



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

**LEVI FERREIRA OTON**

**PRIMEIRO RELATO DE UMA LECTINA RELACIONADA AO FIBRINO GÊNIO  
EM ESPONJAS MARINHAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL  
E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE *Aplysina  
cauliformis* (CARTER, 1822)**

**FORTALEZA**

**2026**

LEVI FERREIRA OTON

PRIMEIRO RELATO DE UMA LECTINA RELACIONADA AO FIBRINOGENIO EM  
ESPONJAS MARINHAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE *Aplysina cauliformis*  
(CARTER, 1822)

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

Orientador: Prof. PhD. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2026

LEVI FERREIRA OTON

PRIMEIRO RELATO DE UMA LECTINA RELACIONADA AO FIBRINOGENIO EM  
ESPONJAS MARINHAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE *Aplysina cauliformis*  
(CARTER, 1822)

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

Aprovada em: 29/01/2026

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. PhD. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Regivânio Nascimento Andrade

Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões

Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força e convicção para concluir a tarefa que me foi confiada, obrigado por me guiar sem hesitar através de muitos obstáculos em meu caminho e por me manter determinado quando as coisas ao meu redor pareciam improváveis, agradeço sua proteção e seus sinais ao longo do caminho.

Aos meus pais Oton e Jucilene, por serem sempre pacientes comigo, me guiarem com sabedoria do Senhor em minha trajetória, por me apoiarem em minhas decisões e por me ensinarem a nunca desistir dos meus objetivos, me ensinando a buscar o que realmente importa. Agradeço também os conselhos e orientações direcionados a mim, especificamente nessa jornada, que me livraram de tantas coisas.

À minha irmã Laís, pela sua companhia, união, e apoio em inúmeros momentos em minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro no desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar Lab do Departamento de Engenharia de Pesca e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia Marinha – INCT BioMar, pela infraestrutura oferecida para a realização do trabalho.

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

Ao Curso de Pós Graduação em Engenharia de Pesca (PPGEP) da Universidade Federal do Ceará e ao corpo docente que colaboraram com a minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre Sampaio, por me aceitar no laboratório no princípio da minha trajetória na Engenharia de Pesca, por corrigir meus erros e elogiar meus acertos durante todos esses anos. Muito obrigado por ser uma grande pessoa com quem pude aprender inúmeras coisas que foram decisivas em minha vida.

Ao meu coorientador, Dr. Rômulo Farias Carneiro, a quem carrego uma profunda gratidão por me ajudar em inúmeras vezes e em vários setores da minha vida desde o meu começo no laboratório, faltam palavras pra descrever o impacto positivo que o senhor teve em minha jornada. Obrigado pela proposta de realizar esse trabalho e pela ajuda que sem a qual esse trabalho não seria possível. Foi uma honra chefia.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves por toda ajuda prestada para realização desse trabalho, pelas orientações, conhecimento compartilhado e pelas correções.

Ao Dr. Regivânio por toda ajuda durante esses 6 anos e meio, desde a graduação até aqui, pelos conselhos e ensinamentos, que foram significantes para a realização de inúmeros trabalhos práticos e teóricos do laboratório. Além de aceitar participar da banca avaliadora.

Ao professor Rafael Simões por aceitar fazer parte da banca avaliadora.

Aos professores do PPGEP em especial à professora Dra. Silvana Saker Sampaio e à professora Dra. Gleire Rodrigues. Obrigado por todo ensinamento, pelas conversas descontraídas e por me ajudarem em minha formação como pessoa.

Agradeço aos membros do colegiado do PPGEP por confiarem a mim uma tarefa ímpar de poder compartilhar com o Programa. Pra mim foi uma honra e um prazer imenso participar como representante discente, ao lado de pessoas extraordinárias.

Ao Gabriel pela ajuda com os ensaios antibiofilme além da Tatiane e Paula na contagem de células e quantificação da biomassa.

Aos meus colegas do INCT BioMar Lara, Bruna, Manoel, Nicole, Vinicius, tia Cátia, Tatiane, Kelva. Obrigado pelas conversas, momentos de descontração, risadas e companheirismo que me ajudaram a enxergar o trabalho com mais leveza e tranquilidade, além da ajuda com o trabalho em si.

E aos meus amigos Simeão, Matheus Viana e Sulamita, por vocês carregarem enorme carinho, respeito e admiração.

“Combati o bom combate, completei a carreira,  
gardei a fé.”

(2 Timóteo 4:7)

## RESUMO

As esponjas marinhas são invertebrados sésseis reconhecidos pela produção de um vasto arsenal químico com propriedades biotecnológicas, destacando-se as lectinas por suas atividades antimicrobianas, anticancerígenas e imunomoduladoras. Recentemente, estudos com a lectina AcL (*Aplysina cauliformis*) revelaram efeitos sinérgicos com antibióticos, evidenciando a necessidade de uma caracterização bioquímica e estrutural aprofundada, bem como da avaliação de seu potencial contra biofilmes bacterianos. O presente trabalho teve como objetivo isolar, purificar e caracterizar bioquímica e funcionalmente a AcL, determinando sua estrutura primária e terciária, além de seus parâmetros termodinâmicos de interação e potencial antibiofilme. Os resultados revelaram que a AcL apresenta uma massa molecular de aproximadamente 35 kDa em condições redutoras e 66 kDa em condições não redutoras, sugerindo uma organização dimérica estabilizada por pontes dissulfeto. As análises de DLS confirmaram que a proteína se encontra predominantemente em um estado dimérico estável em solução, com diâmetro hidrodinâmico entre 7 e 8 nm. O sequenciamento de aminoácidos identificou 13 peptídeos (40% de cobertura da sequência genômica), revelando que a AcL possui 320 resíduos e caracteriza-se como o primeiro relato de uma lectina de esponja marinha contendo um domínio relacionado ao fibrinogênio (FReD). A modelagem tridimensional demonstrou uma arquitetura inédita para poríferos, composta por um domínio fibrilar N-terminal (alfa-hélice longa) e um domínio C-terminal do tipo *beta-sandwich*. Nos ensaios de ITC, a AcL demonstrou alta afinidade pela glicoproteína PSM (KD = 134 nM), com a interação sendo dirigida majoritariamente por efeitos entrópicos. No que tange à atividade antibiofilme, a AcL inibiu fortemente a formação de biomassa em todas as cepas testadas, com reduções superiores a 80% para *S. aureus* em concentrações a partir de 125 µg/mL, além de inibição significativa (acima de 50%) para *S. epidermidis* e um efeito dose-dependente contra *E. coli*. Embora não tenha ocorrido uma redução drástica na contagem de células viáveis na maioria das concentrações, a eficácia na desestabilização da biomassa do biofilme foi contundente. Conclui-se que a AcL inaugura uma nova classe de lectinas no filo Porifera, posicionando-se como uma molécula promissora para o desenvolvimento de estratégias anti-virulência e biotecnologia marinha.

**Palavras-chave:** Lectinas; esponja marinha; atividade antibiofilme; biotecnologia marinha.

## ABSTRACT

Marine sponges are sessile invertebrates recognized for producing a vast chemical arsenal with biotechnological properties, with lectins standing out for their antimicrobial, anticancer, and immunomodulatory activities. Recently, studies with the lectin AcL (*Aplysina cauliformis*) revealed synergistic effects with antibiotics, highlighting the need for an in-depth biochemical and structural characterization, as well as an evaluation of its potential against bacterial biofilms. The present study aimed to isolate, purify, and biochemically and functionally characterize AcL, determining its primary and tertiary structures, as well as its interaction thermodynamic parameters and antibiofilm potential. The results revealed that AcL presents a molecular mass of approximately 35 kDa under reducing conditions and 66 kDa under non-reducing conditions, suggesting a dimeric organization stabilized by disulfide bonds. DLS analyses confirmed that the protein is predominantly in a stable dimeric state in solution, with a hydrodynamic diameter between 7 and 8 nm. Amino acid sequencing identified 13 peptides (40% coverage of the genomic sequence), revealing that AcL has 320 residues and is characterized as the first report of a marine sponge lectin containing a fibrinogen-related domain (FReD). Three-dimensional modeling demonstrated an unprecedented architecture for poriferans, composed of an N-terminal fibrillar domain (long alpha-helix) and a C-terminal beta-sandwich domain. In ITC assays, AcL demonstrated high affinity for the PSM glycoprotein ( $K_D = 134$  nM), with the interaction being driven mostly by entropic effects. Regarding antibiofilm activity, AcL strongly inhibited biomass formation in all tested strains, with reductions exceeding 80% for *S. aureus* at concentrations starting from 125  $\mu\text{g/mL}$ , in addition to significant inhibition (over 50%) for *S. epidermidis* and a dose-dependent effect against *E. coli*. Although there was no drastic reduction in the count of viable cells at most concentrations, the effectiveness in destabilizing the biofilm biomass was compelling. It is concluded that AcL inaugurates a new class of lectins in the phylum Porifera, positioning itself as a promising molecule for the development of anti-virulence strategies and marine biotechnology.

**Keywords:** Lectins; marine sponge; antibiofilm activity; marine biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Morfologia geral de esponjas e principais estruturas destacadas.....	14
Figura 2	– Arquitetura corporal de esponjas marinhas.....	15
Figura 3	– Subdivisões de galectinas com base em seus DRCs.....	23
Figura 4	– Esponja <i>Aplysina cauliformis</i> .....	28
Figura 5	– Representação da formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em uma superfície abiótica.....	31
Figura 6	– Distribuição de tamanhos hidrodinâmicos da lectina AcL obtida por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	42
Figura 7	– Mapa peptídico da lectina AcL obtido por MS/MS.....	45
Figura 8	– Análise de similaridade por HHpred da lectina AcL.....	47
Figura 9	– Predição estrutural da lectina AcL realizada no Phyre2.2.....	48
Figura 10	– Modelo tridimensional predito para AcL pelo AlphaFold.....	49
Figura 11	– Análise da interação entre AcL e PSM por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	52
Figura 12	– Signature Plot da interação AcL–PSM obtido por ITC.....	53
Figura 13	– Efeito de AcL na formação de biofilme e contagem de células viáveis.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais marcos de pesquisa sobre lectinas. ....	20
Tabela 2 - Ensaio de inibição de atividade hemaglutinante de AcL. ....	29
Tabela 3 - Peptídeos derivados de AcL. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASGP-R	Receptor de Asialoglicoproteína
ATCC	American Type Culture Collection
CTLD	C-type Lectin Like Domain
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
FRED	Fibrinogen-Related Domain
FREP	Fibrinogen-Related Protein
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
MNPs	Marine Natural Products
MPL	Myeloproliferative Leukemia Protein
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tris Buffered Saline

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Esponjas Marinhas</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Produtos naturais derivados de esponjas</b> .....	16
<b>1.3</b>	<b>Lectinas</b> .....	18
<b>1.4</b>	<b>Lectinas Animais</b> .....	20
<b>1.5</b>	<b>Lectinas de poríferos</b> .....	21
<b>1.5.1</b>	<i>Lectinas relacionadas ao fibrinogênio</i> .....	24
<b>1.5.2</b>	<i>Potencial biotecnológico de lectinas de esponjas</i> .....	25
<b>1.5.3</b>	<i>Lectina de <i>Aplysina cauliformis</i></i> .....	27
<b>1.6</b>	<b>Bactéria e biofilme</b> .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	33
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Coleta dos animais</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Preparação do extrato proteico</b> .....	34
<b>3.3</b>	<b>Purificação da lectina</b> .....	34
<b>3.4</b>	<b>Avaliação da pureza da lectina</b> .....	35
<b>3.5</b>	<b>Espalhamento Dinâmico da Luz – DLS</b> .....	35
<b>3.6</b>	<b>Digestão, separação de peptídeos e sequenciamento</b> .....	36
<b>3.7</b>	<b>Análise de Bioinformática</b> .....	37
<b>3.8</b>	<b>Modelagem</b> .....	37
<b>3.9</b>	<b>Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC</b> .....	38
<b>3.10</b>	<b>Avaliação do potencial antibiofilme</b> .....	39
<b>3.10.1</b>	<i>Cepas bacteriana e condições de cultura</i> .....	39
<b>3.10.2</b>	<i>Avaliação da formação de biofilme</i> .....	39
<b>3.10.2.1</b>	<i>Quantificação da biomassa do biofilme</i> .....	39
<b>3.10.2.2</b>	<i>Determinação da viabilidade celular no biofilme</i> .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>4.1</b>	<b>Purificação</b> .....	41
<b>4.2</b>	<b>Dispersão Dinâmica de Luz – DLS</b> .....	41

<b>4.3</b>	<b>Determinação da estrutura primária.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise de Bioinformática.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Predição estrutural de AcL.....</b>	<b>47</b>
<b>4.6</b>	<b>Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....</b>	<b>51</b>
<b>4.7</b>	<b>Efeito de AcL na formação de biofilmes bacterianos e contagem de células viáveis.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

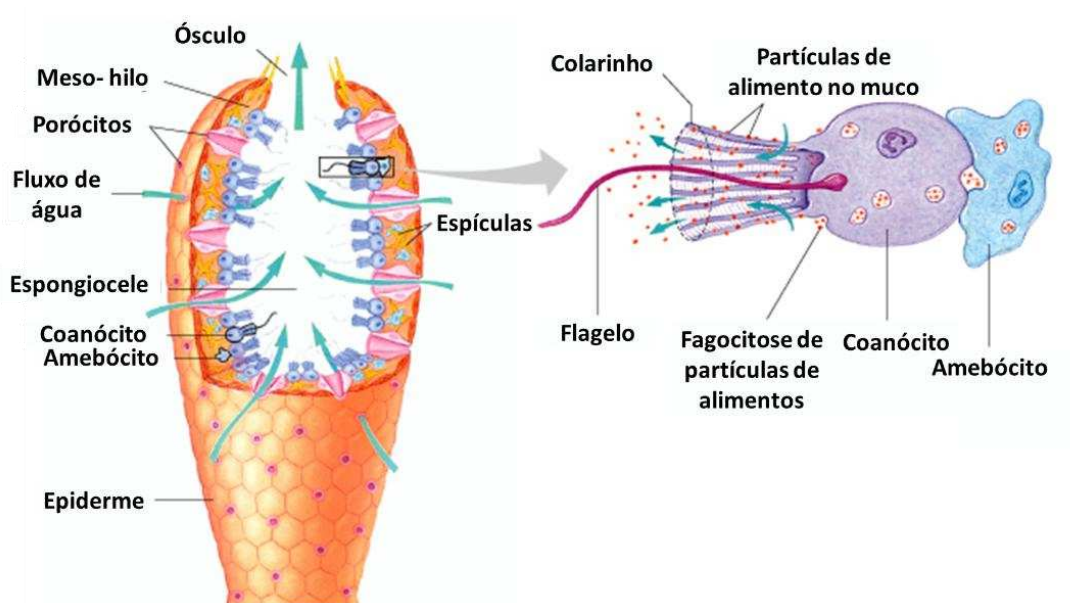
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esponjas marinhas

As esponjas marinhas são invertebrados considerados primitivos, mas que exercem um papel ecológico fundamental nos ecossistemas aquáticos. São animais sésseis, fixos ao substrato, e apresentam um corpo poroso adaptado à filtração de grandes volumes de água. Essa capacidade faz com que atuem na manutenção da qualidade da água e na ciclagem de nutrientes em ambientes marinhos (Brusca *et al.*, 2018; Lavrov *et al.*, 2023).

