Grande do Norte, Bahia e Ceará (Silva, 2015).

Figura 1 - *Haliclona caerulea* em uma formação rochosa na zona entre marés da praia de Bitupitá, Barroquinha-CE.



Fonte: O autor (2024).

1.2 Lectinas

As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas que se ligam

reversivelmente a mono ou oligossacarídeos de tal forma que não modificam a estrutura de seus ligantes e não estão envolvidas obrigatoriamente no metabolismo, além de não pertencerem a quaisquer classes de imunoglobulinas (Kilpatrick, 2000; Lam; Ng, 2011).

Em animais, as lectinas apresentam uma ampla diversidade de funções fisiológicas, ficando evidente seu papel no sistema imunológico, onde elas atuam como moléculas de reconhecimento, regulando a imunidade, prevenindo autoimunidade e na defesa direta a patógenos (Vasta; Wang, 2020). A capacidade de diferenciar o próprio do não próprio é uma característica básica das lectinas animais e esta habilidade se deve a sua especificidade de ligação a carboidratos por meio dos seus Domínios de Reconhecimento a Carboidratos (DRC) (Ogawa *et al.*, 2011).

Essas proteínas estão presentes em diversos organismos, como vírus, bactérias, algas, plantas e animais (Elumalai *et al.*, 2019). As lectinas já foram encontradas e isoladas de alguns filos de animais: artrópodes (Li *et al.*, 2019), cordados (Yin, 2019), equinodermos (Duarte *et al.*, 2022), moluscos (Carneiro *et al.*, 2017a), nematelmintos (Midha *et al.*, 2018) e poríferos (Carneiro *et al.*, 2013a).

A crustina de *Litopenaeus vannamei*, por exemplo, parece estar associada a defesa contra bactérias Gram-negativas e vírus (Bi *et al.*, 2019). Diversas lectinas encontradas na hemolinfa de invertebrados podem agir na primeira linha de defesa desses animais, ligando e neutralizando patógenos e promovendo a fagocitose através dos monócitos. Essas lectinas que atuam no sistema imune inato dos animais são consideradas um dos principais grupos de reconhecimentos de padrões (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs), que têm como ação identificar padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated Molecular Patterns* – PAMPs), presentes na superfície desses patógenos, como o peptidoglicano (PGN), presente na parede celular bacteriana (Vasta; Wang, 2020).

Lino e colaboradores (2013) relataram que além da função contra patógenos, as lectinas também possuem papel importante na embriogênese e morfogênese, como foi evidenciado em *Fenneropenaeus merguensis*, onde lectinas estavam associadas na embriogênese, através do aumento da expressão dessas lectinas, de acordo com o avanço da maturação gonadal (Utarabhad *et al.*, 2017).

Motohashi *et al.*, (2017) relataram que a lectina presente nos ovos do molusco *Aplysia kurodai* estava associada no desenvolvimento das larvas.

Uma lectina do Tipo B, isolada da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, apresentou ação contra infecções causadas pelas bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* (Yin *et al.*, 2019).

1.3 Lectinas de esponjas

As lectinas em esponjas foram inicialmente estudadas por Dodd e colaboradores (1968), trabalhando com extratos aquosos das esponjas *Cliona celata* e *Axinella* sp., observaram a capacidade de aglutinação de ambos os extratos frente a eritrócitos humanos e de coelho.

Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos e demonstram amplos efeitos biológicos disparados por lectinas de esponjas, incluindo atividade antibacteriana e antibiofilme (Carneiro *et al.*, 2017b; Carneiro *et al.*, 2019), potencial leishmanicida (Sousa *et al.*, 2021), atividade anticâncer (Nascimento-neto *et al.*, 2018), dentre outros.

Estruturalmente, as lectinas podem ser divididas em famílias, sendo conhecidas pelo menos 19 famílias estruturais: Anexinas, Calnexina e Calreticulina, Ficolinas, Kaliklectinas, Lectinas do Tipo F, Lectinas do Tipo F-box, Lectinas do Tipo H, Lectinas do tipo I, Lectinas do tipo L, Lectinas do Tipo M, Lectinas do Tipo P, Lectinas do Tipo Quitinase, Lectinas do Tipo R, Lectinas do Tipo X, Lectinas ligantes a Raminose, Pentraxinas, Lectinas do Tipo C, Lectinas do Tipo S (Galectinas) e Tachylectinas (Carneiro, 2013a). Em esponjas, é possível destacar algumas lectinas que pertencem às famílias do Tipo C, Tipo S e Tachylectinas (Quadro 1).

Quadro 1: Representantes de lectinas do Tipo C, Tipo S (Galectinas) e Tachylectinas isoladas de esponjas marinhas.

Espécie	Lectina	Família	Ligantes	Atividade biológica
<i>Aphrocallistes vastus</i>	AphrLEC	Tipo C	Galactosídeos	Anticâncer
<i>Aplysina lactuca</i>	ALL	Galectinas	Galactosídeos	Antibacteriana
<i>Chondrilla caribensis</i>	CCL	Galectinas	Galactosídeos	Antileishmania
<i>Cinachyrella</i> sp.	CchG	Galectinas	Galactosídeos	Modulação do sistema nervoso
<i>Ephydatia fluviatis</i>	Ef lectin	Tachylectinas	Lipopossacarídeos	Antibacteriana
<i>Halichondria okadai</i>	HoL-30	Galectinas	Galactosídeos	-
<i>Haliclona caerulea</i>	H-3	-	GalNAc	Anticâncer
<i>Lubormirska baicalensis</i>	Lb MBL	Tipo C	Manose	Modulação do crescimento
<i>Haliclona okadai</i>	HOL-18	Galectinas	Galactosídeos	Anticâncer

Fonte: Quadro adaptado de Carneiro, (2013).

As galectinas são proteínas ligantes de β -galactosídeos que possuem um DRC altamente conservado. Estas proteínas inicialmente foram denominadas como “lectinas do Tipo S”, devido a sua dependência de grupos sulfidrila (-SH), porém muitas galectinas apresentam atividade mesmo na ausência de tais grupos (Radhakrishnan *et al.*, 2023).

As galectinas podem ser divididas em três subfamílias de acordo com a sua arquitetura: proto, químera e tandem (Figura 2). As galectinas do tipo proto possuem um único DRC por cadeia polipeptídica, enquanto que as do tipo químera possuem um DRC na porção do C-terminal e um domínio não lectínico equivalente ao colágeno no N-terminal. Já as lectinas do tipo tandem possuem dois DRCs numa mesma cadeia polipeptídica (Radhakrishnan *et al.*, 2023).

As lectinas do Tipo C são proteínas que inicialmente receberam essa nomenclatura por serem dependentes de Ca^{2+} . As lectinas que fazem parte dessa classe são caracterizadas por terem um domínio CTLD (Domínio de Lectina do Tipo C), composto por cerca 130 aminoácidos, consistindo em um domínio modular de reconhecimento de carboidratos. Com o aumento no número de lectinas identificadas e com o número de sequências determinadas, notou-se que nem todas lectinas que possuem DRC do Tipo C são ligantes a cálcio ou até mesmo de carboidratos (Radhakrishnan *et al.*, 2023; Weis *et al.*, 1991).

As lectinas do Tipo C podem atuar de diversas maneiras, em esponjas elas podem desempenhar ação de adesão, funcionando como pontes entre a superfície celular e os fatores de agregação como demonstrado por Gundacker e colaboradores (2001).

As tachylectinas são proteínas que possuem sequências de aminoácidos com seis domínios repetidos (Saito *et al.*, 1995). Elas foram inicialmente identificadas no caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) e posteriormente em fungos viscosos e esponjas primitivas, além de exibirem atividade antimicrobiana (Schröder *et al.*, 2003).

1.4 Lectinas do Gênero *Haliclona*

Até o presente momento foram isoladas sete lectinas do gênero *Haliclona*, presentes nas espécies *Haliclona* sp, *H. cratera*, *H. caerulea*, *H. manglaris* e *H. implexiformes* (Mebs *et al.*, 1985; Pajic *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2013a; Carneiro *et al.*, 2013b; Carneiro *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2023).

A primeira lectina do gênero *Haliclona* foi isolada através da combinação de cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de afinidade, A lectina apresentou uma

massa molecular de 24 kDa e se ligando a lactose (Mebs *et al.*, 1985).

A HcL, lectina isolada de *H. cratera*, apresentou afinidade por galactose, GalNAc, lactose, dissacarídeos de galactose e galactomanana. HcL é um dímero formado por duas subunidades de 14 kDa e mostrou efeito citotóxico sobre as linhagens de células cancerígenas HeLa (células de câncer cervical humano cultivada em laboratório) e FemX (cepa de células melanoma humano cultivada em laboratório), com valores de LC50 de 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 11 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Pajic *et al.*, 2002).

A lectina da esponja marinha *H. manglaris* (HMA-1) é um heterotrímero formado por duas cadeias β de 15 kDa e uma cadeia α de 22 kDa. A HMA-1 foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com enzimas, principalmente os eritrócitos tratados com tripsina e mostrou afinidade apenas pela glicoproteína tiroglobulina. Além disso, a HMA não mostrou toxicidade contra os náuplios de *Artemias* e não aglutinou bactérias (Carneiro *et al.*, 2015).

A HiL, lectina da esponja marinha *H. implexiformis* apresentou afinidade a galactose e a seus derivados. Ademais, foi inibida pelas glicoproteínas mucina de estômago de porco (PSM) e mucina de estômago bovino (BSM). Em SDS-PAGE apresentou uma banda de massa molecular de 20 kDa na presença de β – mercaptoetanol. Já em condições não redutoras, exibiu uma banda de 20 kDa e uma banda adicional de 36 kDa. A HiL apresentou ação significativa contra células viáveis de biofilmes de *Staphylococcus* (Andrade *et al.*, 2023).

As lectinas denominadas de Halectina 1 (H-1), Halectina 2 (H-2) e Halectina 3 (H-3) foram isoladas da esponja marinha *H. caerulea*. A Halilectina 1 foi isolada através da combinação de cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A atividade hemaglutinante de H-1 não foi inibida por nenhum dos carboidratos e glicoproteínas testadas. Além disso, H-1 foi capaz aglutinar diversos grupos sanguíneos, apresentando preferência para eritrócitos humanos tratados com tripsina. Em SDS- PAGE, a proteína exibiu uma banda única de 40 kDa, na presença e na ausência de β – mercaptoetanol. Em cromatografia de exclusão a lectina apresentou massa estimada foi de 15 kDa. Além disso, mostrou toxicidade contra náuplios de *Artemias* sp. (Carneiro *et al.*, 2013a).

A Halilectina 2 (H-2) é uma proteína homodimérica com monômeros de massa equivalente a 15 kDa. H-2 aglutina com mais eficácia eritrócitos de coelho nativo e possui afinidade a mucina de estômago de porco tipo II e tipo III (PSM - porcine stomach mucin). Além disso, parte da sua sequência de aminoácidos foi determinada (76%), e mostrou semelhança a uma lectina da bactéria *Victivallis vadensis*, indicando possivelmente que pode

haver uma relação de evolução conjunta entre essas lectinas, ou que a H-2 seja, na verdade, de uma bactéria que viva em simbiose com a esponja marinha *H. caerulea* (Carneiro, 2013; Carneiro *et al.*, 2013a).