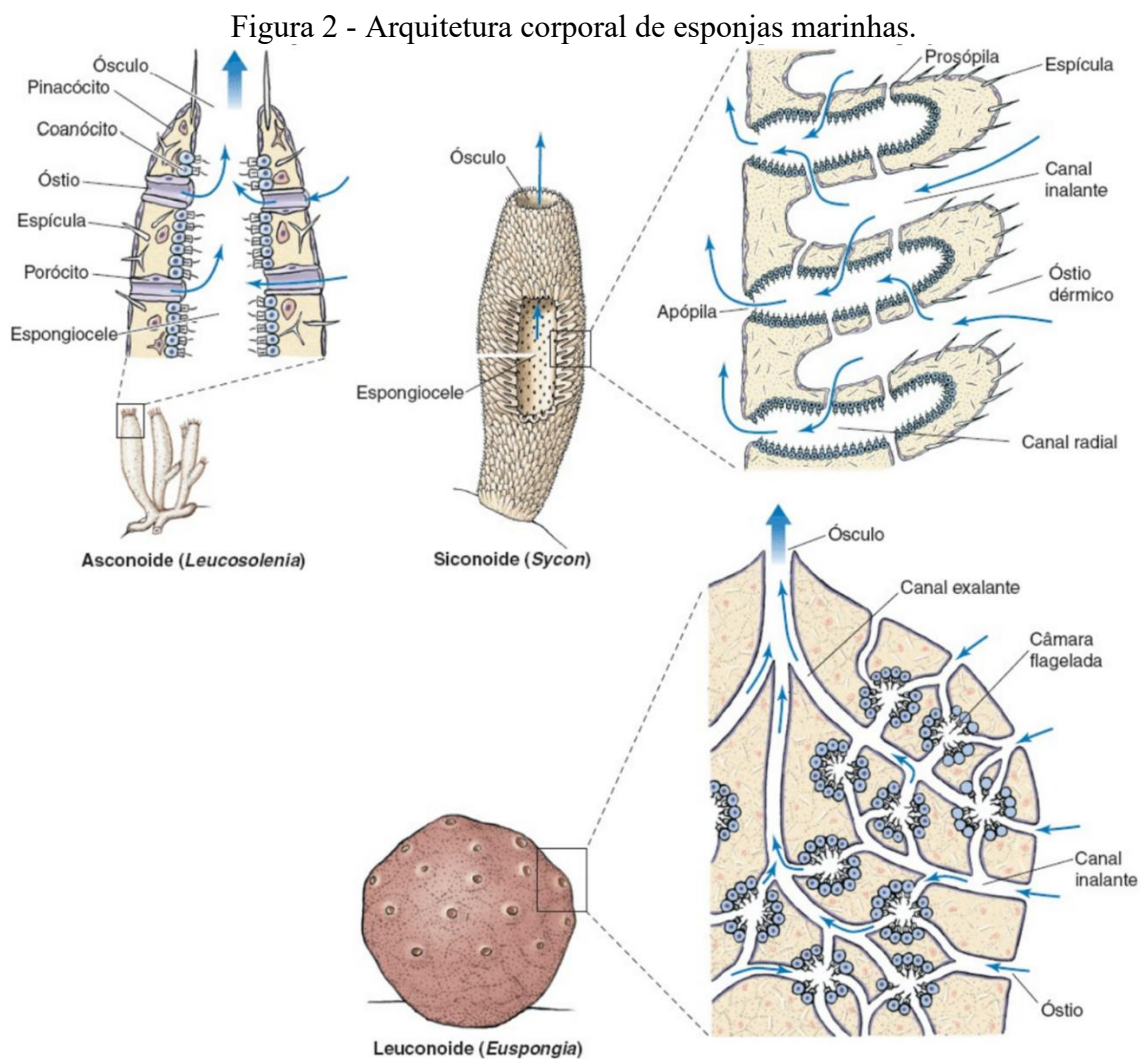
Morfologicamente, as esponjas apresentam um sistema de canais e câmaras internas que permite a circulação contínua da água (Figura 1). Esse sistema é revestido por coanócitos, células flageladas especializadas na geração de fluxo hídrico e na captura de partículas alimentares. O corpo é preenchido por uma matriz gelatinosa denominada meso-hilo, onde se encontram diferentes tipos celulares e elementos estruturais, como espículas de calcário ou sílica e fibras de espongina. Esses componentes conferem sustentação ao organismo e compõem um esqueleto interno ou externo, a depender da espécie (Brusca *et al.*, 2018).

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



Fonte: Adaptado de Zoology2014underdahl, 2026.

As esponjas podem apresentar três padrões básicos de organização corporal: asconóide, siconóide e leuconóide (Figura 2). No tipo asconóide, considerado o mais simples, a água flui diretamente pelos poros para uma cavidade central (espongiocela), onde ocorre a filtração. No padrão siconóide, a parede do corpo é mais espessa e apresenta canais radiais revestidos por coanócitos, aumentando a superfície de filtração. Já no tipo leuconóide, encontrado na maioria das esponjas atuais, a estrutura é altamente ramificada, com câmaras internas revestidas por coanócitos, o que maximiza a eficiência da filtração (Brusca *et al.*, 2018).



Fonte: Hickman *et al.*, 2016.

De acordo com características do esqueleto, tipo celular e organização corporal, as esponjas são classificadas em quatro classes: Homoscleromorpha, Hexactinellida, Demospongiae e Calcarea (Lavrov *et al.*, 2023).

A classe Homoscleromorpha inclui esponjas exclusivamente marinhas, com espículas silicosas simples ou ausentes, pinacócitos flagelados e uma membrana basal bem definida. São frequentemente encontradas em ambientes escuros, como cavernas e substratos coralígenos (Ereskovsky & Lavrov, 2021; Rossi *et al.*, 2024; Van Soest *et al.*, 2012).

As esponjas da classe Hexactinellida, ou esponjas de vidro, ocorrem predominantemente em águas profundas e possuem espículas silicosas com simetria hexactinal (seis raios). Seu corpo é sincicial, formado por uma única célula multinucleada, o que as distingue funcionalmente das demais classes (Del Mouro *et al.*, 2024; Ereskovsky & Lavrov, 2021; Rossi *et al.*, 2024; Van Soest *et al.*, 2012).

A classe Calcarea inclui esponjas com espículas de carbonato de cálcio, geralmente presentes em águas rasas. Podem apresentar diferentes graus de complexidade no sistema aquífero (Ereskovsky & Lavrov, 2021; Rossi *et al.*, 2024; Van Soest *et al.*, 2012).

Por fim, a divisão Demospongiae representa a maior diversidade dentro do filo, abrangendo cerca de 90% das espécies conhecidas. Essas esponjas possuem espículas silicosas de variadas morfologias e/ou fibras de espongina, podendo habitar tanto ambientes marinhos quanto dulcícolas. As espículas são frequentemente divididas em megascleras e microscleras, com funções estruturais e de defesa (Ereskovsky & Lavrov, 2021; Rossi *et al.*, 2024; Van Soest *et al.*, 2012).

## **1.2 Produtos naturais derivados de esponjas**

As esponjas marinhas são verdadeiros tesouros da biodiversidade, destacando-se pelo vasto potencial bioquímico de seus compostos. Tais moléculas, muitas vezes únicas e estruturalmente complexas, têm atraído grande interesse científico devido às suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antimicrobianas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antivirais (Anjum *et al.*, 2016).

As esponjas marinhas são invertebrados sésseis e desprovidos de sistema imunológico inato ou estruturas físicas de defesa, como espinhos ou conchas. Em consequência, sua principal estratégia de proteção baseia-se na síntese de compostos, que desempenham papel na defesa química contra predadores, microrganismos patogênicos e na competição por espaço no ambiente marinho. Além de sua função ecológica, esses compostos apresentam grande diversidade estrutural e potencial biotecnológico, sendo amplamente investigados para aplicações farmacológicas (Lira, 2007; Lacerda, 2015; Mehbub *et al.*, 2024).

Aproximadamente 30% dos produtos naturais marinhos (MNPs, do inglês *Marine Natural Products*) identificados até o momento são derivados de esponjas, com destaque para aqueles que exibem propriedades anticancerígenas. Entre os principais grupos químicos encontrados nessas substâncias bioativas, destacam-se alcaloides, esteróis, terpenoides, macrolídeos, policetonas, glicosídeos, quinonas e proteínas (Barzkar *et al.*, 2024; Maarisit *et al.*, 2024; Mehbub *et al.*, 2024).

A atividade anticancerígena desses compostos pode ser atribuída à sua capacidade de modular processos celulares e moleculares essenciais, incluindo a regulação do ciclo celular, indução de apoptose e controle da resposta inflamatória. Essas características fazem das esponjas marinhas uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, reforçando sua relevância na biotecnologia aplicada à descoberta de fármacos inovadores (Mehbub *et al.*, 2024).

Esponjas marinhas como *Halichondria panicea* e *Dendrilla nigra*, são capazes de produzir compostos bioativos, incluindo mayamicina e nocapironas, que exibem potentes atividades antibacterianas e anticancerígenas. Além disso, actinomicetos associados a esponjas, como *Nocardiosis dassonvillei*, destacam-se pela biossíntese de substâncias com propriedades terapêuticas significativas, demonstrando eficácia no combate a patógenos de relevância médica, como *Mycobacterium tuberculosis* (agente causador da tuberculose), o vírus HIV e o *Plasmodium* spp. (protozoário responsável pela malária) (Mehbub *et al.*, 2024; Schneemann *et al.*, 2010a; Schneemann *et al.*, 2010b; Selvin *et al.*, 2010).

Um estudo conduzido por Debitus e colaboradores (1998) investigou a atividade antibacteriana de metabólitos secundários isolados da esponja *Suberea creba*, coletada no Mar de Coral. A pesquisa revelou a presença de quinolonas derivadas de uma bactéria simbiote, além de metabólitos derivados da tirosina produzidos pelo organismo hospedeiro. Os compostos isolados demonstraram significativas propriedades antimicrobianas, sugerindo um papel na defesa química da esponja contra microrganismos patogênicos (Mehbub *et al.*, 2024).

Os achados destacam a importância desses organismos como uma fonte promissora de moléculas bioativas com potencial aplicação no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Além disso, o estudo destaca a complexa relação entre esponjas marinhas e seus microrganismos associados, evidenciando a relevância da simbiose na produção de compostos com atividade farmacológica (Debitus *et al.*, 1998; Mehbub *et al.*, 2024).

Diante da imensa aplicabilidade de metabólitos de origem marinha, os avanços recentes na biotecnologia marinha e na química medicinal têm impulsionado o isolamento e a síntese desses compostos bioativos. Esse progresso tem permitido explorar ainda mais o

potencial terapêutico das esponjas marinhas, ampliando suas aplicações na indústria farmacêutica e biomédica. A exploração contínua desses organismos amplia a visão de seu papel como fontes inovadoras de novos agentes remediadores (Carroll *et al.*, 2020; Carroll *et al.*, 2021; Carroll *et al.*, 2022; Carroll *et al.*, 2023).

Entre as moléculas extraídas de esponjas podem-se destacar as lectinas, que recebem notoriedade pelo seu potencial biotecnológico e farmacológico, apresentando atividades anticâncer, antibacterianas, antivirais, antifúngico, antihiperlipidêmica, efeitos leishmanicida e imunomoduladoras (Adewole *et al.*, 2024; Bala Subramaniyan; Veerappan, 2024; Gardères *et al.*, 2015; Grangeiro *et al.*, 2024; Kawsar *et al.*, 2010; Samant *et al.*, 2025; Santi Martignago *et al.*, 2025; Mohapatra *et al.*, 2024; Simha N. *et al.*, 2024; Singh *et al.*, 2024). Como agentes antibacterianos essas moléculas podem atuar como alternativas aos antibióticos, auxiliando no combate a infecções e na regulação de respostas imunes, o que amplia suas aplicações em terapias inovadoras (Duarte *et al.*, 2023; Carneiro *et al.*, 2024; Torres *et al.*, 2025).

### 1.3 Lectinas

Ao longo da história, as proteínas ligantes de carboidratos receberam diferentes denominações, como hemaglutininas ou aglutininas. Essas variações refletiram o avanço gradual do conhecimento sobre sua estrutura e função dessas proteínas. Com o tempo, consolidou-se o termo "lectina" para designar tais moléculas, na medida em que estudos aprofundados permitiram a definição de suas propriedades de reconhecimento específico de carboidratos e sua participação em diversos processos biológicos (Vasta; Ahmed, 2009).

O primeiro relato de uma proteína com capacidade de aglutinar hemácias foi feito por Hermann Stillmark em 1888, ao descrever uma fito-hemaglutinina isolada de sementes de *Ricinus communis* (mamona) (Ocadiz, 2023; Sol *et al.*, 2006; Vasta; Ahmed, 2009). Posteriormente, em 1936, foi sugerido que a hemaglutinação induzida pela concavalina A (Con A), extraída de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), ocorria devido à interação da proteína com carboidratos presentes na superfície das hemácias (Sumner; Howell, 1936).

O termo "lectina" foi formalmente introduzido por Boyd e Shapleigh em 1954, derivado do latim *legere*, que significa "escolher" ou "selecionar", em referência à capacidade dessas proteínas de reconhecer e se ligar seletivamente a resíduos de carboidratos específicos (Boyd; Shapleigh, 1954).

Mais de uma década após a introdução do termo lectina, Agrawal e Goldstein (1965) impulsionaram os estudos na área ao aplicar a cromatografia de afinidade como método de purificação. Utilizando colunas de Sephadex, um polímero de glicose, e eluindo as proteínas com soluções de D-glicose, os autores estabeleceram uma técnica eficaz para o isolamento de lectinas, o que viabilizou avanços significativos em sua caracterização (Vasta; Ahmed, 2009).

Durante a década de 1970, foram realizados os primeiros estudos de sequenciamento de aminoácidos de uma lectina, a concavalina A (Con A), além da determinação de sua estrutura tridimensional (Hardman; Ainsworth, 1972; Edelman *et al.*, 1972). Esses avanços estruturais contribuíram para o entendimento da especificidade de ligação e do mecanismo de reconhecimento molecular dessas proteínas.

No final da década de 1980, Barondes (1988) propôs uma definição funcional para lectinas como proteínas capazes de se ligar a carboidratos de forma específica e reversível, excluindo enzimas e anticorpos de sua classificação. Essa definição buscava abranger proteínas como a haveína, que se liga a carboidratos sem, no entanto, induzir aglutinação celular.

Um dos critérios fundamentais para a classificação de lectinas é a ausência de atividade enzimática. Por isso, diferenciam-se de enzimas que atuam sobre carboidratos, como glicosiltransferases e glicosil-hidrolases, cujo papel envolve reações catalíticas (Coninck *et al.*, 2021; Ocádiz, 2023; Sol *et al.*, 2006; Warkentin; Kwan, 2021).

Em 1995, Peumans e Van Damme propuseram uma definição mais precisa: lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um sítio de ligação não catalítico capaz de reconhecer carboidratos de forma reversível, sem modificá-los quimicamente (Peumans; Van Damme, 1995). Essa definição é amplamente aceita atualmente, embora se aplique com maior precisão às lectinas de origem vegetal. No caso de lectinas animais, a participação em mecanismos imunes pode contrariar o critério de origem “não imune”, como observado por Kilpatrick (2000).

A Tabela 1 resume os principais marcos históricos no estudo de lectinas.

Tabela 1 - Principais marcos de pesquisa sobre lectinas.

Ano	DESCOBERTA OU AVANÇO
1860	Descoberta de aglutinina encontrada em veneno de cascavel por Weir Mitchell.
1888	Descrição da primeira fitoaglutinina (ricina) por Herman Stillmark.
1899	Descrição de lectina animal da glândula albumina do caracol <i>Helix pomatia</i> por Camus.
1936	Primeira sugestão de que os carboidratos na superfície de glóbulos vermelhos podem ser os ligantes para a hemaglutinação induzida por concavalina A por Sumner e Howell.
1947	Descrição da especificidade do grupo sanguíneo de certas hemaglutininas (Boyd e Renkonen).
1952	Descoberta da natureza dos carboidratos da substância do grupo sanguíneo H por Walter e Watkins pelo uso da aglutinina de enguia.
1954	Boyd e Shapleigh introduziram o termo “lectina” (do latim legere, selecionar ou escolher).
1965	Agarwal e Goldstein introduziram a cromatografia de afinidade para o isolamento de lectinas.
1972	Primeira lectina concanavalina A, cuja estrutura primária e estrutura tridimensional foi elucidada (G.M. Edelman, K.D. Hardman e C.F. Ainsworth).
1974	Isolamento da primeira lectina hepática de mamíferos, conhecida como receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R), a partir de fígado de coelho (Ashwell e Morell).
1988	Barondes definiu lectina como uma proteína que se liga a carboidratos, diferente de um anticorpo ou enzima.
1990	Descoberta da estrutura do gene que codifica a concanavalina A de <i>Canavalia gladiata</i> e sua expressão em células de <i>Escherichia coli</i> (Yamauchi e Minamikawa).
1995	Definição de lectinas vegetais como proteína ou glicoproteína de origem não imune atribuída de pelo menos um sítio de ligação não catalítico (Peumans e Van Damme).

Fonte: Adaptado de Mitchell, 1860; Vasta; Ahmed, 2009 Yamauchi; Minamikawa, 1990.

#### 1.4 Lectinas Animais

As lectinas de origem animal também possuem um histórico relevante na pesquisa científica, marcado por descobertas que contribuíram para o entendimento de suas funções biológicas. Um dos primeiros indícios foi descrito por Weir Mitchell, em 1860, ao observar propriedades hemaglutinantes no sangue exposto ao veneno da cascavel *Crotalus durissus*,

sugerindo a presença de proteínas com capacidade de ligação a carboidratos (Mitchell, 1860). Ainda no século XIX, foi descrita uma lectina na glândula salivar do molusco *Helix pomatia*, ampliando a evidência de lectinas em invertebrados (Camus, 1899).

No início do século XX, Flexner e Noguchi (1902) relataram a presença de hemaglutininas em venenos de diferentes espécies de serpentes. Pouco depois, Cantacuzene (1912) identificou aglutininas na hemolinfa do caranguejo-eremita *Eupagurus prideauxii*, levantando pela primeira vez a hipótese de que as lectinas em animais poderiam atuar como elementos do sistema imune inato, em contraste com as lectinas vegetais, tradicionalmente consideradas de origem não imune.

Outro marco importante foi o estudo de Watkins e Morgan (1952), que utilizaram lectinas de enguia para demonstrar a natureza glicídica dos antígenos do grupo sanguíneo H, consolidando o papel dessas proteínas no reconhecimento de glicoconjugados em sistemas biológicos. Já na década de 1970, Ashwell e Morell (1974) isolaram a primeira lectina hepática animal, o receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R), no fígado de coelhos. Essa lectina é responsável por remover glicoproteínas envelhecidas da circulação, sendo o primeiro exemplo de um receptor lectínico funcional em mamíferos.

Atualmente, reconhece-se que lectinas animais estão amplamente distribuídas em diferentes filos e desempenham funções diversas, especialmente no reconhecimento de padrões moleculares e na modulação de respostas imunes. Sua diversidade estrutural e alta especificidade na interação com carboidratos tornam essas proteínas valiosas para aplicações biotecnológicas, incluindo diagnóstico, terapias direcionadas, engenharia de tecidos e desenvolvimento de biomarcadores (Bektas; Kaptan, 2024; Brooks, 2024; Castelão, 2017; Cunha, 2014; Grangeiro *et al.*, 2024; Jeyachandran *et al.*, 2024; Kim *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2025).

### **1.5 Lectinas de poríferos**

O primeiro estudo de isolamento de lectinas em poríferos foi conduzido por Bretting e Kabat em 1976, que descreveram a purificação e caracterização de uma aglutinina da esponja *Axinella polypoides*, pertencente à classe Demospongiae (Bretting; Kabat, 1976).

Desde então, cerca de 50 lectinas foram isoladas e purificadas de esponjas marinhas. No entanto, apenas uma fração dessas proteínas foi caracterizada quanto à sua estrutura primária, e menos ainda foram avaliadas em termos de aplicações biotecnológicas específicas (Duarte, 2022; Gardères *et al.*, 2015).

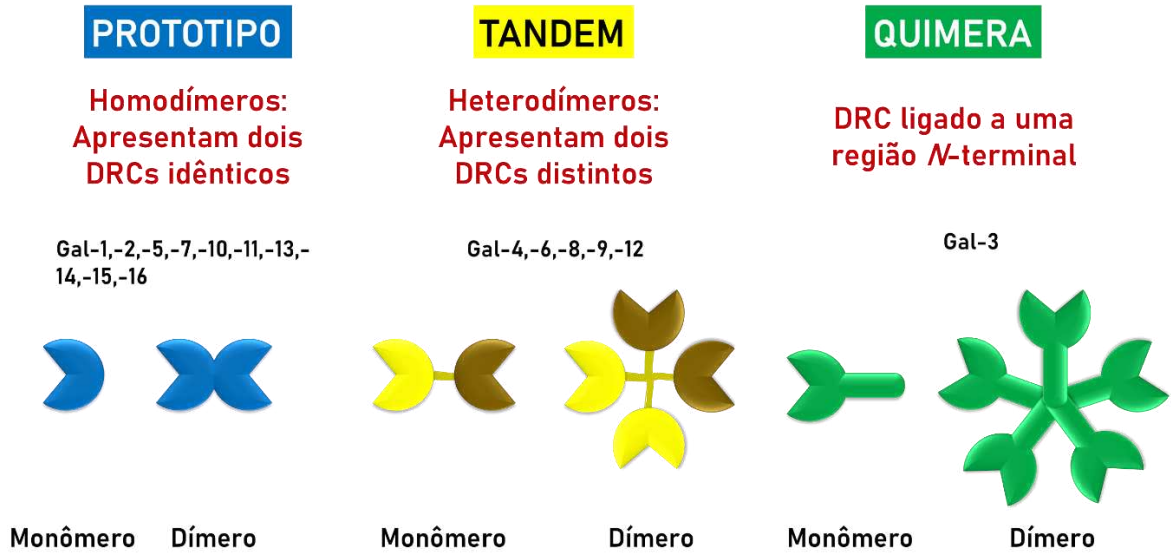
As primeiras lectinas de poríferos a terem sua estrutura primária determinada datam do início da década de 1990. Em um estudo com a esponja *Axinella polypoides*, foram identificadas quatro isolectinas, incluindo a "lectina I", composta por 144 resíduos de aminoácidos. As proteínas apresentaram massas moleculares entre 15 e 16 kDa e suas sequências foram determinadas por degradação de Edman em combinação com espectrometria de massas, permitindo também a identificação de pontes dissulfeto intracadeia e suas respectivas posições (Buck *et al.*, 1992). Entretanto, a lectina de *A. polypoides* não apresentou similaridade com qualquer proteína conhecida.

Desde então, a espectrometria de massas consolidou-se como ferramenta fundamental para a caracterização estrutural de lectinas marinhas. Por meio dessa técnica, a lectina H-3, isolada de *Haliclona caerulea*, foi parcialmente sequenciada, revelando uma cadeia  $\alpha$  com 145 resíduos e 16,2 kDa, e uma cadeia  $\beta$  com sequência completa de 106 resíduos e massa de 11,6 kDa. Embora sem similaridade com outras lectinas animais conhecidas, a H-3 apresenta homologia com uma proteína putativa de *Amphimedon queenslandica* (Carneiro *et al.*, 2013).

Atualmente, cerca de dez lectinas de esponjas marinhas tiveram suas sequências de aminoácidos completamente determinadas, sendo a maioria pertencente à família das galectinas. As galectinas, também conhecidas como lectinas do tipo S, constituem uma das classes de lectinas mais amplamente distribuídas entre os organismos e são caracterizadas por sua afinidade por glicoconjugados contendo resíduos de  $\beta$ -galactose. Essas proteínas compartilham similaridade estrutural em seus domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs) e estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento, a modulação de respostas imunológicas e o reconhecimento de microrganismos, atuando, assim, na defesa imune inata (Cummings *et al.*, 2022; Gardères *et al.*, 2015).

Com base na organização de seus DRCs, as galectinas são subdivididas em três tipos estruturais: prototipo, tandem e quimera (Figura 3). As galectinas do tipo proto apresentam um único DRC e podem formar homodímeros (ex.: Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15). As galectinas em tandem possuem dois DRCs distintos em uma única cadeia polipeptídica, conectados por uma região flexível de aproximadamente 70 aminoácidos (ex.: Gal-4, -6, -8, -9 e -12). Já as galectinas quiméricas, representadas exclusivamente pela Gal-3, apresentam um único DRC associado a uma região não lectínica com aproximadamente 120 aminoácidos, responsável por funções adicionais na interação com ligantes e proteínas (Seyrek *et al.*, 2019; wang *et al.*, 2020).

Figura 3 - Subdivisões de galectinas com base em seus DRCs.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Galectinas foram identificadas nas esponjas marinhas *Geodia cydonium*, *Cinachyrella* sp., *Chondrilla caribensis*, *Chondrilla australiensis*, *Aplysina lactuca*, *Aiolochoxia crassa*, *Halichondria okadai* e *Suberites domuncula* (Duarte *et al.*, 2023; Freymann *et al.*, 2012; Hayashi *et al.* 2024; Hasan & Ozeki, 2019; Schröder *et al.* 1990; Sousa *et al.*, 2021; Torres *et al.*, 2025; Wagner-Hülsmann *et al.*, 2006).

Além das galectinas, também foram identificadas lectinas do tipo C em esponjas, como em *Aphrocallistes vastus* (Gundacker *et al.*, 2001). As lectinas do tipo C constituem uma grande família de proteínas, com mais de mil membros, classificados em dezessete subgrupos com base na filogenia e organização estrutural. Todas essas proteínas compartilham pelo menos um domínio CTLD (*C-type lectin-like domain*), cuja estrutura conservada é responsável pelo reconhecimento de carboidratos (Sousa *et al.*, 2024; Weis *et al.*, 1998; Zelensky; Gready, 2005).