Já a Halilectina 3 (H-3) é uma proteína heterogênea, visto que ela apresentou três bandas de 9, 16 e 18 kDa, na ausência e na presença do agente redutor, em SDS-PAGE. A proteína mostrou afinidade para D-GalNAc e a mucina de estômago de porco (PSM). Além disso, a sua sequência de aminoácidos foi determinada através de espectrometria de massas em tandem e não apresentou nenhuma semelhança a família de lectina de animais (Carneiro *et al.*, 2013b). A H-3 foi capaz de induzir apoptose em células da linhagem MCF7 (câncer de mama), sem afetar células normais e apresentou efeito antimetástico ao evitar a adesão de células tumorais (Nascimento-Neto *et al.*, 2018).

1.5 Propriedades biotecnológicas de lectinas de esponjas

Diversas aplicações biotecnológicas têm sido sugeridas para lectinas de esponjas em virtude do amplo efeito biológico demonstrado por estas proteínas.

A CCL, lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, apresentou atividade contra protozoários causadores da Leishmaniose, sendo capaz de reconhecer carboidratos presentes na superfície da célula do parasita e causar toxicidade (Sousa *et al.*, 2021).

Além de CCL, as lectinas isoladas das esponjas marinhas *Cliona varians* (CvL) e *Cinachryrella apion* (CaL) foram capazes de aglutinar as células promastigotas de *L. chagasi* (Moura *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2010).

Sadanandan e Rauf (2022) relataram que a ADL, lectina da esponja marinha *Axinella donnani*, apresentou efeito citotóxico contra as linhagens celulares MCF-7, A431 e HeLa. Esse processo foi observado após um tempo de 24h de maneira dose-dependente. Ratheesh *et al.* (2018) evidenciaram que a ADL foi capaz de exibir atividade antifúngica contra *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus flavus*.

A lectina isolada da esponja marinha *Fasciospongia cavernosa* (FCL) apresentou atividade antifúngica contra cepas de *Penicillium chrysogenum* e *Candida albicans*. Além disso, FCL também mostrou atividade inseticida (Sadanandan; Rauf, 2021).

A lectina isolada da esponja marinha *A. corrugata* (ACL-1) apresentou forte efeito mitogênico e citotóxico (Dresch *et al.*, 2012). Além disso, a ACL-1 foi capaz de reconhecer células de câncer de mama (T-47D, MCF7), colón (HT-29), pulmão (H460), ovário (OVCAR-3) e bexiga (T24), através do reconhecimento de GalNAc e GlcNAc na superfície das células (Dresch *et al.*, 2013).

A HOL-18, lectina isolada da esponja marinha *Halichondria okadai* também apresentou efeito citotóxico contra células cancerígenas das linhagens HeLa, MCF-7 e T47D. Além disso, a HOL-18 exibiu efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Shigella boydii* e *Pseudomonas aeruginosa*). A HOL-18 também mostrou ter atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa*. (Hasan; Ozeki, 2019).

A capacidade de aglutinar bactérias patogênicas e promover a redução do biofilme bacteriano foi observada para as lectinas de *Aplysina lactuca* (ALL) e *A. fulva* (AFL) (Carneiro *et al.*, 2017; Carneiro *et al.*, 2019). Além disso, ALL potencializou a atividade dos antibióticos ampicilina, tetraciclina e oxacilina contra bactérias das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *S. epidermidis* (Duarte *et al.*, 2023).

A lectina isolada da esponja marinha *Ircinia strobilina* foi capaz de inibir o crescimento de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas não apresentou atividade antimicrobiana (Almeida *et al.*, 2023).

1.6 Resistência bacterina e filmes bacterianos

1.6.1 Resistência bacteriana

Em 1928, Alexander Flemming descobriu a penicilina, o primeiro antibiótico, que se tornou um dos maiores trunfos para a ciência e um agente fundamental para o combate a cepas bacterianas. Entretanto, diversos estudos subsequentes relatam o surgimento de cepas resistentes à penicilina. (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode acontecer de três formas: adaptativa, resistência intrínseca ou adquirida. A adaptativa é caracterizada por alterações nas expressões genéticas como produto das mudanças ambientais - pH do meio e aos subníveis inibitórios, nutrientes entre outros (Mancuso *et al.*, 2021; Murray *et al.*, 2022). Segundo Motta (2015), a modulação da expressão das bombas de fluxo e das porinas são caracterizados como um tipo de resistência adaptativa. A resistência intrínseca é caracterizada através das propriedades específicas das bactérias, como na seleção de entrada da membrana das bactérias Gram-negativas. A resistência adquirida é a mais comum, acontece quando a bactéria adquire esse fator de resistência e transmite de forma vertical, ou seja, é transmitida através do seu material genético ou por mutação (Lee, 2019).

A resistência de grupos de microrganismos resistentes a antibióticos tem se dado por conta da facilidade na aquisição desses medicamentos em inúmeras áreas, como na agropecuária, medicina veterinária e na indústria farmacêutica (Christaki; Marcou; Tofarides,

2020). Além disso, a transmissão horizontal é outra forma que os microrganismos têm adquirido resistência (Davies; Davies, 2010).

A resistência antimicrobiana se tornou um dos principais problemas para a saúde global do século XXI, visto que representa uma séria ameaça aos animais, ao meio ambiente e principalmente a humanidade (Goel, Nikky *et al.*, 2021). A Organização Mundial de Saúde estima, que em 2050, cerca de 10 milhões de pessoas venham a óbito anualmente por decorrência da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (OMS, 2019). Atualmente, diversos estudos estão focados na melhor forma de diagnosticar, tratar e prevenir infecções. Ademais, existem estudos de bioprospecção de novas moléculas, advinda de fontes naturais com ação antibacteriana (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

A formação dos biofilmes é outro problema relacionado com a resistência bacteriana, pois muitas bactérias usam esse mecanismo como forma de evitar a exposição a antibióticos. Os biofilmes são comunidades microbianas heterogêneas ou homogêneas que habitam uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que possibilita a troca de diversos metabólitos secundários essenciais, material genético para resistir ao estresse e moléculas de sinalização. A matriz de biofilme não protege os microrganismos apenas do estresse ambiental, mas também do sistema imunológico do hospedeiro (Goel, Nikky *et al.*, 2021).

Os biofilmes estão associados a diversas infecções. Na área hospitalar, podem se formar em aparelhos cirúrgicos, por exemplo. Já na área alimentícia, os biofilmes são responsáveis por cerca de 60% dos casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Han *et al.*, 2017).

Atualmente, existem diversas estratégias que estão sendo adotadas para contribuir na erradicação da resistência bacteriana, como a terapia associada, o uso de novas gerações de antibióticos e de substâncias naturais com ação antibacteriana (Khameneh *et al.*, 2016). Além disso, existem as ações capazes de intervir na formação dos biofilmes, como a interferência do *quorum sensing* (QS) e a desfragmentação da arquitetura do biofilme (Galie *et al.*, 2018).

As lectinas se apresentam como alternativas para o controle da formação de biofilmes bacterianos. Em especial, as lectinas de organismos marinhos têm mostrado elevado potencial como moléculas antibiofilmes. Por exemplo, as lectinas das algas marinhas *Codium isthmocladum* e *Solieria filiformis*, bem como a lectina do gastrópode *Aplysia dactylomela* são capazes de reduzir a formação de biofilmes de diversas bactérias patogênicas (Carneiro *et al.*, 2020; Carneiro *et al.*, 2017a; Chaves *et al.*, 2023).

As lectinas de esponjas marinhas também têm sido evidenciadas como

promissoras ferramentas na batalha contra os biofilmes bacterianos. As lectinas isoladas de *Aplysina lactuca*, *A. fulva*, *Chondrilla caribensis*, *Haliclona implexiformis* e *Ircinia strobilina* apresentaram efeito antibiofilme contra as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E.coli* (Andrade *et al.*, 2023; Carneiro *et al.*, 2017a Carneiro *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2017).

Assim, baseando-se em diversos estudos já descritos na literatura sobre as diversas atividades biológicas das lectinas isoladas de organismos marinhos, em especial das esponjas marinhas, e na busca por moléculas para o tratamento contra bactérias resistentes e com baixa imunogenicidade, favoreceram a realização o estudo sobre o potencial antibacteriano da Halilectina 2 (H-2) isolada da esponja marinha *H. caerulea*.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme da Halilectina (H-2), presente na esponja *Haliclona caerulea*.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a estrutura secundária de H-2 frente às diferentes faixas de pH;
- Avaliar o efeito aglutinante da lectina H-2, contra as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303.
- Avaliar o potencial antibiofilme da lectina frente aos biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303.
- Avaliar o potencial antibacteriano da lectina em combinação com antibióticos contra as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta do material

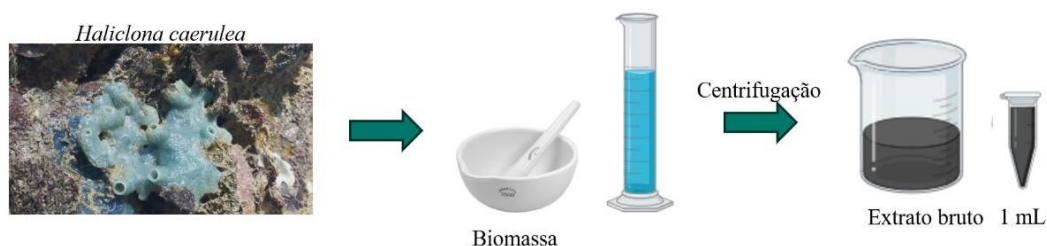
Os exemplares da esponja marinha *Haliclona caerulea* foram coletados na zona entre marés da Praia do Pacheco, Caucaia, Ceará, Brasil. A coleta e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados e regulamentados pelos agentes governamentais competentes (SISBIO 33913-12 e SISGEN A1792FE).

3.2 Purificação da Halilectina 2 (H-2)

A lectina presente na esponja marinha *Haliclona caerulea* (H-2) foi obtida com seguindo o protocolo previamente estabelecido por Carneiro e colaboradores (2013a) com algumas modificações.

As esponjas foram pesadas, maceradas e homogeneizadas na proporção de 1:2 (m/v) em água destilada. O extrato foi filtrado em tecido de nylon para a retenção das partículas grandes, posteriormente os resíduos foram submetidos a uma nova maceração e filtração. Finalmente a mistura foi centrifugada a 9000 xg, por 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi armazenado e denominado extrato bruto, conforme pode ser observado no esquema da figura 3.

Figura 3 – Etapa de preparação do extrato proteico.

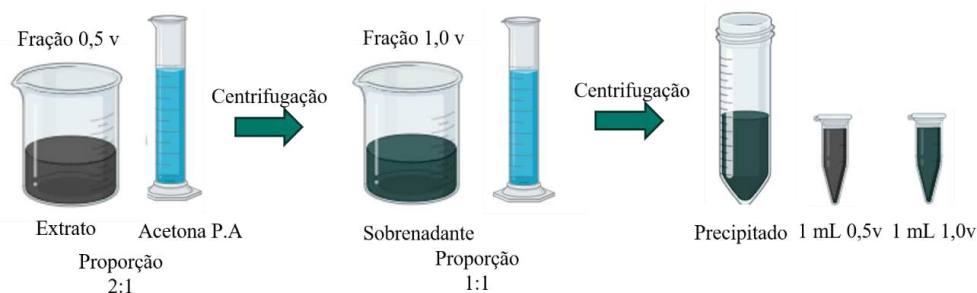


Fonte: O autor (2024).

O extrato bruto foi submetido ao fracionamento com Acetona P.A. Inicialmente, acetona gelada foi adicionada na proporção 1:2 (acetona/extrato), após 4 h a 4 °C, a mistura foi centrifugada, o precipitado foi solubilizado num pequeno de volume de tampão Tris 50 mM, pH 7,6, sendo denominado fração 0,5 (F 0,5v). O sobrenadante foi submetido a uma nova precipitação, na qual foi adicionada acetona gelada, para que atingisse a proporção 1:1 (acetona/extrato). Após 4 h a 4 °C, a mistura foi então centrifugada, sendo o precipitado solubilizado num pequeno de volume de tampão Tris 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM

(TBS), denominado F 1,0, como representado na Figura 4.

Figura 4 – Fracionamento do extrato proteico com acetona.



Fonte: O autor (2024).

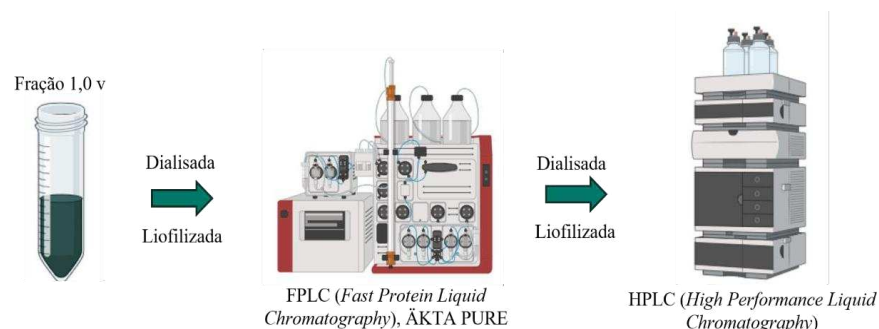
A F 1,0 v foi dialisada contra água destilada, liofilizada e solubilizada em um pequeno volume de tampão Tris 50 mM, pH 8,0. Após centrifugação, a F 1,0 foi então submetida a uma cromatografia de troca iônica em matriz Hitrap™ Q-Sepharose, previamente equilibrada com tampão Tris 50 mM, pH 8,0, acoplada a um FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA pure (GE Healthcare). As frações adsorvidas foram eluídas com Tris 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 1M, através de *step wise* de NaCl (0,25 e 1M). Frações de 1 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e posteriormente submetidas a cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em matriz Sephacryl S200 acoplada ao sistema ÄKTA pure (GE Healthcare). A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL por minuto. A coluna foi equilibrada e eluída com TBS. As frações contendo a lectina foram coletadas, dialisadas contra água deionizada e liofilizadas para uso posterior. Esse processo pode ser observado na representação da Figura 5.

O extrato bruto, a F 1,0 v, o P3 e fração obtida após a cromatografia de exclusão molecular, foram submetidos a determinação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976).

Ao final do processo, o extrato bruto e todas as frações foram submetidas ao ensaio de hemaglutinação e ao ensaio de quantificação de proteínas solúveis (Bradford, 1976).

Figura 5 – Representação das etapas cromatográficas.



Fonte: O autor (2024).

3.3 Atividade hemaglutinante

Os testes de hemaglutinação foram realizados com a utilização de eritrócitos de coelho obtidos no setor de cunicultura, localizado do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal do Ceará sob a seguinte numeração: 2211202101.

Após a obtenção do sangue, foi preparada a suspensão de eritrócitos nativos. Os eritrócitos foram lavados 6 vezes em diluição de 10 volumes de NaCl 150 mM. Após esse processo, foi preparada a suspensão a 3% de eritrócitos em NaCl 150 mM (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados de acordo com método estabelecido por Sampaio *et al.* (1998). Foram adicionados 50 μ L de TBS, 50 μ L de amostra, em placas de titulação que foram diluídas seriadamente em cada coluna de poços, e posteriormente, 50 μ L de eritrócitos. A amostra permaneceu incubada por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada a olho nu e expressa em títulos de hemaglutinação (U.H.mL⁻¹).

3.4 Ensaio de inibição de carboidratos

O ensaio de inibição foi realizado segundo metodologia previamente estabelecida por Sampaio *et al.* (1998), utilizando uma concentração da lectina capaz causar 4 U.H.mL⁻¹.

Os carboidratos e glicoproteínas utilizados foram: D -galactose, D-glicose, D-manose, D-frutose, N -acetil- D-glucosamina, N -acetil- D -galactosamina, fetuína, asialofetuína, D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, , D- galactosamina, N -acetil-D-glucosamina(GlcNAc), N -acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, , D-sacarose, D-melibiose, α -D -lactose, D-lactulose, D-maltose, D- rafinose, metil- α -D-glicosídeo, metil- α -D-galactosídeo, metil- β -D-galactosídeo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- α -D-galactosídeo, 4-nitrofenil- β -D-galactosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactosídeo, metil- α - D -glucopiranosídeo, metil- α - D -galactopiranosídeo, D -lactose, D-sacarose, mucina do estômago suíno tipo II e III (PSM-*porcine stomach mucin*).

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado em placas de fundo em V, no qual foram adicionados 50 μ L de TBS, pH 7,6, aos poços e 50 μ L de amostra e em seguida foram adicionados 50 μ L de eritrócitos de colho nativo. Após 1 hora de incubação

foram adicionados 50 μ L das soluções de açúcares e glicoproteínas.

3.5 Estimativa da massa molecular

O grau de pureza e homogeneidade da proteína foi verificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), na ausência de β – mercaptoetanol (Laemmi, 1970). O gel de 15% foi submetido a uma corrente de 25 mM e tensão de 150V por 1 hora.

A massa molecular da proteína em condições desnaturantes foi estimada através da comparação da migração das proteínas purificadas com proteínas de peso molecular já conhecido (miosina, 210 kDa; albumina sérica bovina – BSA, 90 kDa; glutamato desidrogenase - GDH, 65 kDa; vasopressina - ADH, 40 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa; lisozima, 13 kDa; aprotinina, 8 kDa), presentes no kit ColorBurst TM Electrophoresis Marker mol wt 8000-220000 Da (Sigma Aldrich, MO).

3.6 Dicroísmo circular

As análises de dicroísmo circular foram realizadas utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co- Tóquio, Japão) conectado a um *Peltier* com temperatura controlada.

A proteína foi solubilizada em água ultra pura, numa concentração de 0,2 mg/mL⁻¹, sendo então disposta em uma cubeta de quartzo retangular com 5 mm de caminho óptico. Os espectros foram captados no intervalo de 190 a 240 nm (*far*-UV), a uma velocidade de 100 nm por minuto.

A composição da estrutura secundária foi determinada através do servidor *on-line* DICROWEB utilizando a ferramenta CONTIN (Spoelder; Grondelle; Groen, 1990; Greenfield, 2007).

3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

3.7.1 Ensaio de aglutinação bacteriana

O experimento envolveu o uso das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698 (*S. aureus* Resistente à Meticilina - MRSA), e *Escherichia coli* ATCC 11303, seguindo método adotado por Melo e colaboradores (2014) com algumas modificações. Todas as linhagens bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas

contendo Tryptic Soy Agar (TSA) por 24 horas a uma temperatura de 37 °C. As bactérias foram cultivadas em 5 mL de caldo nutritivo Trypticase Soy Broth (TSB) e incubadas por mais 24 horas a 37 °C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavadas três vezes com um tampão Tris- HCl 50 mM pH 7,6, contendo 150 mM de NaCl (TBS). Em seguida, as células foram novamente suspensas em TBS contendo formaldeído a 4% e mantidas a 4 °C por 24 horas. Após a incubação com formaldeído, as células foram novamente lavadas com TBS e a concentração final das bactérias foi ajustada para 2×10^8 por meio da leitura da absorbância a 620 nm de acordo com as curvas de crescimento previamente determinadas.

Posteriormente 50 µL das células bacterianas foram adicionados em microtubos com 50 µL de uma solução da lectina. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e transferidas para lâminas para melhor visualização. Além disso, foi realizada uma análise da capacidade aglutinante da lectina na presença de mucina tipo II (inibidor da lectina), onde a lectina foi pré-incubada com 50 µL de mucina tipo II a uma concentração de 100 mM, por 30 minutos. Após este período foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana. Os grupos controles consistiram em apenas as células bacterianas e outro com ou presença de mucina II. A observação da atividade foi realizada utilizando um microscópio óptico Basic Trinocular Planocromático – K55TP.

3.8 Microrganismos e condições de cultura

Foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303. As bactérias que foram utilizadas fazem parte do conjunto de culturas pertencente ao Laboratório de Microbiologia aplicada do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) da Universidade Federal do Ceará.

As cepas foram inoculadas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA: Himedia, Índia) a 37 °C por 24 h. As colônias isoladas foram inoculadas em 10 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB: Himedia, Índia), sob as mesmas condições anteriores. As células foram separadas por centrifugação (10 min a 9000 xg a 4 °C), suspensas em TSB e ajustadas para uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ por densidade óptica a 620 nm e foram armazenadas para uso posterior.

3.8.1 Ensaio de formação de biofilme

O efeito da H-2 sobre a formação de biofilme foi avaliado de acordo com o descrito por Vasconcelos e colaboradores (2014) com modificações. Foram utilizadas duas placas de poliestireno com 96 poços seguindo os mesmos procedimentos estabelecidos para o crescimento celular planctônico uma para enumeração de células viáveis e outra para a quantificação da biomassa do biofilme.

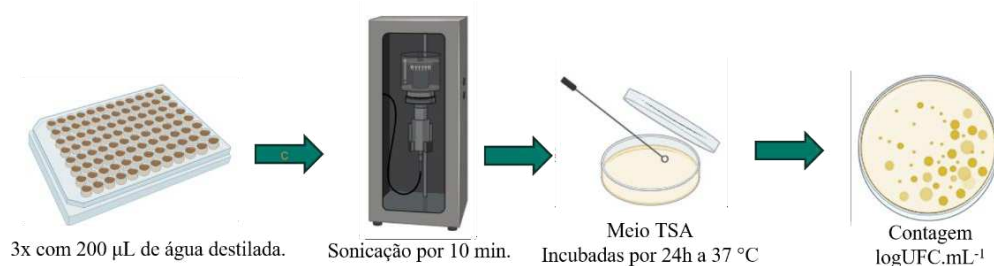
3.8.2 *Quantificação da massa de biofilme*

A quantificação da biomassa do biofilme bacteriano foi realizada pelo método colorimétrico cristal violeta (CV). Após a formação do biofilme, os poços foram lavados duas vezes com 200 μL de água destilada estéril para remover células fracamente aderidas. Para fixar o biofilme, 200 μL de metanol 99% foram inseridos em cada poço. Em seguida, o metanol foi removido após 5 min, e as placas foram deixadas secar a 25 °C. Em seguida, 200 μL de cristal violeta 1% (v/v) foram adicionados por 5 min, sendo o excesso de cristal violeta descartado e os poços foram lavados três vezes com água destilada. Por fim, foi adicionado ácido acético 33% (v/v) para solubilizar o cristal violeta aderido à biomassa do biofilme, e a densidade óptica foi medida a 590 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax® I3, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA).