Em esponjas também foram identificadas lectinas do tipo taquilectinas, como aquelas presentes em *Ephydatia fluviatilis* e *Suberites domuncula* (Funayama *et al.*, 2005; Schröder *et al.*, 2003). As taquilectinas foram originalmente identificadas em *Tachypleus tridentatus* (caranguejo-ferradura), o que deu origem ao nome dessa classe de lectinas (Shimizu; Ito; Niwa, 1977). Uma característica marcante dessas proteínas é a presença de seis domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs) distribuídos ao longo de sua cadeia polipeptídica, o que as distingue estrutural e funcionalmente de outras lectinas conhecidas (Kawabata; Tsuda, 2002; López, 2022).

### 1.5.1 Lectinas relacionadas ao fibrinogênio

Embora a literatura clássica sobre o filo Porifera descreva predominantemente as três classes de lectinas previamente destacadas, a crescente exploração genômica e proteômica tem revelado uma complexidade molecular contendo domínios FBG (*fibrinogen-like domain*) que emergiram como importantes fatores imunológicos e de desenvolvimento (Hanington; Zhang, 2011).

O domínio FBG é uma unidade estrutural específica encontrada em diversas proteínas. Ele é uma parte da proteína que possui uma estrutura conservada ao longo da evolução, capaz de desempenhar funções específicas, como o reconhecimento de padrões e a iniciação de respostas imunes (Hanington; Zhang, 2011).

Desde o primeiro relato de um domínio relacionado ao fibrinogênio em invertebrados, pepino-do-mar *Parastichopus parvimensis* (Xu; Doolittle, 1990), uma série de moléculas foram encontradas e algumas caracterizadas em organismos que abrangem quase todos os invertebrados (Hanington; Zhang, 2011).

Proteínas contendo um ou mais domínios relacionados ao fibrinogênio – FREPs (Fibrinogen-Related Protein) podem desempenhar, conseqüentemente, funções de defesa imunológica, coagulação ou desenvolvimento, dependendo de sua organização e de outros domínios que possam possuir. FREPs já foram relatadas em muitos invertebrados, como acídias, anelida, artrópodes, nematoda, cnidários, placozoários, moluscos (Doolittle; Mcnamara; Lin, 2012; Hanington; Zhang, 2011).

As lectinas contendo domínio relacionado ao fibrinogênio (FRED) foram relatadas em invertebrados de origem marinha como em crustáceos, a exemplo do *Penaeus monodon* (Singrang *et al.*, 2021) e em equinodermos, *Echinometra lucunter*, (Duarte *et al.*, 2022;). Essas lectinas são caracterizadas pela presença de um domínio fibrilar C-terminal conservado e atuam como potentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Em diversos invertebrados, as FREDs desempenham funções vitais na aglutinação de patógenos e na opsonização, demonstrando uma versatilidade funcionalidade (Doolittle; Mcnamara; Lin, 2012; Hanington; Zhang, 2011).

O domínio relacionado ao fibrinogênio permite que as lectinas que possuam essa porção estrutural, apresentem um complexo molecular em forma de “buquê de flores” que permite a adesão de DRCs na extremidade C-terminal da proteína, dessa maneira podem reconhecer estruturas glicânicas em superfícies microbianas, evidentemente, favorecendo a

ativação do sistema imunológico inato dos invertebrados (Lacroix *et al.*, 2009; Singrang *et al.*, 2021).

### 1.5.2 Potencial biotecnológico de lectinas de esponjas

Diversos estudos têm destacado a crescente relevância das lectinas extraídas de invertebrados marinhos, especialmente de esponjas, devido à sua diversidade estrutural e ao potencial biotecnológico e farmacológico associado.

Por exemplo, Watari *et al.* (2022) conduziram um estudo pioneiro sobre a lectina trombocorticina (ThC), derivada de esponja marinha *Corticium* sp., e demonstraram sua capacidade de ativar o receptor de trombopoietina (MPL) por meio da interação com glicanos. Esse mecanismo mimetiza alterações observadas em mutações patológicas da calreticulina associadas a neoplasias mieloproliferativas, evidenciando o potencial terapêutico de lectinas marinhas em doenças hematológicas.

A lectina isolada da esponja marinha *Haliclona implexiformis*, denominada HiL, demonstrou uma redução significativa no número de células viáveis em biofilmes de *Staphylococcus*. Caracterizada como um novo tipo de lectina com especificidade por galactose e derivados, a HiL atua como um dímero ligado por pontes dissulfeto, mantendo sua estabilidade em variadas condições de pH e temperatura (Andrade *et al.*, 2023).

A lectina H3, isolada da esponja *Haliclona caerulea*, demonstrou atividade antitumoral seletiva contra células de câncer de mama (MCF7), reduzindo sua viabilidade (IC50 de 100 µg/ml) sem afetar células normais. O mecanismo de ação envolve a parada do ciclo celular na fase G1 e a indução de morte celular por apoptose e autofagia, processos mediados pelo aumento das proteínas CASP9 e LC3-II. Além disso, a H3 prejudicou significativamente a adesividade celular em cultura (Neto *et al.*, 2018).

A aglutinina isolada da esponja tropical *Haliclona manglaris* (HMA) destaca-se por sua expressiva capacidade antioxidante, sendo capaz de proteger o β-caroteno contra a oxidação. Essa atividade biológica parece estar vinculada à presença de um cromóforo orgânico de 581 Da em sua composição molecular. Embora a proteína não tenha demonstrado toxicidade frente a náuplios de *Artemia* nem capacidade de aglutinar células bacterianas, sua atividade hemaglutinante manteve-se estável em temperaturas elevadas (até 60 °C) e pH neutro. Tais achados indicam que a HMA atua primordialmente na proteção da esponja contra danos oxidativos, apresentando-se como uma molécula de interesse para aplicações biotecnológicas que exijam estabilidade e ação antioxidante (Carneiro *et al.*, 2015).

A lectina AFL, isolada de *Aplysina fulva* foi capaz de reduzir significativamente a biomassa de biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* (Carneiro *et al.*, 2019). Resultados similares foram observados para a lectina AfIL, proveniente de *Aplysina fistularis*, que além de inibir a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentou efeito bacteriostático sobre cepas resistentes de *S. aureus* em estado planctônico (Andrade *et al.*, 2025).

Outra lectina com potencial antimicrobiano, denominada IsL, foi isolada da esponja *Ircinia strobilina*. Essa proteína inibiu de forma significativa a formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*, reforçando a aplicabilidade das lectinas como agentes antimicrobianos naturais (Almeida *et al.*, 2023).

A associação de lectinas com antibióticos também tem se mostrado uma estratégia promissora no combate a cepas bacterianas resistentes, especialmente devido à sua capacidade de desestabilizar biofilmes microbianos. Nesse contexto, a lectina ALL (*Aplysina lactuca*) demonstrou efeito sinérgico significativo quando administrada em conjunto com antibióticos, aumentando a suscetibilidade de *S. aureus* à terapia antimicrobiana (Duarte *et al.*, 2023).

De forma semelhante, a lectina AcrL, isolada de *Aiolochoxia crassa*, apresentou inibição dose-dependente da formação de biofilmes por *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, ampliando a lista de lectinas com potencial aplicação no controle de infecções bacterianas (Torres *et al.*, 2025).

Lectinas extraídas de esponjas também se destacam seu potencial antileishmanicida. A CCL (*Chondrilla caribensis*) quando administrada com formas promastigotas de *Leishmania infantum*, apresentou efeito inibitório em todas as concentrações testadas (Sousa *et al.*, 2021) vale destacar que a CCL já havia sido investigada anteriormente quanto seu potencial antibiofilme e aglutinação bacteriana que se complementam com os resultados encontrados (Marques *et al.*, 2018).

A lectina CvL, extraída de *Cliona varians*, além de apresentar atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, foi capaz de aglutinar promastigotas de *Leishmania chagasi* (Moura *et al.*, 2006). Esse potencial de aglutinação também foi encontrado na lectina CaL de *Cynachyrella apion* (Medeiros *et al.*, 2010).

A CvL também se demonstrou capaz promover migração leucocitária *in vivo* por meio de edema de pata e peritonite em camundongos, sendo responsável por induzir a migração de neutrófilos, pela ativação de macrófagos residentes e da quimiotaxia mediada por citocinas, destacando o efeito pró-inflamatório encontrado nessas moléculas (Queiroz *et al.*, 2008).

Efeito antiviral foi observado para a lectina CN, oriunda da esponja *Chondrilla nucula*, no qual células H-9 infectadas pelo HIV-1 apresentaram um acréscimo quando tratadas com a proteína, sinalizando que essa lectina promove um retardo na liberação do HIV-1 (Schröder *et al.*, 1990).

Por meios de ensaios de citometria de fluxo e *Western blotting* foi possível avaliar o potencial da CaL contra células tumorais. Os resultados mostraram que a lectina provavelmente induz a morte celular (em células HeLa) por ativação da apoptose pela proteína pró-apoptótica Bax, promovendo a permeabilização da membrana mitocondrial, essa característica sugere a lectina nos estudos médicos para tratamentos anticâncer (Rabelo *et al.*, 2012).

Foi avaliada a atividade moduladora mediada por galectinas, especificamente as galectinas do gênero CchG isoladas da esponja *Cinachyrella* sp. Essas galectinas interagem com os receptores de glutamato (como os iGluRs) através de seus domínios de reconhecimento de carboidratos, modulando sua função ao influenciar sua atividade de *gating*, como a desaceleração da desativação e aumento dos correntes sustentados, afetando assim a comunicação neural, sendo importante porque influencia significativamente a comunicação neural, o funcionamento cerebral e, potencialmente, processos relacionados ao aprendizado, memória e resposta a doenças neurológicas (Ueda *et al.*, 2013).

### **1.5.3 Lectina de *Aplysina cauliformis***

Um estudo recente destacou o potencial biotecnológico de uma lectina extraída da esponja marinha *Aplysina cauliformis* (Figura 4), coletada no litoral do Ceará, em ponto de mergulho do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio. A lectina, denominada AcL, demonstrou efeito sinérgico significativo quando combinada com os antibióticos ampicilina e tetraciclina, aumentando a eficácia desses fármacos contra patógenos bacterianos (Oton, 2023).

Figura 4 - Esponja *Aplysina cauliformis*.



Fonte: Adaptado de Biodiversity4all, 2026; Coralpedia, 2026.

Anteriormente, a AcL já havia sido investigada quanto à purificação, caracterização bioquímica e determinação parcial da estrutura primária. A proteína apresentou atividade hemaglutinante em ampla faixa de pH, com maior intensidade observada em pH 9 e 10. Também foi considerada termoestável, mantendo atividade hemaglutinante após incubação a 80 °C por uma hora (Viana, 2021).

O estudo desenvolvido por Viana (2021) também trouxe resultados importantes sobre o ensaio de inibição de atividade hemaglutinante, esse demonstrou que a AcL apresenta potencial de inibição favorecido principalmente pelas glicoproteínas mucina de estômago de suíno tipo II e tipo III, com CIM de  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e mucina de estômago bovino com  $7,865 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para carboidratos os resultados foram menos contundentes (tabela 2).

Tabela 2 - Ensaio de inibição de atividade hemaglutinante de AcL.

<b>Carboidratos</b>	<b>CIM</b>
N-acetil-galactosamina	50 mM
$\alpha$ -lactose	50 mM
L-fucose	50 mM
Arabinose	50 mM
B-metil-tiogalactosídeo	50 mM
<b>Glicoproteínas</b>	<b>CIM</b>
Fetúina	$31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Mucina de Estomago Bovino	$7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Mucina de Estomago Suíno Tipo II	$2 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Mucina de Estomago Suíno Tipo III	$2 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: Adaptado de Viana (2021).

Em relação à massa molecular, a AcL apresentou heterogeneidade quando analisada por eletroforese em gel de SDS-PAGE. A princípio foi observada uma banda com 35 kDa, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, já na ausência do agente redutor, uma banda com 66 kDa (Viana, 2021).

Peptídeos derivados da AcL foram sequenciados por espectrometria de massas, mas não apresentaram similaridade significativa com outras lectinas com estrutura tridimensional conhecida. Dessa forma, a AcL não pôde ser classificada em nenhuma das famílias de lectinas previamente descritas. Ainda no mesmo estudo foi possível avaliar a capacidade da lectina de aglutinar a bactéria Gram negativa *E. coli* (Viana, 2021).

Os resultados obtidos até o momento oferecem subsídios relevantes para investigações acerca do potencial biotecnológico da AcL além de descobertas mais contundentes quanto sua estrutura e disposição estrutural da proteína.

De forma mais ampla, as lectinas marinhas vêm ganhando destaque por suas propriedades antivirais, anticancerígenas, imunomoduladoras e antibiofilme, com aplicações potenciais na biotecnologia e na medicina translacional. A prospecção de lectinas em esponjas marinhas amplia o entendimento sobre a biologia desses organismos, como também abre novas perspectivas para o desenvolvimento de biofármacos e tecnologias inovadoras (Ahmmed *et al.*, 2022; Almeida *et al.*, 2023; Catanzaro *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2021).