3.8.3 *Quantificação de células viáveis nos biofilmes*

As placas contendo biofilmes estabelecidos na presença ou ausência das lectinas foram lavadas três vezes com 200 μL de água destilada estéril e as placas foram levadas ao banho sônico por 10 min. As suspensões obtidas após sonicação foram submetidas a diluições seriadas e semeadas em TSA, seguidas de incubação a 37 °C por 24 h, como pode ser verificado na figura 6. O número total de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado e expresso em $\log\text{UFC.mL}^{-1}$.

Figura 6 – Representação da quantificação de células viáveis nos biofilmes.



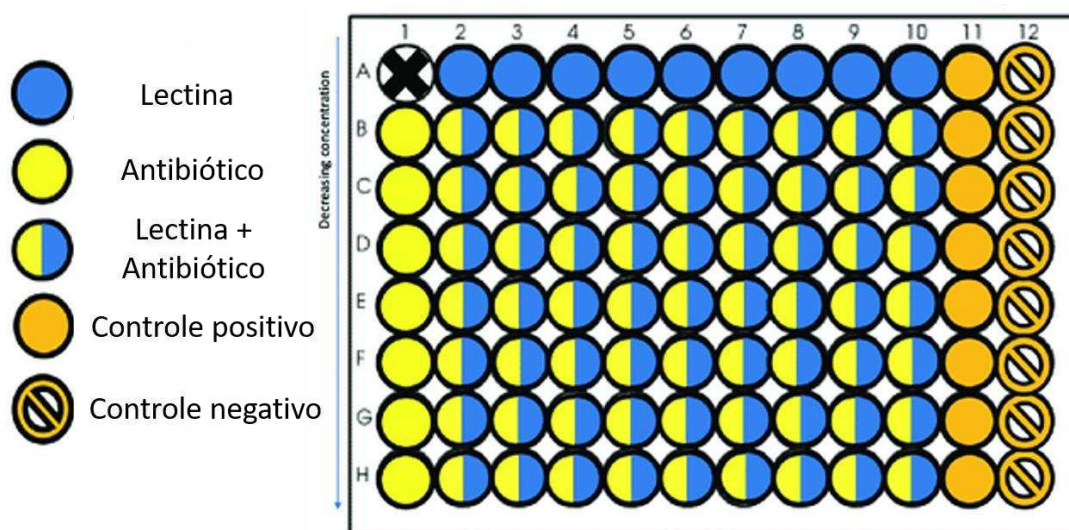
Fonte: O autor (2024).

3.9 Atividade antibacteriana da lectina em associação a antibióticos

O método de *Checkerboard* (CKB) é a metodologia mais comum utilizada para avaliar *in vitro* a sinergia entre substâncias com ação antibacteriana. O processo faz referência a múltiplas diluições com dois métodos com ação antibacteriana em concentrações equivalentes, acima ou abaixo das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para as bactérias em estudo. O método compõe-se em colunas contendo concentrações diferentes da substância “A” diluída no decorrer do eixo *x* e linhas contendo a substância “B” ao longo do eixo *y* (Figura 7) (Lorian, 2005).

O procedimento foi executado de acordo com Duarte e colaboradores (2023), onde foi avaliado a combinação da H-2 com os antibióticos ampicilina e oxacilina contra as bactérias descritas anteriormente. Tanto a lectina quanto os antibióticos foram diluídos separadamente em placas de microdiluição e misturados em uma nova placa, contendo 50 µL do antibiótico, 50 µL da lectina e 100 µL do inoculo bacteriano previamente ajustado. Após esse processo, a placa foi incubada por 24 h a 37 °C, para determinação da nova CIM em ação conjunta, sendo observada a densidade óptica a um comprimento de 620 nm em um leitor de microplacas (Spectramax®). Para os valores iguais a $\frac{1}{2}$ x CIM foi considerado efeito aditivo e valores entre $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{16}$ como efeito sinérgico.

Figura 7 – Representação esquemática do teste de antibacteriano combinado a diferentes concentrações de antibiótico e lectina.



Fonte: Adaptado de FADWA *et al.*, (2021).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M e analisados por ANOVA. As diferenças foram consideradas para os valores de $p < 0,05$.

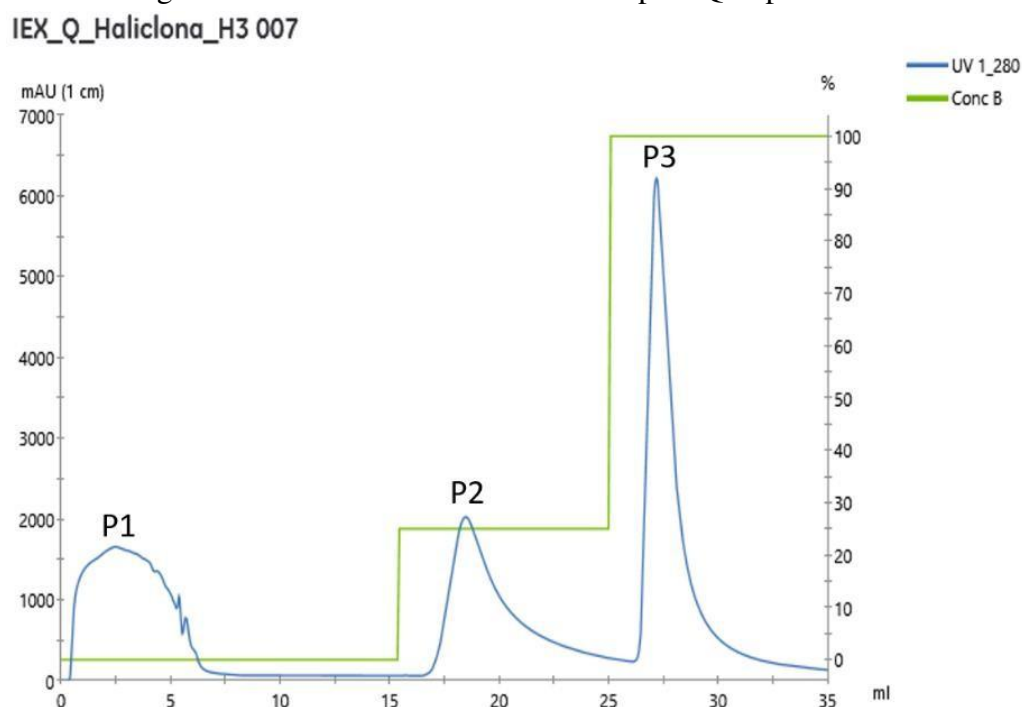
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina

A lectina presente na fração F 1,0v do extrato aquoso da esponja marinha *Haliclona caerulea* foi purificada através de cromatografia de troca iônica em matriz Hitrap™ Q-Sepharose, acoplada em sistema ÄKTA HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia filtração em gel, em matriz Sephacryl S200 acoplada a um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA pure (GE Healthcare).

Após a cromatografia de troca iônica as frações referentes ao P3 foram reunidas, dialisadas e liofilizadas (Figura 8).

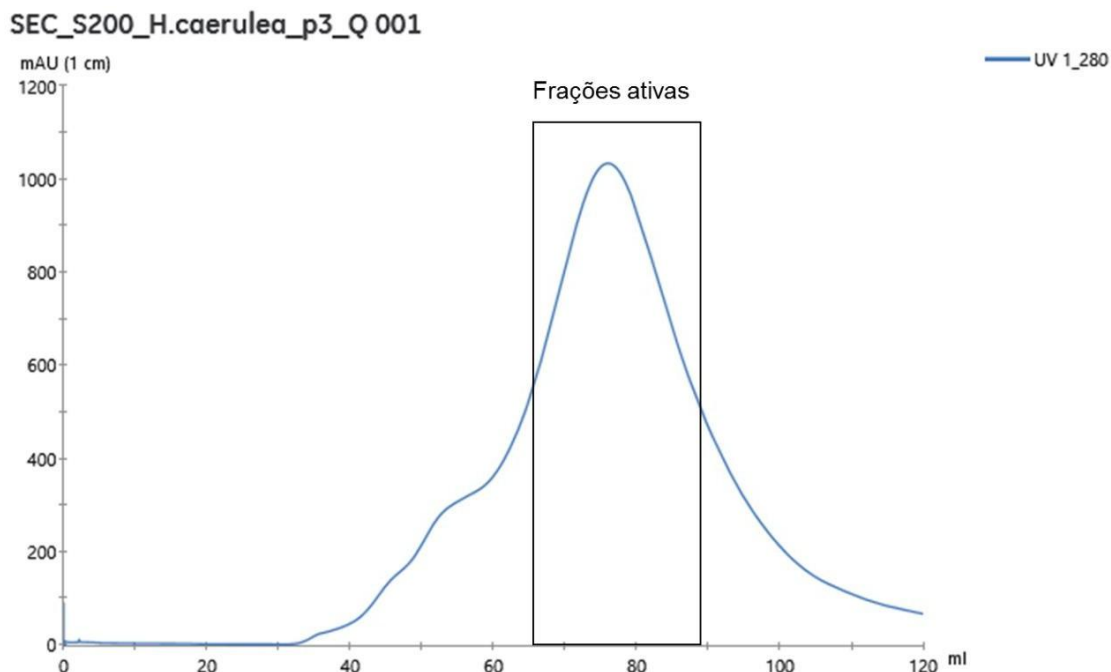
Figura 8 - Cromatografia de troca iônica em matriz Hitrap™ Q-Sepharose.



Fonte: O autor (2024). P3 - frações contendo a Halilectina 2 (H-2). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão Tris 50 mM, pH 8,0. A eluição foi realizada através de *step wise* de NaCl (0,25 e 1M) contido no tampão de equilíbrio. O fluxo foi mantido em 1 mL/min; e frações de 1 mL foram coletadas. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

A segunda etapa do processo foi realizada em coluna de filtração em matriz Sephacryl S200 acoplada a um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA pure (GE Healthcare). Nesta etapa do processo foi observado um pico majoritário (Figura 9), cujas frações, eluídas entre 60 e 100 mL, apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho.

Figura 9 - Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S200



Fonte: O autor (2024). A coluna Sephacryl (2,0 x 60 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris 50 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM. Foram aplicados 12mg de amostra, o fluxo foi mantido em 1 mL/min e frações de 2 mL foram coletadas.

O processo de purificação utilizando matriz HitrapTM Q-Sepharose foi eficaz, visto que permitiu a adsorção de H-2 (Lectina 2 de *Haliclona caerulea*), separando parcialmente a lectina dos contaminantes. A matriz Hitrap Q-Sepharose tem como princípio a separação de moléculas através das diferenças de suas cargas superficiais, sendo então separadas por eluição com soluções salinas. Além disso, esse tipo de matriz interage com os grupos que são carregados negativamente, presentes na proteína.

A utilização da combinação de cromatografia de troca iônica, seguida de cromatografia de exclusão molecular tem sido efetiva para o isolamento de lectina de esponjas marinhas.

As lectinas das esponjas marinhas, *Haliclona cratera* e *Cranilla australiensis*, foram isoladas através da combinação das cromatografias de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular (Pajic *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2006).

4.2 Atividade hemaglutinante do extrato e das frações contra eritrócitos de coelho

O extrato aquoso e as frações oriundas da precipitação com acetona foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante frente a eritrócitos de coelho nativos. O extrato e as frações 0,5 v e 1,0 v apresentaram títulos de 64 HU. mL⁻¹.

A F 1,0v foi submetida a cromatografia de troca iônica em matriz Q-Sepharose, a fração retida (P3) apresentou títulos de 256 HU/mL⁻¹.

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante.

Amostra	Título (U.H. mL ⁻¹)
Extrato bruto	57.600
P3	20.736
H-2	17.920

Fonte: O autor (2024). E.B – Extrato bruto; P3 – Frações retidas na cromatografia de troca iônica e eluidas com 1M de NaCl; H-2 – proteína purificada após cromatografia de exclusão molecular.

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e os ensaios de atividade hemaglutinante mostraram uma concentração no extrato bruto de 0,245 mg/mL⁻¹ e título de 64 U.H. Já para a fração coletada na cromatografia de troca iônica, a concentração de proteínas foi de 0,229 mg.mL⁻¹ com título de 256 U.H. Os dados de quantificação de proteínas e atividade hemaglutinante para a H-2 estão resumidos na tabela 2.

A lectina eluida da coluna representou 31,11 % da atividade hemaglutinante total presente no extrato. O processo de purificação aumentou em 33,8 vezes a atividade específica da lectina em comparação com o extrato bruto (tabela 2).

Algumas lectinas do mesmo gênero também apresentaram resultados semelhante, como a HiL, lectina da esponja marinha *Haliclona implexiformis*, que apresentou um aumento de 17 vezes a atividade específica da lectina em relação com o extrato bruto (Andrade,2022). A lectina H-3, isolada da esponja marinha *Haliclona caerulea*, foi purificada 10 vezes a partir de PI-CM e apresentou 21% da atividade específica total do extrato bruto (Carneiro, 2013).

Tabela 2 - Tabela de purificação da H-2

Fração	Proteína] mg/mL ⁻¹	A.H (U.H.)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U.H.mL ⁻¹)	Purificação (vezes)	Atividade específica (U.H.mg ⁻¹)	Rendimento (%)
E. B	0,245	64	200,5	57.600	1	261,22	100
P3	0,229	256	18,55	20.736	9,25	1117,8	3,89
H-2	0,029	256	2,03	17.920	31,11	8827,58	33,8

Fonte: O autor (2024). A.H – Atividade hemaglutinante; E.B – Extrato bruto; P3 – Frações retidas na cromatografia de troca iônica; H-2 – proteína purificada após cromatografia de exclusão molecular.

A H-2 foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho em sua forma nativa, fato também observado na lectina CCL da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (Marques *et al.*, 2018). Além da CCL, outra lectina de esponja que também apresentou capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho na forma nativa, foi a IsL (*Ircinia strobilina*) (Almeida *et al.*, 2023). A HiL lectina do gênero *Haliclona*, apresentou atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos, tanto na sua forma nativa quanto na sua forma tratada com enzimas (Andrade, 2022).

4.3 Ensaio de inibição de carboidratos

Os resultados dos estudos de inibição da atividade hemaglutinante da H-2, frente a açúcares e glicoproteínas, mostraram que a lectina foi inibida apenas pelas glicoproteínas asialofetuína, fetuína, mucina estômago de porco tipo II e tipo III (PSM - *porcine stomach mucin*) com uma concentração inibitória mínima (CIM), apresentada na tabela 3.

H-2 apresentou maior afinidade pela fetuína, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 31,25 µg/mL, enquanto a asialofetuína apresentou uma CIM de 250 µg/mL. Para PSM II e III, a CIM foi de 250 µg/mL para ambas as glicoproteínas.

Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante da H-2 por glicoproteínas

Inibidores	MIC*
L-fucose	N.I
L-arabinose	N.I
L-ramnose	N.I
D-galactose	N.I
D-manose	N.I
N-acetil-D-glicosamina	N.I
D-glicose	N.I
D-glucosamina	N.I
D-galactosamina	N.I
N-acetil-D-galactosamina	N.I
N-acetil-D-manosamina	N.I
Ácido D-galacturônico	N.I
D-frutose	N.I
D-sacarose	N.I
D-melibiose	N.I
α - lactose	N.I
β - lactose	N.I
D-lactulose	N.I
D-maltose	N.I
Metil- α -D-galactopiranosídeo	N.I
Metil- α -D-galactopiranosídeo	N.I
Metil- β -D-galactopiranosídeo	N.I
Metil- β -D-tiogalactose	N.I
α -metil-manosídeo	N.I
Fenil- β -D-galactopiranosídeo	N.I
Fenil- β -D-galactose	N.I
4-nitrofenil- α -D-galactose	N.I
2-nitrofenil- β -D-galactose	N.I
Fetuína	31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Asialofetuína	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Manana de levedura	N.I
Transferrina	N.I
Tireoglobulina	N.I
Mucina submaxilar bovina (BSM)	N.I
Mucina de estômago de porco tipo II	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Mucina de estômago de porco tipo III	250 $\mu\text{g.mL}$

Fonte: O autor. CIM* – Concentração inibitória mínima. N.I – a glicoproteína ou o carboidrato não inibiu a atividade hemaglutinante.

De fato, Carneiro *et al.*, (2013a) relataram a inibição da H-2 pelas glicoproteínas: PSM tipo II e III, contudo não foi avaliada a inibição por outras glicoproteínas na ocasião.

A preferência de H-2 por fetuína em detrimento da asialofetuína sugere uma possível ligação de H-2 a resíduos terminais de ácido siálico presentes apenas na fetuína. Já a ligação às mucinas pode também indicar preferência de H-2 por ácidos siálicos, uma vez

que as mucinas podem ser altamente sialiladas. Entretanto, o mais comum é que a ligação às mucinas esteja relacionada aos terminais galactose e N-acetil-galactosamina amplamente encontrados nessas glicoproteínas (Černocká; Římánková; Ostatná, 2021).

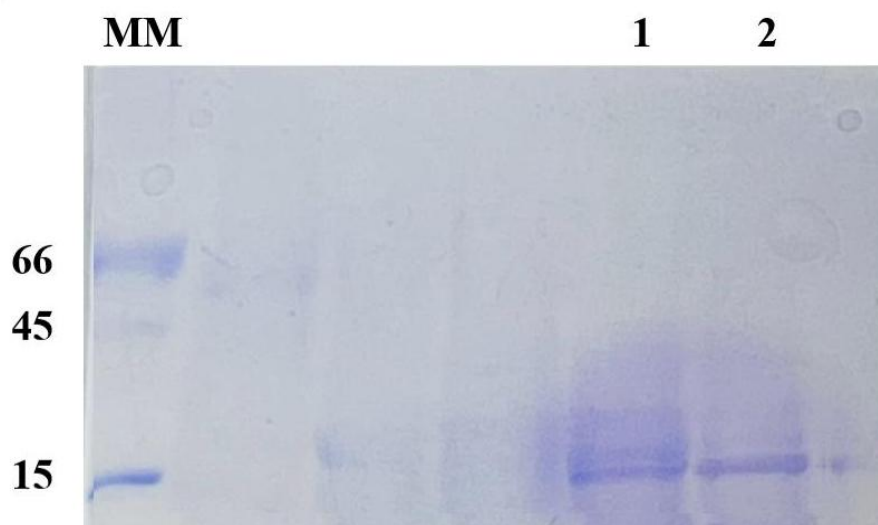
Diversas lectinas apresentam ligação a glicoproteínas, ALL e AFL, isoladas de *Aplysina lactuca* e *A. fulva*, respectivamente, são exemplos de lectinas ligantes a mucina, cuja a interação parece estar relacionada aos galctosídeos terminais (CARNEIRO et al., 2017; CARNEIRO et al., 2019), pois ALL e AFL também foram inibidas por lactose e outros galactosídeos. A HiL, lectina isolada da esponja marinha *Haliclona implexiformis*, teve sua atividade henaglutinante inibida pela glicoproteína PSM do tipo II, apresentando ccncentração mínima inibitória de $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Andrade, 2022).

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

Os estudos de estimativa da massa molecular, através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE), evidenciaram que a H-2 apresentou uma banda de massa molecular estimada em 15 kDa (Figura 10), corroborando com dados obtidos por CARNEIRO et al., (2013a).

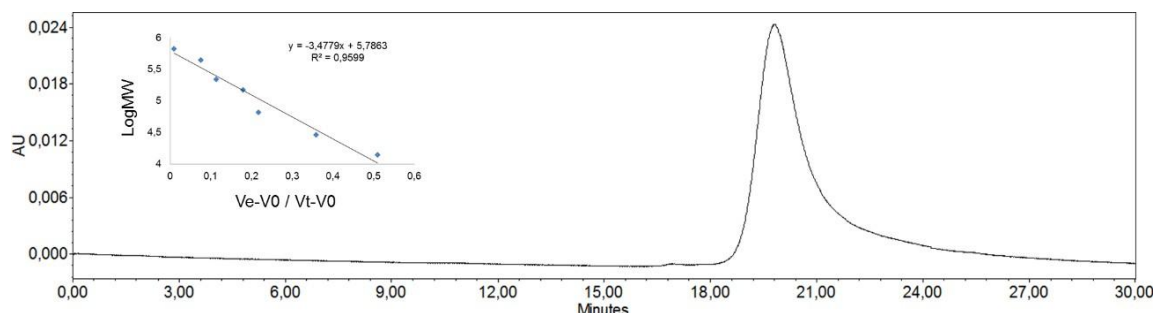
Em cromatografia de exclusão molecular em coluna BEH SEC 200 Å $1,7 \mu\text{m}$ (4.6 mm x 300 mm, Waters Corp.), foi observado um único pico, cuja massa molecular foi estimada em 29 kDa (Figura 11), resultado que está de acordo com a estimativa realizada por Carneiro et al., (2013a).

Figura 10 – Eletroforese da H-2 em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE).



Fonte: O autor (2024). O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R – 250. MM – Marcadores moleculares (albumina sérica bovina – BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa e α -lactalbumina, 14,2 kDa). 1 e 2 - SDS – PAGE (15%) na ausência de β -mercaptoetanol.