## 1.6 Bactéria e biofilme

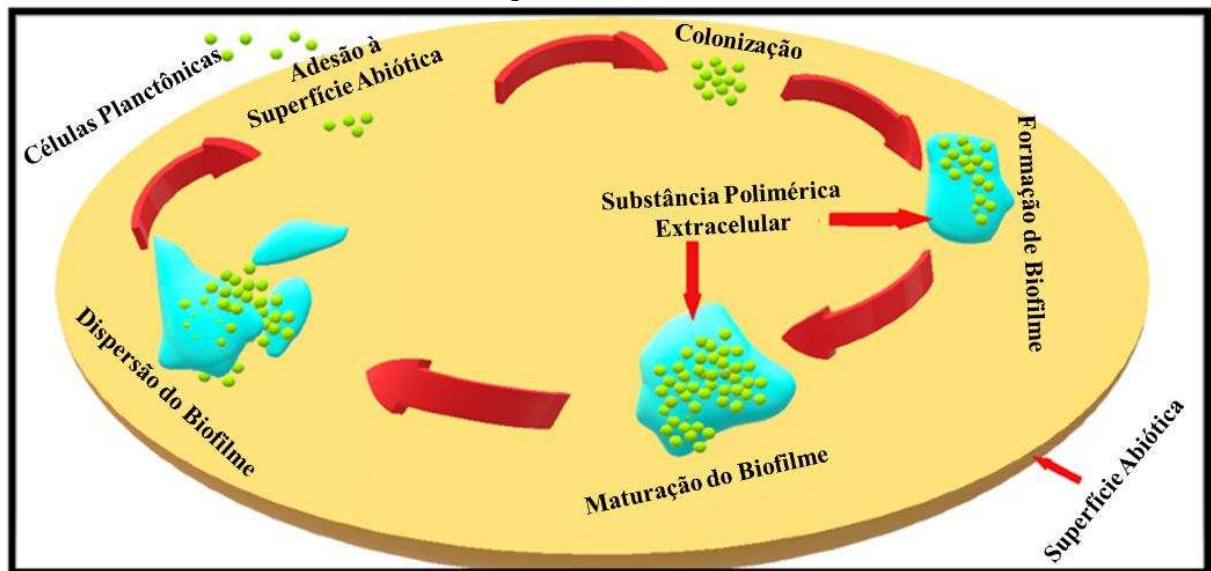
As bactérias são microrganismos unicelulares procariontes, caracterizados pela ausência de núcleo organizado e de organelas membranosas, como ocorre em células eucarióticas. Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, na água, no ar, em organismos vivos e até em ambientes extremos, como fontes hidrotermais e regiões glaciares (Madigan *et al.*, 2016).

Embora muitas espécies bacterianas desempenhem funções essenciais em ecossistemas naturais e na fisiologia humana, outras estão associadas a importantes desafios em saúde pública. Entre os principais problemas relacionados à ação bacteriana destacam-se as doenças infecciosas, a resistência a antibióticos e a formação de biofilmes (Abrantes & Nogueira, 2022; Santos, 2004).

Biofilmes bacterianos são definidos como comunidades estruturadas de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e envolvidos por uma matriz extracelular autoproduzida. Essa matriz é composta predominantemente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e confere proteção à comunidade microbiana, aumentando sua resistência a condições ambientais adversas (Ciofu *et al.*, 2022; Flemming *et al.*, 2016; 2023).

A formação de biofilmes (Figura 5) ocorre por meio de um processo dinâmico dividido em cinco estágios principais: (i) adesão inicial, caracterizada por interações reversíveis entre as células bacterianas e a superfície, mediadas por forças hidrofóbicas e eletrostáticas; (ii) adesão irreversível, na qual há produção de exopolissacarídeos que reforçam a fixação celular; (iii) formação da matriz e crescimento, com proliferação bacteriana e desenvolvimento da arquitetura tridimensional (3D), que é promovido por substâncias poliméricas extracelulares (EPS); (iv) maturação, fase em que a comunidade estabelece canais para distribuição de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos; e (v) dispersão, etapa final em que células bacterianas se desprendem da matriz para colonizar novas superfícies, promovendo a disseminação da população (Donlan; Costerton, 2002; Mishra *et al.*, 2023).

Figura 5 - Representação da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em uma superfície abiótica.



Fonte: Adaptado de Idress *et al.*, 2021.

Os biofilmes bacterianos formados por patógenos são centenas de vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as células plancônicas, tornando extremamente difícil a cura de infecções baseadas em biofilmes, mesmo com o uso de antibióticos (Liu *et al.* 2022; López; Soto, 2020), de tal modo que atualmente estima-se que 80% das doenças infecciosas sejam causadas por biofilmes (Nourbakhsh *et al.*, 2022).

De acordo com Uruén e colaboradores (2020) outro fator que favorece a resistência bacteriana está na expressão de bombas de efluxo que pode ser induzida em várias partes do biofilme aumentando a frequência de mutações, enquanto a presença de DNA extracelular e o contato próximo entre as células favorecem a transferência horizontal de genes.

Portanto, os medicamentos convencionais estão se tornando cada vez menos eficazes contra bactérias patogênicas, como *S. aureus*, pois são menos penetrantes ou totalmente impenetráveis devido à presença de biofilmes que envolvem as células bacterianas (Idrees *et al.*, 2021), assim facilitando significativamente a patogênese bacteriana ao permitir a evasão imunológica e a resistência antimicrobiana (Thakur; Kumar, 2025).

Diante desse panorama, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas possíveis estratégias terapêuticas que ultrapassem os mecanismos clássicos de ação dos antibióticos. Além de que uma compreensão profunda dos mecanismos pelos quais os biofilmes causam tolerância ou resistência a antibióticos ajuda a desenvolver novas estratégias para combater essas infecções (Uruén *et al.*, 2020). Sem alternativas eficazes, a medicina moderna corre o

risco de perder a capacidade de tratar infecções comuns e realizar procedimentos de risco com segurança (Ho *et al.*, 2025; Waterlow *et al.*, 2024).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar bioquímica e funcionalmente uma lectina extraída da esponja marinha *Aplysina cauliformis*, avaliando sua estrutura primária, estabilidade conformacional, interação com carboidratos e seu potencial antibiofilme.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e purificar a lectina AcL;
- b) Determinar a homogeneidade e a massa molecular da lectina purificada;
- c) Avaliar estados de agregação/oligomerização;
- d) Analisar a estrutura primária da lectina por Espectrometria de Massas e a estrutura terciária *in silico*;
- e) Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação da lectina com seu principal ligante;
- f) Avaliar a atividade antibiofilme da lectina ACL frente a bactérias patogênicas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta dos animais

Os espécimes de *Aplysina cauliformis* foram coletados em um ponto de mergulho do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (03°35'19" S e 038°24'32" W), a 9,3 milhas náuticas (cerca de 17 km) da Ponta do Mucuripe, em profundidades que variam de 17 a 30 m, município de Fortaleza, litoral do Ceará. As coletas, bem como o acesso ao patrimônio genético das esponjas foram reguladas e previamente autorizadas pelos devidos órgãos ambientais, por meio de registros no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-13) e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9).

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

#### 3.2 Preparação do extrato proteico

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

#### 3.3 Purificação da lectina

A lectina da esponja marinha *A. cauliformis* foi isolada seguindo o protocolo descrito por Viana (2021), com algumas modificações. A princípio, o extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação, permanecendo em repouso por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a mistura foi centrifugada a  $9.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi então solubilizado no mesmo tampão de extração e designado como fração 0-70.

Para a etapa de purificação, foi realizada cromatografia de afinidade utilizando uma matriz de Sepharose 6B. Um volume de 35 mL da fração 0-70 foi aplicado em uma coluna contendo Sepharose 6B (1,0 × 3,5 cm), previamente equilibrada com tampão TBS. As frações não retidas foram lavadas com TBS até que a absorbância da leitura, a 280 nm, chegou a ser inferior a 0,02. Posteriormente, as proteínas retidas na matriz foram eluídas com tampão TBS contendo 300 mM de lactose. Os eluatos com absorbância acima de 0,02 foram coletados, nomeados como P2 Sepharose, reunidos e submetidos à diálise contra água destilada e ultrapura e então liofilizados e armazenados a -20 °C para uso posterior.

A etapa seguinte envolveu a cromatografia de troca iônica, conduzida em uma coluna HiTrap Q FF acoplada ao sistema automatizado ÄKTA Pure (GE Healthcare Life Sciences). O material liofilizado foi solubilizado em um pequeno volume de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. Esse mesmo tampão foi utilizado para o equilíbrio e lavagem da coluna. A eluição das proteínas foi realizada com um gradiente crescente de NaCl, variando de 0 a 1 M. O fluxo da cromatografia foi mantido constante a 1 mL/min, e frações de 1 mL foram coletadas para posterior análise. A eluição foi monitorada por absorbância a 280 nm.

### **3.4 Avaliação da pureza da lectina**

A pureza e a homogeneidade da lectina foram examinadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE a 12%), com coloração realizada utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram preparadas em condições redutoras e não redutoras, na presença e ausência de β-mercaptoetanol, conforme descrito por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi conduzida sob uma corrente constante de 25 mA e uma tensão de 150 V durante um período de 60 minutos.

A estimativa da massa molecular da proteína de interesse foi realizada pela comparação do perfil de migração da lectina purificada com o de proteínas padrão de pesos moleculares conhecidos.

### **3.5 Espalhamento Dinâmico da Luz - DLS**

As análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foram realizadas com o objetivo de avaliar o comportamento hidrodinâmico e o perfil de oligomerização da lectina AcL. O diâmetro hidrodinâmico teórico da AcL foi inicialmente estimado *in silico* utilizando o programa HullRad. Para as medições experimentais, a lectina foi solubilizada em tampão TBS

a uma concentração final de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Antes das análises, a amostra foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 20 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , a fim de remover agregados insolúveis e partículas em suspensão. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente transferido para cubetas descartáveis de poliestireno, e as medições foram realizadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  utilizando um equipamento Zetasizer Advance Ultra (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

As distribuições de tamanho hidrodinâmico foram calculadas a partir das funções de autocorrelação de intensidade, empregando o modelo de análise de uso geral fornecido pelo fabricante. Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo que cada replicata correspondeu à média de múltiplas varreduras consecutivas, conforme procedimentos descritos em estudos anteriores (Lorber *et al.*, 2012; Saraiva, 2025).

### 3.6 Digestão, separação de peptídeos e sequenciamento

A proteína foi solubilizada em bicarbonato de amônio  $50 \text{ mM}$  contendo  $0,1\%$  de RapiGest™ SF (Waters Corp., EUA), reduzida, alquilada (SHEVCHENKO *et al.*, 2006) e digerida com tripsina, quimotripsina, Glu-C e AspN na proporção de  $1:100$  (p/p) enzima:proteína. As digestões foram conduzidas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16 h. Após a digestão, foi adicionado ácido fórmico em concentração final de  $0,1\%$  para precipitação do surfactante, conforme instruções do fabricante (Waters Corp., EUA, manual do produto RapiGest™ SF).

Os peptídeos resultantes foram injetados em uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 ( $100 \mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$ ) acoplada a um sistema nanoAcquity UPLC (Waters Corp., EUA) e eluídos por gradiente linear de acetonitrila contendo  $0,1\%$  de ácido fórmico. As amostras eluídas foram diretamente introduzidas em uma fonte de nanoeletrospray de um espectrômetro de massas híbrido (SYNAPT HDMS, Waters Corp., EUA). A aquisição dos dados foi realizada pelo método de análise dependente de dados (DDA, Data-Dependent Analysis), conforme descrito por Carneiro e colaboradores (2013).

Os espectros de dissociação induzida por colisão (CID, Collision Induced Dissociation) foram obtidos a partir de íons precursores com estados de carga  $2+$ ,  $3+$  e  $4+$  e processados utilizando os softwares MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp., EUA). Os espectros de fragmentação foram interpretados manualmente por meio de sequenciamento *de novo* com a ferramenta PepSeq (Waters Corp., EUA). Atribuições de resíduos de aminoácidos foram feitas com base na diferença de massa entre os fragmentos, sendo a distinção entre Leu/Ile orientada pela especificidade de clivagem da quimotripsina no C-terminal de resíduos de leucina.

### 3.7 Análise de Bioinformática

A sequência de aminoácidos da lectina AcL, obtida a partir do genoma de *Aplysina cauliformis* e confirmada por sequenciamento *De novo*, foi analisada em diferentes ferramentas de bioinformática. Inicialmente, as propriedades físico-químicas, incluindo massa molecular teórica (MW), ponto isoelétrico (pI), índice de estabilidade e valor de hidropatia (GRAVY), foram avaliadas no ProtParam, disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>.

A sequência foi então submetida ao programa RADAR (Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats) para a identificação de regiões repetidas (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar/>). Para a análise de domínios, foram utilizadas as plataformas InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), SMART (<http://smart.embl.de/>) e HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>). A presença de peptídeo sinal foi avaliada pelo SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>). A distribuição de estrutura secundária e os possíveis dobramentos da proteína foram investigados por modelagem no Phyre2.2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>).

Para análises comparativas, a sequência foi submetida ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos múltiplos foram realizados no MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e visualizados/ajustados no ESPript (<https://espript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>).

### 3.8 Modelagem

A predição estrutural tridimensional da lectina AcL foi obtida por meio do servidor AlphaFold2 (JUMPER *et al.*, 2021). Os modelos resultantes foram submetidos a análises de validação estereoquímica e qualidade estrutural com o auxílio das plataformas MolProbity e QMEAN (Chen *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2018; Benkert, Biasini & Schwede, 2011; Olechnovič & Venclovas, 2019).

Após a avaliação dos parâmetros de qualidade, o modelo com melhor pontuação foi selecionado e examinado visualmente no programa 3D Viewer (<https://www.rcsb.org/3d-view>) para verificação da organização espacial e integridade estrutural.

### 3.9 Calorimetria de Titulação Isotérmica - ITC

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram conduzidos utilizando um calorímetro MicroCal PEAQ-ITC (Marvel Instruments), equipado com uma célula de amostra padrão com capacidade de 250  $\mu\text{L}$  e uma seringa de titulação com volume de 40  $\mu\text{L}$ , com objetivo de avaliar amostras da lectina em interação com ligantes.

Para determinar quais ligantes seriam avaliados por ITC, foi utilizado o resultado do ensaio de inibição de atividade hemaglutinante feito por Viana (2021), segundo o método da dupla diluição seriada em placas de 96 poços com fundo V, de acordo com a metodologia padrão de Sampaio e colaboradores (1998). Foram utilizados carboidratos diversos, além de glicoproteínas presentes em superfícies bacterianas (LPS – lipopolissacarídeo e TCA- ácido teicóico).