Figura 11 – Estimativa da massa molecular nativa de H-2 por cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: O autor (2024). A coluna BEH SEC 200 Å 1,7 μ m (4.6 mm x 300 mm, Waters Corp.) foi equilibrada e eluída com tampão Tris 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM. Foram aplicados 50 μ g de H-2 purificada. O fluxo foi mantido em 0,2 mL.min⁻¹. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

Os resultados estruturais evidenciaram que H-2 é uma proteína homodimérica, com monômeros de 15 kDa interligados por ligações de interações fracas. Em cromatografia de exclusão molecular, a massa nativa de H-2 foi estimada em aproximadamente 29 kDa (Figura 11), sugerindo que H-2 se oligomeriza formando um dímero com as subunidades ligadas por interações fracas.

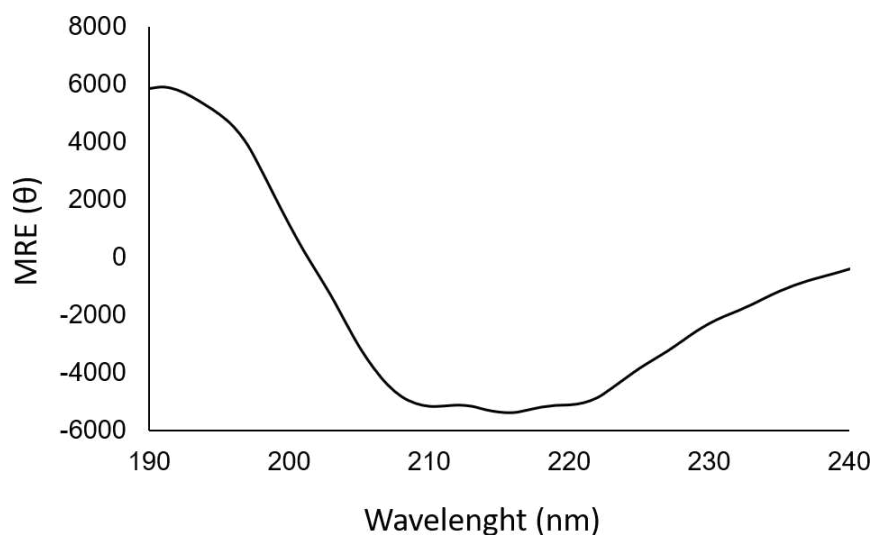
Além da H-2, outras lectinas isoladas de esponjas marinhas também apresentam esse perfil, como a HOL – 30, lectina de *Halichondria okadai*, que exibiu uma banda proteica de 30 kDa em condições redutoras e não redutoras, e 60 kDa através de cromatografia de exclusão molecular (Kawsar *et al.*, 2008). A SFL, uma lectina isolada da esponja marinha *Stylissa flexibilis* apresentou subunidades de 32 kDa em SDS-PAGE, e 65 kDa através de filtração em gel (Ly *et al.*, 2018).

4.5 Dicroísmo circular

Os espectros de Dicroísmo Circular de H-2 mostraram absorção mínima negativa entre 208 e 222 nm, e uma banda positiva em torno de 190 nm. A composição da estrutura secundária foi determinada através do servidor *on-line* DICROWEB utilizando a ferramenta

CONTIN, revelando que a estrutura secundária teórica da lectina é composta por 36% de β -folha, 16% β -dobra, 8 % de α -hélice e 40% de estruturas aleatórias (Figura

Figura 12 – Espectro de Dicroísmo Circular de H-2.



Fonte: O autor (2024). Espectro de Dicroísmo Circular (For-UV; 190 a 240 nm) de H-2. A concentração da proteína foi de 1mg/mL em água ultra pura.

As proteínas com predominância no número de estruturas β são classificadas de duas formas: proteínas β I e proteínas β II. As proteínas β I são caracterizadas por ser composta por grande quantidade de β -folhas e os espectros de Dicroísmo Circular apresentaram uma banda positiva em torno de 190 nm e uma negativa entre 210 e 220 nm. Já as proteínas β II são caracterizadas por grande quantidade de fitas β e apresentam uma pequena banda positiva em torno de 190 nm, e uma máxima negativa em torno de 200 nm (Sreerama; Woody, 2003). Dessa forma, é possível classificar H-2 como uma proteína do tipo β I.

Lectinas isoladas de esponjas marinhas também apresentaram predominância de conformações β em suas estruturas secundárias. A lectina isolada da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL) é formada por 35% de β -folhas, 23% β -dobra, 9% de α -hélice e 33% de estruturas randômicas (Carneiro *et al.*, 2017). Já AFL, a lectina isolada da esponja *A. fulva*, é composta por 41% de β -folhas, 20% de β -dobras, 2% de α -hélice e 36% de estruturas randômicas (Carneiro *et al.*, 2019). Com relação à lectina isolada da esponja marinha *Haliclona implexiformis* (HIL), foi evidenciado que essa lectina era constituída por 31% de β -folhas, 18% de β -dobra, 6% de α -hélice e 45% estruturas randômicas (Andrade *et al.*, 2023).

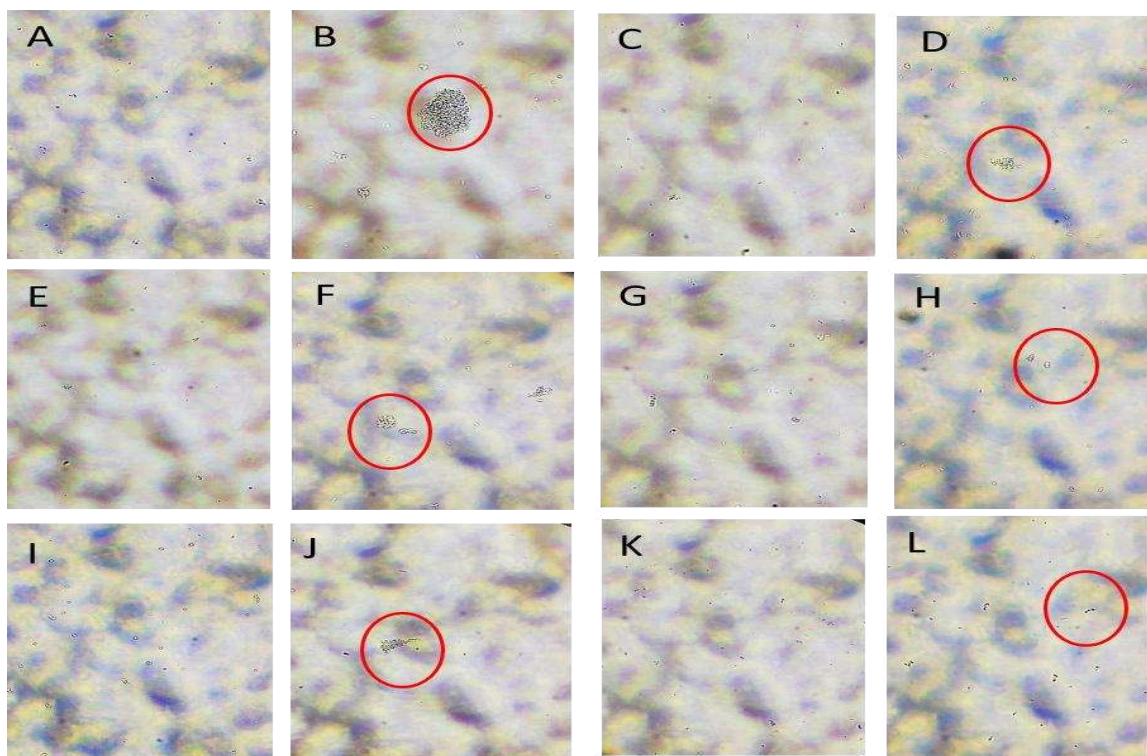
Os resultados acima mostram que existem lectinas de esponjas marinhas que

possuem predominância de β -folhas, sugerindo que essas lectinas podem também ser classificadas como proteína do tipo β I., como foi constatado no presente trabalho com H-2, a lectina de *Haliclona caerulea*.

4.6 Ensaio de aglutinação bacteriana

O ensaio de aglutinação bacteriana demonstrou que a H-2 foi capaz de aglutinar células das cepas de *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 13).

Figura 13 – Teste de aglutinação da H-2 contra diferentes cepas bacterianas 12).



Fonte: O autor (2024). O efeito aglutinante da H-2 foi verificado frente *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 700698. A - Branco *E. coli*; B - H-2 contra *E. coli*; C – Branco *E. coli* com mucina tipo II; D – H-2 contra *E. coli* com mucina tipo II; E - Branco *S. aureus* ATCC 25923; F - H-2 contra *S. aureus* ATCC 25923; G – Branco *S. aureus* ATCC 25923 com mucina tipo II; H – H-2 contra *S. aureus* ATCC 25923 com mucina tipo II; I- Branco *S. aureus* ATCC 700698; J - H-2 contra *S. aureus* ATCC 700698; K – Branco *S. aureus* ATCC 700698 com mucina tipo II; L – H-2 contra *S. aureus* ATCC 700698 com mucina tipo II.

A H-2 foi capaz de aglutinar fortemente as células bacterianas de *E. coli* (Figura 13B). Interessantemente, a lectina manteve a sua atividade de aglutinação quando incubada previamente com mucina tipo II (Figura 13D).

Com relação as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698, a

proteína foi capaz de aglutinar às células bacterianas de ambas (Figura 13F e Figura 13J), e quando incubada previamente com mucina tipo II, manteve a sua atividade de aglutinação (Figura 13H e Figura 13L).

Algumas lectinas tem capacidade de se ligarem a glicanos específicos presentes na superfície celular dos microrganismos, ocasionando agregação bacteriana. Diversas estruturas presentes na superfície celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser reconhecidas por polissacarídeos capsulares, ácido teicóico, LPS e proteínas. (SCHRODER *et al.*, 2003).

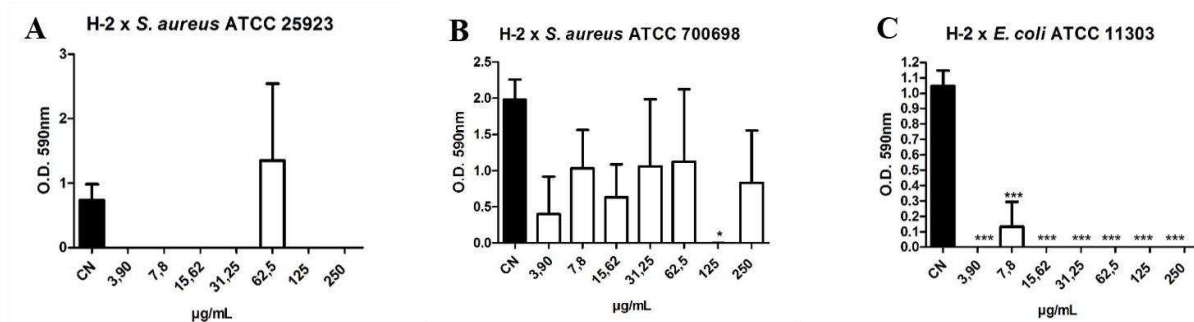
Diversas lectinas de esponjas apresentam capacidade de se ligarem a carboidratos específicos presentes na parede celular bacteriana e assim exibem atividade antibacteriana. A CCL, lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis* (Marques *et al.*, 2018), foi capaz de aglutinar as cepas bacteriana de *E. coli* e *S. aureus*. Estudos também evidenciaram que essa capacidade de aglutinar bactérias foi observada com a lectina isolada da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL), exibindo aglutinação contra as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente (Carneiro *et al.*, 2017b).

4.7 Efeito da lectina na formação do biofilme bacteriano

O efeito da H-2 sobre a formação de biofilmes foi verificado através de dois métodos diferentes: determinação da massa de biofilme quantificado através do método colorimétrico cristal violeta (CV) e quantificação de células viáveis de biofilmes através do método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

O ensaio do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a H-2 mostrou uma redução significativa do biofilme nas concentrações 3,90, 7,8, 15,62, 31,25, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14A). Com relação a bactéria *S. aureus* 700698, a redução do biofilme foi observada apenas na concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 10B). Para o tratamento do biofilme de *E. coli* 11303 com a lectina, a redução da biomassa bacteriana foi constatada nas concentrações 3,90, 7,8, 15,62, 31,25, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14 C).

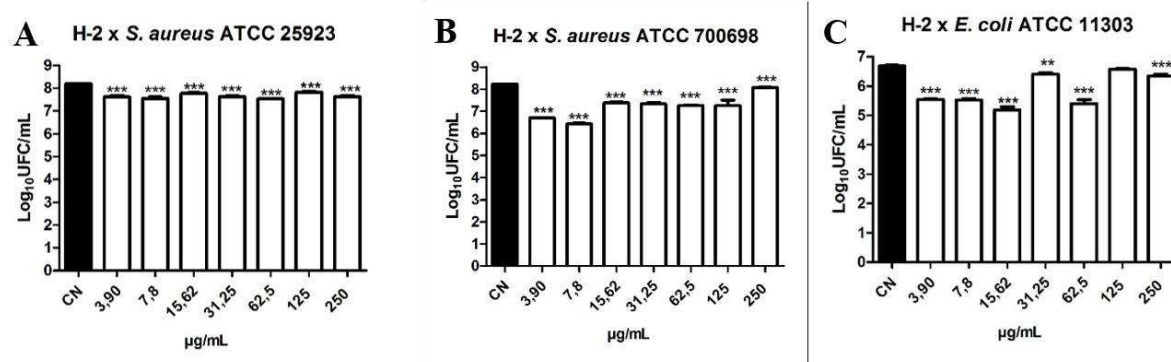
Figura 14 – Efeito da H-2 sobre biofilmes de *S. aureus* e *E. coli*.



Fonte: O autor (2024). CN- Controle nega – Atividade antibiofilme bacteriano de H-2 contra *S. aureus* ATCC 25923; B - atividade antibiofilme bacteriano de H-2 contra *S. aureus* ATCC 700698; C - atividade antibiofilme bacteriano de H-2 contra *E. coli* ATCC 11303. *p < 0,05 em relação ao controle. **p < 0,01 em relação ao controle. ***p < 0,001 em relação ao controle. ****p < em relação ao controle.

Os resultados do ensaio de quantificação das células viáveis de *S. aureus* ATCC 25923, mostraram que a H-2 exibiu atividade redutora nas concentrações de 3,90, 7,8, 15,62, 31,25, 125 e 250 µg.mL⁻¹ (Figura 15A). Em relação a *S. aureus* 700698 foi observada redução nas concentrações de 3,90, 7,8, 15,62, 31,25, 125 e 250 µg.mL⁻¹ (Figura 15B). Os resultados também mostraram que para o tratamento do biofilme de *E. coli* ATCC 11303 com a lectina, houve efetivo poder de redução nas concentrações testadas de 3,90, 7,8, 15,62, 31,25, 125 e 250 µg.mL⁻¹ (Figura 15C).

Figura 15 - Número de células viáveis de *S. aureus* e *E. coli* com H-2



Fonte: O autor (2024). A – Quantificação de células viáveis de *S. aureus* ATCC 25923 contra H-2; B - Quantificação de células viáveis de *S. aureus* ATCC 700698 contra H-2; C - Quantificação de células viáveis de *E. coli* ATCC 11303 contra H-2. *p < 0,05 em relação ao controle. **p < 0,01 em relação ao controle. ***p < 0,001 em relação ao controle. ****p < em relação ao controle.

Fonseca e colaboradores (2022) relataram que as bactérias Gram-negativas possuem na sua membrana externa lipopolissacarídeos e peptidoglicanos e que as Gram-

positivas possuem peptideoglicanos.

A atividade antibacteriana de lectinas pode estar associada com a interação dos componentes presentes na parede celular bacteriana, que possui na sua constituição, em geral, lipopolissacarídeos, peptideoglicanos, ácidos teicóicos e teicurônico (Paiva *et al.*, 2010). Nossos resultados sugerem, provavelmente, que H-2 tem afinidade por esses glicanos visto que os dados obtidos do efeito da lectina contra as bactérias testadas no presente trabalhos.

Dados na literatura científica mostram que outras lectinas de esponjas marinhas também apresentaram essa capacidade de inibir o crescimento de biofilmes, como evidenciado com a ALL, a lectina isolada de *Aplysina lactuca*, que reduziu significativamente a biomassa de todos os biofilmes bacterianos testados, principalmente contra o biofilme de *E.coli* que mostrou redução em todas as concentrações da lectina testadas (Carneiro *et al.*, 2019).

Redução da biomassa de biofilme bacteriano também foi evidenciada com a lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, sendo capaz de reduzir significativamente a biomassa total dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* (Marques *et al.*, 2018), enquanto que a lectina isolada da esponja marinha *Haliclona implexiformis* (HIL) mostrou ser capaz de reduzir o biofilme de *S. aureus* nas maiores concentrações testadas (Andrade *et al.*, 2023).

Para a indústria farmacêutica, o processo de aglutinação bacteriana viria como uma alternativa para auxiliar na eliminação de bactérias no foco de infeccioso, visto que esse processo de aglutinação pode ajudar as células fagocíticas no processo de eliminação do agente infeccioso (Torrent *et al.*, 2012).

Do ponto de vista biotecnológico, o processo de seletividade da lectina por uma determinada bactéria, o processo de aglutinação bacteriana poderia vir como base para o desenvolvimento de biodispositivos para o combater bactérias. Os pesquisadores Gasmi, Ferré e Herreno (2017), desenvolveram um biossensor com especificidade a lipopolissacarídeo bacterianos (LPS), tendo como base a utilização de uma lectina na interface de reconhecimento. Esse biossensor foi capaz de identificar bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enterica* e *E. coli*.

4.8 Atividade antibacteriana da H-2 em associação a antibióticos

Com relação aos estudos realizados, do potencial antibacteriano da lectina na concentração de 125 µg/mL em associação com os antibióticos, oxacilina e tretaciclina, os

resultados obtidos no presente trabalho estão descritos na tabela 4.

No CIM individual da oxacilina foi observado que não houve redução considerada quando combinada com a lectina frente as cepas de bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698, e *E. coli* ATCC 11303, que apresentou CIM individual de 250 µg/mL, 128 µg/mL e 256 µg/mL, e quando associada com a lectina, esse valor dobrou para 0,5 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente para cada cepa testada. O antibiótico associado á lectina apresentou resultado antagônico para todas as cepas de bactérias testadas (tabela 5).

Quando a lectina foi associada com a tetraciclina foi observado efeito aditivo nas cepas de *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303. Para as cepas de *S. aureus* ATCC 700698, a tetraciclina apresentou CIM de valor individual igual 128 µg/mL, mas quando combinada com a proteína, esse valor foi de 64 µg/mL. Já para a bactéria Gram negativa *E. coli* ATCC 11303, o CIM individual da tetraciclina foi de 1 µg/mL, mas quando conjugada com a lectinas, esse valor foi de 0,5 µg/mL

O efeito da lectina em associação a tetraciclina foi intensificado contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, sendo observado efeito sinérgico. O antibiótico individual apresentou CIM de 0,250 µg/mL, mas quando conjugada com a lectina, esse valor foi reduzido em cerca de 4x, apresentando valor de 0,0625 µg/mL (tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da lectina H2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO			EFEITO	ANTIBIÓTICO			EFEITO
	Oxacilina				Tetraciclina			
CIM 1 µg/mL (individual)		CIM 2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs		CIM 1 µg/mL (individual)	CIM 2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,250	0,5	2	Antagônico	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 (2024). Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina H2, 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 H2 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.

Nos dias atuais, a problemática com as infecções bacterianas é considerada uma grande emergência global, visto que a resistência é ocasionada principalmente pela forma de adaptação dos microrganismos aos antibióticos e por conta do uso excessivo dessas drogas e pela falta de programas que visam o controle de infecções (Silva *et al.*, 2019). Assim, se faz necessária a realização de estudos que visam a bioprospecção de novas moléculas que sejam capazes de potencializar a eficácia dos antibióticos.

Por conta do uso desordenado dessas drogas, inúmeras cepas de microrganismos vêm se tornando resistente aos antibióticos disponíveis na indústria farmacêutica, ocasionado aumento nos casos de pessoas que vem a óbito por tal dano. Essa problemática tem feito com que pesquisadores busquem por estratégias complementares, incluindo a busca por agentes adjuvantes capazes de combater esses microrganismos.

Nesse cenário, podemos destacar a H-2, que potencializou a atividade antibacteriana quando associada ao antibiótico tetraciclina, contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923. Quando a H-2 foi combinada com a oxacilina, apresentou efeito antagônico contra todas as cepas bacterianas testadas, evidenciado que não houve interação. Já em combinação com a tetraciclina, apresentou efeito aditivo contra as cepas de *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303, mostrando que a combinação entre a proteína e o antibiótico teve apenas um leve aumento na inibição do antibiótico. Entretanto, com relação à combinação da H-2 com a tetraciclina, foi possível observar efeito sinérgico contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, através do aumento significativo na ação do antibiótico (tabela 4).

Até o presente momento, há relatos de três estudos sobre lectinas de esponjas marinhas associadas a algum antibiótico. A lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL), quando associada a tetraciclina, apresentou efeito aditivo contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* 35984 e *E. coli* 11303. Quando a ALL foi associada com a ampicilina apresentou efeito sinérgico para todas as cepas citadas acima (Duarte *et al.*, 2023).

O efeito da associação de antibióticos e lectinas também foi observado em estudos realizados com a lectina isolada da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL). A lectina apresentou efeito aditivo para as cepas de *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 quando foi associada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, respectivamente e apresentou efeito sinérgico contra as cepas bacterianas de *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* 11303. No CIM individual da ampicilina foi de 1000 µg.mL⁻¹ e quando combinada com a lectina diminuiu para 62,5 µg.mL⁻¹ para *S. epidermidis* ATCC 35984. Já o CIM

individual da tetraciclina era de 0,780, mas quando combinada com a lectina reduziu para 0,190 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a bactéria Gram negativa *E.coli* 11303 (Oliveira Neto, 2023).