O melhor ligante, PSM (Porcine Stomach Mucin – Mucina de Estômago de porco), foi selecionado e então, as amostras (lectina e ligantes) foram preparadas em uma solução tampão de Tris-HCl a 50 mM (pH 8,0), contendo 150 mM de NaCl.

Na célula do calorímetro, foi alocada a AcL na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Paralelamente, a solução do ligante foi preparada em concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e introduzida na célula por meio da seringa de titulação. O protocolo experimental envolveu um total de 19 ciclos de injeção, durante os quais volumes de 2  $\mu\text{L}$  da solução de ligante foram adicionados à célula de amostra em intervalos regulares de 150 segundos, sob uma agitação controlada de 750 rpm, garantindo a homogeneização adequada das soluções e a máxima reprodutibilidade dos dados obtidos. O controle foi conduzido usando a mesma solução de ligante titulada contra a célula contendo o tampão.

Os efeitos calóricos integrados extraídos a partir dos experimentos foram analisados por meio de regressão não linear, utilizando o modelo de ligação de sítio disponível no software MicroCal PEAQ-ITC Analysis.

A análise dos dados experimentais permitiu a determinação da constante de dissociação ( $K_d$ ), um indicador da afinidade entre a lectina e os ligantes, bem como da entalpia de ligação ( $\Delta H$ ), que revela a natureza energética das interações. Além disso, foi possível estimar o número de sítios de ligação ( $\eta$ ) presentes na molécula de lectina, fornecendo informações detalhadas sobre o perfil de interação molecular.

### **3.10 Avaliação do potencial antibiofilme**

#### ***3.10.1 Cepas bacteriana e condições de cultura***

Os ensaios para determinação da atividade antibiofilme foram realizados utilizando as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *S. epidermidis* ATCC 353984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram a princípio cultivadas em meio sólido Ágar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) e incubadas a 37 °C por 24 horas para permitir o crescimento adequado.

Após o período de incubação, colônias isoladas foram cuidadosamente removidas do meio sólido e transferidas para Caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia), onde foram cultivadas sob agitação constante, a 37 °C, por 24 horas. As células bacterianas foram então colhidas pós centrifugação a  $9000 \times g$ , durante 10 minutos, a 4 °C, para assegurar a separação eficiente do sobrenadante.

Os pellets resultantes foram suspensos em TSB e a densidade celular das suspensões bacterianas foi ajustada para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>). O ajuste foi realizado com base na densidade óptica medida a 620 nm, garantindo uniformidade nas condições experimentais.

#### ***3.10.2 Avaliação da formação de biofilme***

A formação de biofilme foi avaliada seguindo o protocolo descrito por Vasconcelos e colaboradores (2014), com adaptações específicas para este estudo. Placas estéreis de poliestireno com 96 poços foram utilizadas, sendo preparadas conforme os mesmos procedimentos aplicados para o cultivo de células planctônicas.

A análise dos biofilmes foi realizada por meio de dois métodos complementares: quantificação da biomassa total utilizando coloração com violeta de cristal e determinação da viabilidade celular por meio da enumeração de células viáveis presentes no biofilme.

##### ***3.10.2.1 Quantificação da biomassa do biofilme***

A quantificação da biomassa total do biofilme foi realizada por um método colorimétrico utilizando cristal violeta. Após o desenvolvimento do biofilme, o conteúdo de cada poço das placas foi cuidadosamente removido, e os poços foram lavados duas vezes com

200 µL de solução de NaCl 150 mM, com o objetivo de eliminar células frouxamente aderentes. Para fixar os biofilmes nas superfícies dos poços, foram adicionados 200 µL de metanol (99%) em cada poço. Após um período de 15 minutos, o metanol foi descartado e as placas foram deixadas para secar à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, 200 µL de solução de cristal violeta foram adicionados aos poços para a coloração da biomassa aderente. Após 5 minutos de incubação, o excesso de cristal violeta foi removido, seguido de duas lavagens com água destilada para eliminar resíduos não ligados.

Posteriormente, 200 µL de ácido acético (33%, v/v) foram adicionados a cada poço para solubilizar o cristal violeta ligado à biomassa do biofilme. A absorbância da solução resultante foi medida a 590 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3), permitindo uma estimativa quantitativa da biomassa formada.

### *3.10.2.2 Determinação da viabilidade celular no biofilme*

A quantificação das células viáveis no biofilme foi realizada após lavagem dos poços com solução de NaCl 150 mM, aplicada duas vezes para remover resíduos não aderentes. Em seguida, 200 µL da mesma solução foram adicionados a cada poço contendo biofilmes maduros. As placas foram submetidas a banho ultrassônico por 10 minutos para facilitar a liberação das células encapsuladas na matriz do biofilme. As suspensões obtidas foram então submetidas a diluições decimais seriadas, que foram previamente semeadas em placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA).

Após incubação das placas por 24 horas a 37 °C, o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>) foi determinado, fornecendo uma medida quantitativa da viabilidade celular no biofilme.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação

Na primeira cromatografia a fração 0-70 foi aplicada em coluna de Sepharose 6B e as frações retidas foram eluídas com lactose contida no tampão de equilíbrio. Após a cromatografia de afinidade as frações retidas foram submetidas a uma cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap Q FF, conforme o protocolo estabelecido por Viana (2021).

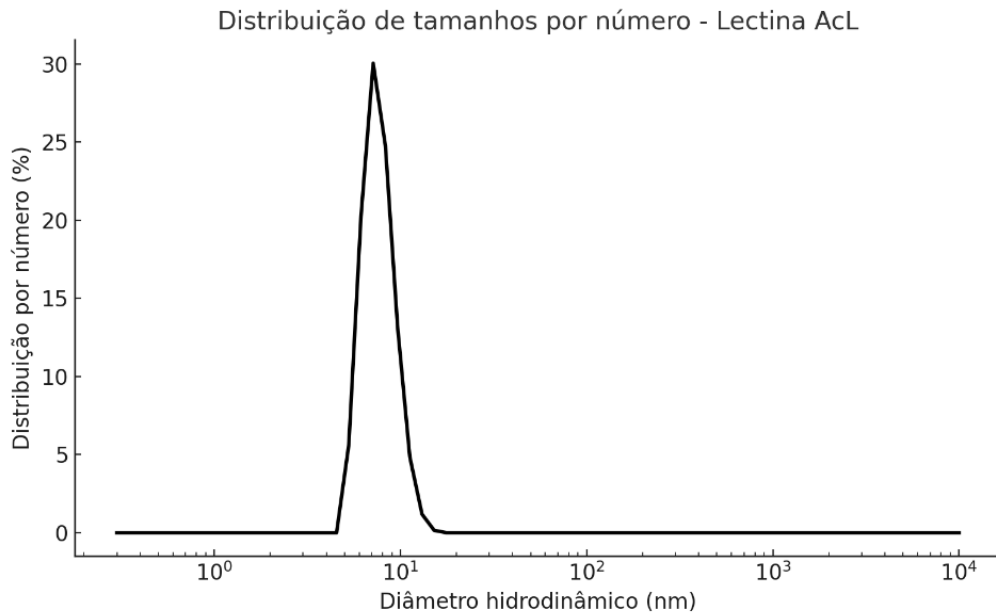
Na eletroforese por SDS-PAGE a lectina apresentou uma banda de aproximadamente 66 kDa na ausência de agente redutor e 35 kDa na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol.

A análise de estimativa de massa molecular por meio de eletroforese em SDS-PAGE é amplamente aplicado para lectinas derivadas de esponjas marinhas. A IsL (*Ircinia strobilina*) foi estimada em 21 kDa e 29 kDa sob condições redutoras e não redutoras, respectivamente (Almeida *et al.*, 2023). A lectina HCL (*Hyatella cribriformis*) apresentou duas bandas, com 35 kDa e 47 kDa (Sruthy; Ratheesh; Arun, 2025). A AfiL (*Aplysina fistularis*) demonstrou uma banda de 70 kDa na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol e 30 kDa presença do agente redutor (Andrade *et al.*, 2025).

### 4.2 Dispersão Dinâmica de Luz - DLS

A distribuição por número revelou uma população predominante com diâmetro hidrodinâmico entre 7 e 8 nm (figura 6), compatível com uma forma dimérica da proteína. Essa observação está em concordância com a estimativa teórica obtida por meio do programa HullRad, que previu um diâmetro hidrodinâmico de 8,2 nm para o dímero de AcL. De forma complementar, a análise por exclusão molecular também indicou a presença de um dímero como principal espécie em solução (Oton, 2023).

Figura 6 - Distribuição de tamanhos hidrodinâmicos da lectina AcL obtida por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

O valor de PDI (Índice de Dispersão Polidispersa) obtido foi 0,392, indicando uma amostra moderadamente monodispersa, sem evidências de agregação significativa. Em conjunto, os dados de DLS, as previsões *in silico* e os resultados experimentais de exclusão molecular demonstram de forma consistente que a lectina AcL se encontra predominantemente em um estado dimérico estável em solução.

De maneira geral, as lectinas de esponjas podem adotar diversos arranjos quaternários. Dímeros e tetrâmeros ligados por interações fracas são as formas mais comuns, sendo observados nas galectinas de *C. caribensis*, *A. lactuca* e *Cinachyrella* sp. (Ueda *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2023). Cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto são descritas em *C. varians* e *A. fistularis* (Moura *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2025).

Por outro lado, lectinas contendo domínios fibrilares (*i.e.* proteínas relacionadas ao fibrinogênio, proteínas contendo domínios do tipo colágeno, etc) apresentam arranjos quaternários mais complexos, pois o domínio fibrilar pode atuar como um agente oligomerizador permitindo a organização em estruturas supramoleculares (Boscher *et al.*, 2011). As colectinas, por exemplo, que possuem domínios fibrilares (colágeno e um motivo  $\alpha$ -helicoidal) podem apresentar arranjos triméricos que podem ainda se organizar em hexâmeros, resultando numa estrutura denominada “*bouquet*” com até 18 cadeias polipeptídicas (Hakansson; Reid, 2000).

Igualmente, as ficolinas (lectinas de defesa presentes em cordados) também se organizam em uma estrutura do tipo “*bouquet*”, composta por 4 a 6 trímeros unidos pelo motivo N-terminal do tipo colágeno. As ficolinas possuem também um domínio do tipo fibrinogênio, que aqui atua como o DRC (Bidula; Sexton; Schelenz, 2019).

Como discutido a frente, AcL apresenta um domínio fibrilar N-terminal, mas este não parece capaz de formar “superestruturas” como nas ficolinas e colectinas, sendo a ponte dissulfeto o mecanismo de oligomerização de AcL.

Recentemente uma lectina, derivada de esponja, foi avaliada quanto ao comportamento hidrodinâmico por meio de DLS. A AfIL, isolada de *Aplysina fistularis*, revelou comportamentos distintos dependendo do pH do tampão, em pH 5 a proteína demonstrou um estado oligomérico estável e homogêneo, porém em pH 7, resultou em três populações principais de tamanho por intensidade, indicando uma agregação parcial ou múltiplas espécies oligoméricas em equilíbrio, e em pH 10, foi observado um aumento da heterogeneidade e a formação de grandes agregados (Andrade *et al.*, 2025).

Poucas lectinas derivadas de esponjas foram investigadas até o presente momento por meio de DLS, entretanto, outros resultados significantes foram encontrados para essas proteínas em outros filos, como no caso da lectina MTL, extraída do molusco bivalve *Mytilus trossulus*, apresentou partículas monoméricas com diâmetro de 4,8 nm, além de grandes agregados, também indicou a alta tendência de oligomerização da proteína o que caracteriza uma formação de estruturas maiores e mais estáveis (Filshtein *et al.*, 2022).

Outro exemplo significativo, resultou dos estudos conduzidos com a lectina de outro molusco bivalve, PPL (*Pteria penguin*), onde foi possível observá-la quanto à sua capacidade de formar dímeros, indicando uma conformação de maior ordem que resultava em um peso molecular aproximado de 42 kD. Em contraste, na ausência de sal, a PPL permanecia na forma monomérica, com um peso molecular de cerca de 21 kD, sugerindo que a presença de altas concentrações de sal induzia uma conformação de oligomerização da lectina (Chatterjee; Adhya, 2013).

### 4.3 Determinação da estrutura primária

A análise por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) resultou na identificação de 13 peptídeos não redundantes derivados da lectina AcL, sendo 1 obtido pela digestão com GluC, 6 com quimotripsina, 2 com tripsina e 4 com AspN (tabela 3). Esses peptídeos, quando

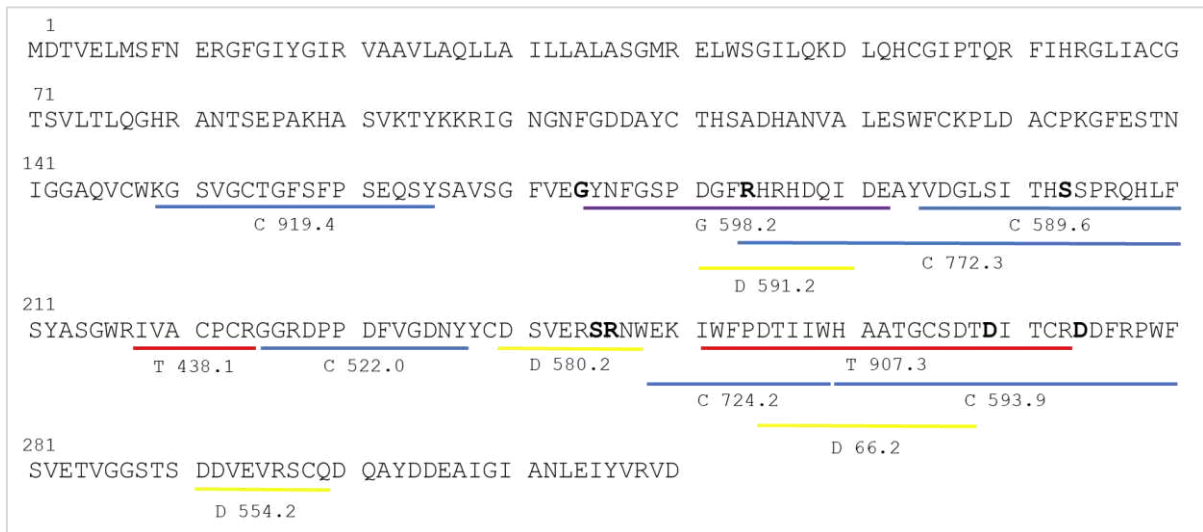
alinhados à sequência deduzida do genoma de *Aplysina cauliformis*, corresponderam a aproximadamente 40% da sequência total da proteína (Figura 7).

Tabela 3 – Peptídeos derivados de AcL.

m/z	Sequência	Massa		$\Delta$ (Da)
		Observada	Calculada	
<b>Digestão com Glu-C</b>				
717,91	GYNFGSPDGFGRHDQIDE	2146,67	2146,90	0,24
<b>Digestão com quimotripsina</b>				
471,20	GSPRQHLLF	940,38	940,48	0,10
447,50	GHRHDQIDEAY	1339,46	1339,59	0,12
485,18	GKGSVGCTGF	968,33	968,43	0,10
460,53	SITHGSPRQHLLF	1378,55	1378,71	0,16
460,53	SITHGSPRQHLLF	1378,55	1378,71	0,16
456,64	KGSVGCTGF	911,26	911,41	0,16
522,20	RGGRDPPDFVGDNY	1563,58	1563,70	0,12
559,20	HAATGCSDDIAC-RH	1670,40	1670,68	0,28
575,56	GHRHDQIDEAYVDGL	1723,65	1723,79	0,14
589,60	VDGLSITHGSPRQHLLF	1762,67	1762,91	0,24
645,21	HAATGCSDDIACRHDF	1932,78	1932,59	0,19
593,93	HAATGCSDDIACRHDFRPW	2371,71	2372,01	0,30
670,74	GHRHDQIDEAY	1339,48	1339,59	0,10
724,29	EKIWFPTIIW	1446,54	1446,75	0,21
772,33	GHRHDQIDEAYVDGLSITHGSPRQHLLF	3084,21	3084,49	0,28
761,74	ATGRNPPDFVGDNY	1521,44	1521,68	0,24
919,40	KGSVGCTGFSPSEQSY	1836,91	1836,79	-0,11
<b>Digestão com tripsina</b>				
438,21	IVACPCR	874,42	874,41	-0,01
907,69	IWFPTIIWHAATGCSDDVITCR	2719,14	2719,28	0,14
<b>Digestão com Asp-N</b>				
530,20	DSVERPGNW	1058,40	1058,47	0,07
554,19	DDVEVRSCQ	1106,35	1106,46	0,11
591,23	DGFGHRHDQI	1180,45	1180,53	0,08
666,21	DTIIWHAATGCS	1330,40	1330,59	0,19

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 7 - Mapa peptídico da lectina AcL obtido por MS/MS.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* A sequência de aminoácidos corresponde àquela predita a partir do genoma de *Aplysina cauliformis*. Os peptídeos identificados experimentalmente estão indicados conforme a enzima utilizada na digestão: T, tripsina; C, quimotripsina; D, AspN; e G, GluC. Os resíduos em negrito indicam as posições de micro-heterogeneidades observadas entre os peptídeos determinados experimentalmente e a sequência genômica.

Os peptídeos identificados apresentaram micro-heterogeneidades em relação à sequência predita no genoma, indicando possíveis variações pós-traducionais, polimorfismos ou diferenças entre as isoformas expressas. Essas variações foram detectadas nas seguintes posições: 184 (R/G), 203 (G/S), 245–246 (SR/PG), 268 (D/V) e 274 (D/H). As diferenças observadas estão associadas aos seguintes peptídeos identificados experimentalmente: AspN  $m/z$  530,2 (SR/PG), GluC  $m/z$  735,9 (G/N e R/G), quimotripsina  $m/z$  670,7 (R/G), tripsina  $m/z$  907,3 (D/V), quimotripsina  $m/z$  593,9 (D/H) e quimotripsina  $m/z$  460,5 (S/G).

Por meio do sequenciamento de aminoácidos foi possível observar informações relevantes em lectinas de outros gêneros constituintes da família Aplysinidae. Para ALL oito peptídeos trípticos foram identificados e sequenciados, demonstrando que a sequência parcial de aminoácidos apresenta um grau considerável de identidade e de similaridade com a lectina ligante de galactose isolada de *Axinella polypoides* (Carneiro *et al.*, 2017). Já para AFL, dezesseis peptídeos foram sequenciados por digestão com tripsina e entre esses alguns demonstraram similaridade com ALL (Carneiro *et al.*, 2019).

Ainda na família Aplysinidae, a AfIL, apresenta-se como uma proteína com algumas similaridades com AcL. Ao passar pelo processo de digestão com tripsina, a lectina de *Aplysina fistularis* resultou na identificação de nove peptídeos e por quimotripsina outros cinco

peptídeos adicionais, os peptídeos somados representam 42% da estrutura primária da proteína, assim como em AcL foi possível observar micro-heterogeneidades entre os peptídeos (Andrade *et al.*, 2025). Outrossim AfIL já demonstrara semelhanças relativas na estimativa da massa molecular em eletroforese (bandas em torno de 30 kDa na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e 70 kDa na ausência) bem como seu inibidor de atividade hemaglutinante também sendo a glicoproteína PSM (Andrade, 2022).

#### 4.4 Análise de Bioinformática

A sequência da lectina AcL possui 320 aminoácidos, incluindo 13 resíduos de cisteína, dos quais ao menos um está envolvido em ponte dissulfeto intercadeia. A análise pelo ProtParam revelou massa molecular teórica de 35.322 Da, valor compatível com a massa monomérica observada por SDS-PAGE. O ponto isoelétrico (pI) foi estimado em 5,33, enquanto o índice de estabilidade apresentou valor de 38, sugerindo que a proteína é estável. O índice alifático foi de 71,03, indicando boa tolerância a diferentes condições de temperatura, e o valor de GRAVY (-0,282) caracteriza a proteína como predominantemente hidrofílica.

O SignalP 6.0 não identificou a presença de peptídeo sinal, e o RADAR não detectou regiões repetidas na sequência. O InterProScan não revelou domínios válidos, enquanto a análise no SMART indicou um pequeno domínio transmembranar entre as posições 13–35 e um domínio fibrinogênio entre as posições 127–233. Por sua vez, o HHpred identificou similaridade entre a região N-terminal de AcL e diferentes proteínas (figura 8), incluindo a lectina sérica da lampreia (*Petromyzon marinus*, 7EIE\_B), a intelectina de *Xenopus laevis* (XEEL, 4WN0\_A), além de colágenos e fibrinogênio humanos (6FZW\_A, 4AE2\_C, 5K31\_A e 1LWU\_I). Esses resultados indicam uma possível relação evolutiva com proteínas de reconhecimento de carboidratos e proteínas estruturais.

Figura 8 - Análise de similaridade por HHpred da lectina AcL.



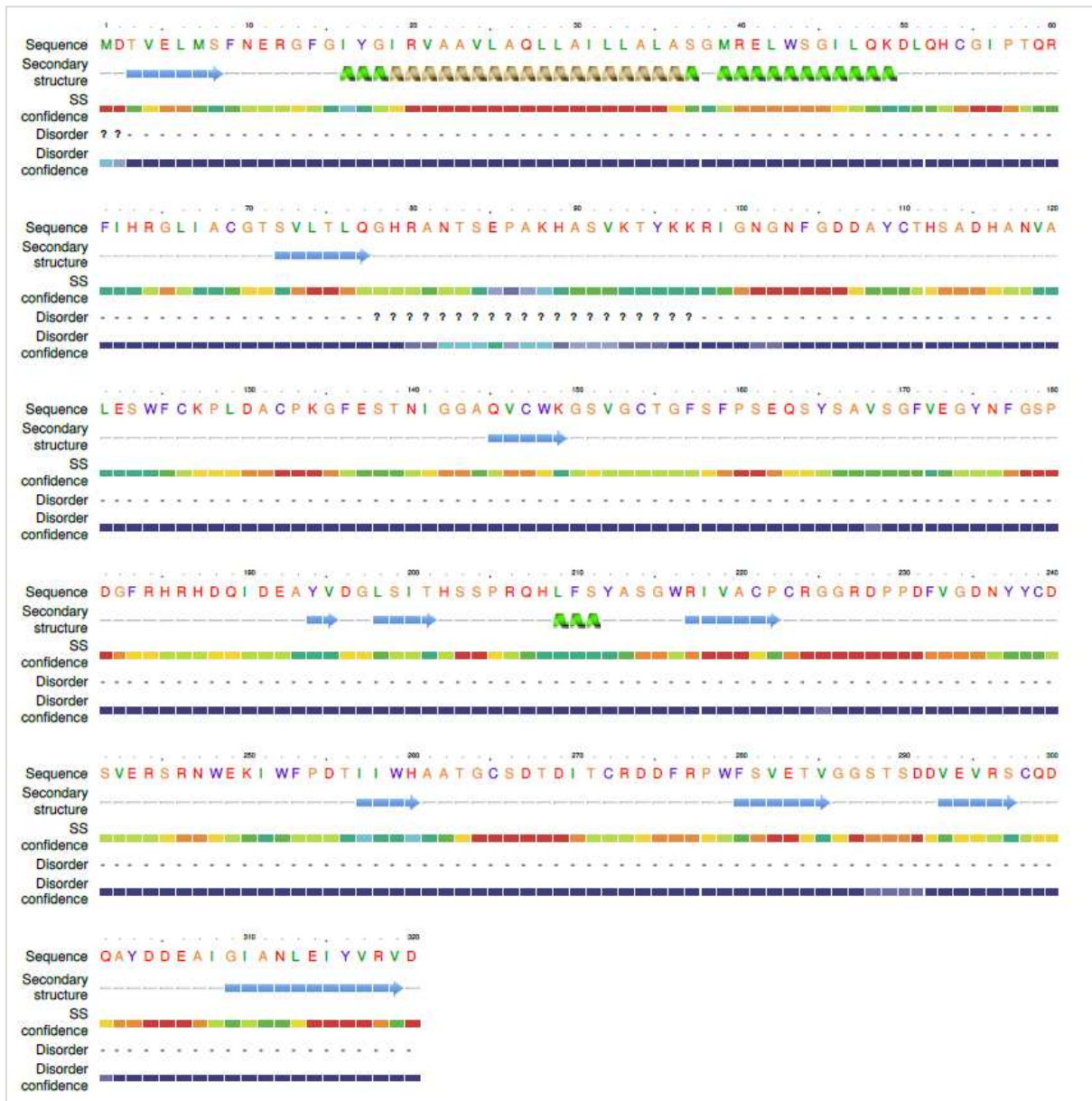
Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* A região N-terminal apresenta homologia com diferentes proteínas, incluindo lectina sérica de lampreia (7E1E\_B), as intelectina de *Xenopus laevis* (4WN0\_A) e *Homo sapiens* (6USC\_A), colágenos e fibrinogênio humanos (6FZW\_A, 4AE2\_C, 5K31\_A e 1LWU\_I).

#### 4.5 Predição estrutural de AcL

A modelagem por homologia no Phyre2.2 resultou em cobertura de aproximadamente 10% da sequência de AcL (dados não mostrados). Apesar da baixa cobertura estrutural, a predição de elementos secundários permitiu observar a predominância de  $\alpha$ -hélices na região N-terminal, seguida por folhas  $\beta$  na região C-terminal da proteína (figura 9). Esse arranjo sugere a presença de dois domínios estruturais distintos, hipótese que é corroborada pelas análises do HHpred, as quais também indicaram homologia diferencial entre a região N-terminal que apresenta similaridade com lectinas e proteínas fibrilares e um C-terminal, cujo domínio não foi identificado.

Figura 9 - Predição estrutural da lectina AcL realizada no Phyre2.2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* Apesar da baixa cobertura ( $\approx 10\%$ ), observa-se predominância de  $\alpha$ -hélices na região N-terminal e de folhas  $\beta$  na região C-terminal, sugerindo a presença de dois domínios estruturais distintos. Na linha Confidence as cores indicam confiabilidade verde = baixa confiabilidade e vermelho = alta confiabilidade da predição.

A análise por BLAST indicou que a lectina AcL apresenta similaridade variando entre 30 e 40% com proteínas não caracterizadas e proteínas hipotéticas de diferentes espécies de esponjas, incluindo *Ephydatia muelleri*, *Amphimedon queenslandica*, *Dysidea avara*, *Geodia barretti* e *Sycon ciliatum*. No entanto, não foi observada similaridade com proteínas de função previamente descrita. Esse resultado caracteriza AcL como a primeira lectina de esponja

contendo um domínio do tipo fibrilar, sugerindo a possibilidade de constituir uma nova subfamília de lectinas dentro da divisão FReD (Fibrinogen-Related Domain).

O modelo tridimensional de AcL obtido por AlphaFold revelou uma arquitetura composta por dois domínios distintos: um domínio fibrilar N-terminal, formado por uma longa alfa-hélice, e um domínio C-terminal do tipo *beta-sandwich* (Figura 10). Essa organização é consistente com os dados de bioinformática (Phyre2.2 e HHpred) e reforça a hipótese de que AcL representa uma lectina fibrilar inédita em esponjas.

Figura 10 - Modelo tridimensional predito para AcL pelo AlphaFold.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* A estrutura apresenta dois domínios distintos: um domínio fibrilar N-terminal, formado por uma longa alfa-hélice, e um domínio C-terminal organizado em um arranjo do tipo *beta-sandwich*.