Oton (2023), em estudos realizados com a ACL, lectina isolada da esponja marinha *Aplysina cauliformis*, observou que quando a lectina foi combinada com a tetraciclina, apresentou efeito sinérgico contra as cepas bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 35984, visto que inicialmente a tetraciclina apresentou CIM individual de 0,250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduzindo para 0,0625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Além disso, a lectina apresentou efeito aditivo quando combinada com tetraciclina contra as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* 11303, que inicialmente aparentou CIM individual de 128 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo reduzido para 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Quando ACL foi combinada com ampicilina, mostrou efeito sinérgico contra as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698, onde inicialmente possuía o CIM individual de 0,250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ambos foram reduzidos para 0,0625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Contudo, quando a ampicilina foi associada com a lectina ACL, foi constatado o efeito aditivo as cepas bacterianas de *S. epidermidis* ATCC 35984 e *E. coli* 11303, com CIM individual de 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde os CIM foram reduzidos para 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente

Existem estudos na literatura que descrevem o sinergismo de lectinas de vegetais associadas a fármacos antibacterianos. Por exemplo, a lectina de *Dioclea violacea* apresentou efeito sinérgico quando associada com gentamicina contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli* (Santos *et al.*, 2020). Já a lectina de *Parkia platycephala* (PPL), também apresentou efeito sinérgico contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli* (Silva *et al.*, 2019).

Alguns autores relatam que o aumento na atividade antibacteriana esteja associado a interação com o domínio de reconhecimento a carboidratos das lectinas, através do mecanismo da proteína de reconhecer carboidratos presente na parede celular da bactéria, facilitando assim a entrada do fármaco (Silva *et al.*, 2019). Contudo, ainda se fazem necessários outros estudos para uma melhor compreensão do mecanismo de ação das lectinas com os antibióticos.

5. CONCLUSÃO

Baseado no protocolo de Carneiro e colaboradores (2013) e com as modificações que foram feitas, a lectina 2 (H-2) foi purificada através de um novo método. O processo de purificação foi garantido utilizando a combinação de cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular. Aprofundamos a compreensão da especificidade da lectina, demonstrando sua inibição frente a glicoproteínas. A análise estrutural revelou que a lectina H-2 é uma proteína do tipo $\beta 1$, caracterizada por uma abundância de folhas beta.

Além disso, investigamos o potencial antimicrobiano da lectina. Nos ensaios antibiofilme, observamos uma significativa redução na massa de biofilme e aglutinação em três cepas bacterianas distintas. Notavelmente, a lectina H-2 demonstrou efeito sinérgico quando combinada com tetraciclina, evidenciando atividade potencial contra cepas de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos.

Esses resultados destacam a versatilidade da lectina H-2, não apenas como alvo de purificação eficiente, mas também como agente antimicrobiano promissor. Aprofundar a compreensão de suas propriedades estruturais e atividades biológicas pode fornecer insights valiosos para futuras aplicações terapêuticas e biotecnológicas. Este estudo contribui significativamente para o entendimento da biologia da lectina H-2 e abre perspectivas promissoras para sua utilização em aplicações práticas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GADER, A.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1630-1636, June 2011. *Bioinformatics*, 27, 1630 – 1636.
- ALMEIDA, Alexandra S. *et al.* Purification, biochemical characterization of a lectin from marine sponge *Ircinia strobilina* and its effect on the inhibition of bacterial biofilms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20220619, 2023.
- ANDRADE, Francisco *et al.* New lectin isolated from the tropical sponge *Haliclona* (*Reniera*) *implexiformis* (Hechtel, 1965) shows antibiofilm effect. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20220379, 2023.
- BI, Jingxiu *et al.* A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 103, p. 293-301, 2020.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, p. 248 - 254 , 1976.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2019.
- CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1368-1375, 2015.
- CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 662, p. 169-176, 2019.
- CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013b.
- CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 1, p. 51-58, 2013a.
- CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017b.

CARNEIRO, Rômulo Farias *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.

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine biotechnology**, v. 19, p. 49-64, 2017a.

CARNEIRO, R. F. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea***. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ČERNOCKÁ, Hana; ŘÍMÁNKOVÁ, Ludmila; OSTATNÁ, Veronika. Fetuin and asialofetuin at charged surfaces: Influence of sialic acid presence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 902, p. 115801, 2021.

CHAVES, R. P. *et al.* Structural study and antimicrobial and wound healing effects of lectin from *Solieria filiformis* (Kützinger) PW Gabrielson. **Biochimie**, [s.l.], v. 214, p. 61-76, 2023.

CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2010.

DE VOOGD, N.J. *et al.* (2023). *Haliclona (Soestella) caerulea* (Hechtel, 1965). In: WORLD PORIFERA DATABASE, [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.marineespecies.org/porifera.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=166641>. Acesso em: 02 ago.2023.

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

DRESCH, R. R. *et al.* Staining tumor cells with biotinylated ACL-I, a lectin isolated from the marine sponge, *Axinella corrugata*. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 88, n. 1, p. 1-9, 2013.

DRESCH, R. R. *et al.* Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 4, p. 365-370, 2012.

DUARTE, Philippe Lima *et al.* A fibrinogen-related Lectin from *Echinometra lucunter* represents a new FReP family in Echinodermata phylum. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 131, p. 150-159, 2022.

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.

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

ELUMALAI, Preetham *et al.* The role of lectins in finfish: a review. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 27, n. 2, p. 152-169, 2019.

FONSECA, Victor Juno Alencar *et al.* A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 195, p. 163-178, 2022.

GALIE, S. *et al.* Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

GASMI, L.; FERRÉ, J. F.; HERRERO, S. High bacterial agglutination activity in a single CRD C-Type lectin from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biosensors**, [s.l.], v. 7, n. 12, p. 1-9, 2017.

GAZAVE, E. *et al.* No longer Demospongiae: *Homoscleromorpha* formal nomination as a fourth class of Porifera. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 687, p. 3–10, 2012.

GOEL, Nikky *et al.* Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00613, 2021.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007.

GUNDACKER, D. *et al.* Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 21-29, 2001.

GUNDACKER, Dietmar *et al.* Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2001.

HAN, Qiao *et al.* Removal of foodborne pathogen biofilms by acidic electrolyzed water. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 988, 2017.

HASAN, Imtiaz; OZEKI, Yasuhiro. Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in *Halichondria okadai* (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 819-827, 2019.

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

KAWSAR, Sarkar MA *et al.* Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 4, p. 349-357, 2008.

KHAMENEH, Bahman *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 32-42, 2016.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l], v. 1572, p. 187-197, 2002.

KOHN, T. *et al.* Planctopirus ephydatiae, a novel Planctomycete isolated from a freshwater sponge. **Systematic and applied microbiology**, v. 43, n. 1, p. 126022, 2020.

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

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LEE, Joon-Hee. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 181-184, 2019.

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

LY, Bui Minh *et al.* Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, p. 32-38, 2018.

MANCUSO, Giuseppe *et al.* Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

MARQUES, Dayara Normando *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301, 2018.

MCMURRAY, S. E.; BLUM, James E.; PAWLIK, Joseph R. Redwood of the reef: growth and age of the giant barrel sponge *Xestospongia muta* in the Florida Keys. **Marine Biology**, v. 155, p. 159-171, 2008.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H. F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 955-962, 1985.

MEDEIROS, Danielle S. *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MIDHA, Ankur *et al.* The intestinal roundworm *Ascaris suum* releases antimicrobial factors which interfere with bacterial growth and biofilm formation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 271, 2018.

MOTOHASHI, Shoko *et al.* Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the sea hare *Aplysia kurodai*. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 161, 2017.

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.

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

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NASCIMENTO-NETO, Luiz G. *et al.* Halilectin-3, a lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*, induces apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF7 cells through caspase-9 pathway and LC3-II protein expression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 18, n. 4, p. 521-528, 2018.

OGAWA, T., WATANABE, M., NAGANUMA, T.; MURAMOTO, K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. **Journal of Amino Acids**, [s.l.], 2011.

OLIVEIRA NETO, José Eduardo de. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva***. 2023. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 11 de julho de 2023.

OTON, Levi. **Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos**. 2023. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 07 de julho de 2023.

PAIVA, Patrícia MG *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 396-406, 2010.

PAJIC, Ivana *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 2, p. 213-221, 2002.

PECHENIK, J.A. **Biologia dos Invertebrados** 7ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2016.

RADHAKRISHNAN, Akshaya *et al.* Back2Basics: animal lectins: an insight into a highly versatile recognition protein. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 14, n. 1, p. 43-59, 2023.

RATHEESH, S. *et al.* Screening of antifungal activity of a lectin isolated from marine sponge *Axinella donnani*. **Trends in Biosciences**, v. 11, n. 7, p. 1174-1176, 2018.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 7.ed. Roca Editora, São Paulo, 168p, 2005.

SADANANDAN, Ratheesh; RAUF, Arun A. antifungal and insecticidal activity of a lectin isolated from marine sponge *Fasciospongia Cavernosa*. **Journal of Advances in Biological Science**, v. 8, n. 1, 2021.

SADANANDAN, Ratheesh; RAUF, Arun A. Effect of denaturing agents on a lectin isolated from marine sponge *Axinella donnani* and its potential cytotoxic activity. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 14, n. 2, p. 312-319, 2022.

SAITO, Tetsu *et al.* A Novel Type of limulus Lectin-L6. purification, primary structure, and antibacterial activity*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 24, p. 14493-14499, 1995.

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

SANTOS, Valdenice 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.

SCHRÖDER, Heinz C. *et al.* Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32810-32817, 2003.

SILVA, André Felipe Bispo da *et al.* **Taxonomia do gênero Haliclona** Grant, 1835 (Demospongiae: Haploclerida: Chalinidade) do Brasil. 2015.

SILVA, Romerio RS *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, p. 103629, 2019.

SOUSA, A.R.d.O., *et al.*, Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 2021.

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

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

TORRENT, M. *et al.*, Exploring new biological functions of amyloids: bacteria cell agglutination mediated by host protein aggregation. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2012.

UTARABHAND, Prapaporn *et al.* Sialic acid-specific lectin participates in an immune response and ovarian development of the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, p. 132-140, 2017.

VASCONCELOS, Mayron Alves *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. In: Vasta, G.; AHMED, H. (ed). **Animal Lectins: a functional view**. Boca Raton: CRC Presse, 2008. P. 2-10.

VASTA, G.R.; WANG, J.X. Galectin-mediated immune recognition: Opsonic roles with contrasting outcomes in selected shrimp and bivalve mollusk species. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l]. p. 103721, 2020.

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

WEERDT, Wallie H. Family Chalinidae Gray, 1867. **Systema Porifera: a guide. to the classification of sponges**, p. 852-873, 2002.

WEIS, W.I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W.A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, [s.l]. v. 254, n. 5038, p. 1608-1615, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ten Threats to Global Health in 2019**. Available online: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em: 18 dez. 2020.

YIN, Xiaoxue *et al.* Identification and characterization of a B-type mannose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 91-99, 2019.