A qualidade do modelo foi avaliada por diferentes métricas estruturais. O índice QMEANDisCo Global foi de  $0,38 \pm 0,05$ , valor moderado que indica um modelo razoável, compatível com proteínas de tamanho e organização semelhante. Os componentes individuais do QMEAN apresentaram os seguintes valores: QMEAN =  $-9,18$ ,  $C\beta = -0,17$ , All-atom =  $-2,19$ , Solvation =  $-3,89$  e Torsion =  $-8,10$ . Em geral, valores negativos dentro dessa faixa são

esperados para modelos derivados de predição *de novo*, sugerindo que a estrutura global é aceitável, mas contém regiões de menor confiabilidade, especialmente em segmentos flexíveis e regiões sem homólogos próximos.

A análise geométrica pelo MolProbity reforça essa interpretação. O modelo apresenta 74,53% dos resíduos em regiões favorecidas do diagrama de Ramachandran, valor abaixo do ideal (>90%), e 15,09% de *outliers*, indicando a presença de dobras locais menos prováveis ou regiões intrinsecamente desordenadas. A taxa de rotâmeros fora do padrão (4,92%) é relativamente modesta e compatível com modelos preditivos. Esses indicadores sugerem que, embora o modelo capte corretamente a organização geral da proteína (especialmente a separação clara entre o domínio helicoidal e o domínio  $\beta$ -sanduíche), algumas regiões apresentam baixa confiabilidade e devem ser interpretadas com cautela.

Em conjunto, esses resultados indicam que o modelo de AcL é de qualidade moderada, adequado para interpretações estruturais globais, como a identificação de domínios, mas não suficiente para inferências de alta precisão em nível de resíduos. Por conta disso, não foi possível identificar os aminoácidos que compõem o DRC e experimentos de cálculos de atracamento não foram realizados.

Ainda assim, a concordância entre AlphaFold, Phyre2.2 e HHpred fortalece a conclusão de que AcL apresenta dois domínios estruturais distintos: um fibrilar e um do tipo *beta-sandwich*, característicos de proteínas da superfamília FReD.

A lectina encontrada em *Aplysina cauliformis*, contendo domínio FReD, integra um grupo de proteínas de ligação a carboidratos do sistema imunológico inato, encontradas em animais vertebrados e invertebrados, que reconhecem estruturas glicídicas em superfícies microbianas, sendo muito importantes para esses animais pois eles não dispõem de imunidade adaptativa para a eliminação de patógenos tão bem desenvolvida como nos vertebrados (Loker *et al.*, 2004; Singrang *et al.*, 2021).

Esse domínio fibrilar se localiza entre a região N-terminal e a porção C-terminal e consiste em uma região alongada cuja função principal é, além de desempenhar importante papel na defesa de invertebrados, conferir estabilidade estrutural e permitir a oligomerização da proteína (Hanington; Zhang, 2011). Entretanto, em AcL o domínio fibrilar não parece estar relacionado à oligomerização como evidenciado no teste de DLS.

Diversas famílias de lectinas são comumente associadas ao papel de imunidade inata em invertebrados como as lectinas do tipo C (Brown; Willment; Whitehead, 2018), ficolinas (Endo; Matsushita; Fujita, 2011) e as intelectinas – encontradas principalmente em

placozoários, urocordados, cefalocordados e diversos vertebrados, incluindo peixes, anfíbios e mamíferos (Chen; Li; Yang, 2020; Wangkanont *et al.*, 2016).

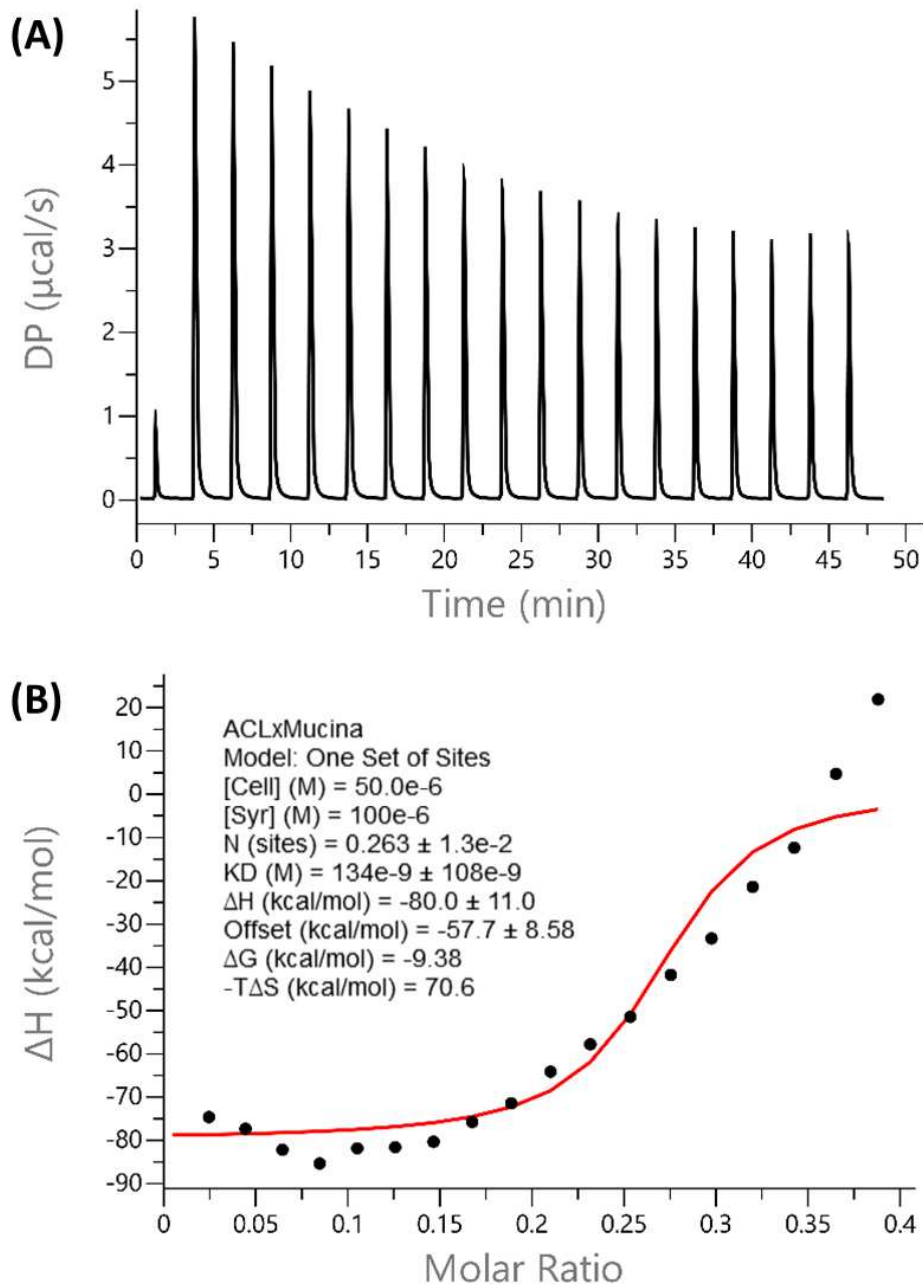
Dentre essas, as ficolinas e as intelectinas possuem similaridade com as lectinas que possuem domínio relacionado ao fibrinogênio em relação a sua homologia estrutural e são similarmente associadas à capacidade de promover função de defesa em invertebrados (Singrang *et al.*, 2021).

Assim, essa porção estrutural da lectina AcL (domínio relacionado ao fibrinogênio) sugere um importante repertório da imunidade inata da esponja *Aplysina cauliformis* mesmo não participando diretamente do reconhecimento de carboidratos, como um CRD, mas sendo fundamental para a disposição espacial dos domínios de ligação, aumentando a avidéz e eficiência na interação com padrões glicânicos microbianos, aspecto esse que é documentado em lectinas de outros grupos animais.

#### **4.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)**

A interação entre AcL e PSM foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica. O termograma apresentado (Figura 11.A) mostra picos endotérmicos bem definidos ao longo das injeções sucessivas de PSM no interior da célula contendo AcL, com uma redução progressiva na amplitude dos sinais calóricos, indicando saturação dos sítios de ligação da lectina.

Figura 11 - Análise da interação entre AcL e PSM por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* (A): termograma obtido pela titulação de PSM na célula contendo AcL, mostrando picos endotérmicos que diminuem progressivamente de amplitude, indicando a saturação dos sítios de ligação. (B): curva integrada de ligação ajustada ao modelo de um sítio, apresentando o ajuste parabólico típico e os parâmetros termodinâmicos derivados da interação.

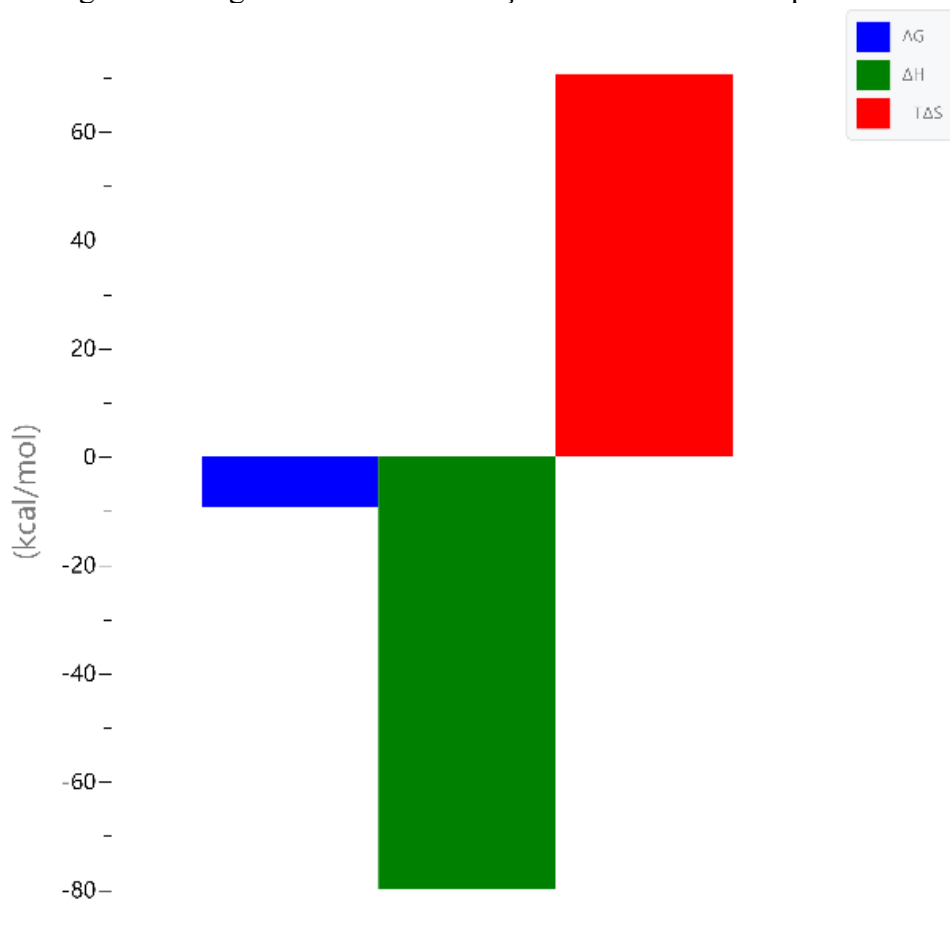
A curva integrada de ligação (Figura 11.B) ajustou-se de maneira aceitável ao modelo de um sítio, revelando que AcL reconhece PSM com afinidade moderada. O parâmetro

de estequiometria obtido ( $n = 0,263$ ) indica que quatro moléculas de AcL interagem com uma única molécula de PSM, padrão compatível com a natureza multivalente das mucinas e a presença de múltiplos determinantes glicídicos ao longo de sua estrutura.

A afinidade observada foi da ordem de  $KD = 134$  nM, correspondente a um  $Ka$  de aproximadamente  $7,46 \times 10^6$   $M^{-1}$ , caracterizando uma interação de alta afinidade para lectinas de origem marinha.

A ligação foi entalpicamente desfavorável, com  $\Delta H = -80$   $kcal \cdot mol^{-1}$ , mas fortemente entropicamente favorecida, com  $T\Delta S = 70,6$   $kcal \cdot mol^{-1}$ , resultando em uma energia livre de interação de  $\Delta G = -9,38$   $kcal \cdot mol^{-1}$ . Esse perfil termodinâmico sugere que a interação é dirigida majoritariamente por efeitos entrópicos, possivelmente relacionados à reorganização de moléculas de água e à natureza heterogênea dos glicanos presentes em PSM, e não por interações diretas específicas de natureza entálpica (Figura 12).

Figura 12 - Signature Plot da interação AcL-PSM obtido por ITC.



\* O gráfico apresenta a distribuição relativa das contribuições termodinâmicas individuais para a interação entre AcL e PSM, destacando os componentes entálpicos e entrópicos derivados do ajuste do modelo de um sítio. O Signature Plot permite visualizar o balanço entre as forças que dirigem o processo de ligação, evidenciando que a interação é entropicamente favorecida e entalpicamente desfavorável.

O valor de offset ( $-57,7$ ) está dentro do esperado para interações envolvendo macromoléculas altamente flexíveis, como mucinas. Em conjunto, esses resultados demonstram que AcL reconhece PSM de forma específica, multivalente e com afinidade nanomolar.

Em contraste com AcL a lectina AfiL, quando submetida ao teste de ITC, apresentou forte ligação exotérmica, todavia a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) atingiu  $-80$  kcal/mol que, similarmente à lectina encontrada em *Aplysina cauliformis*, sugere ligação altamente dependente de entalpia. O parâmetro de estequiometria foi estimado em 0,148 e indicou que sete moléculas de AfiL interagiram com uma molécula de PSM (Andrade *et al.*, 2025).

#### **4.7 Efeito de AcL na formação de biofilmes bacterianos e contagem de células viáveis**

A formação de biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 foi fortemente inibida por AcL em todas as concentrações testadas (figura 9a), todavia não demonstrou redução sobre o crescimento planctônico. A biomassa do biofilme chegou a ser reduzida completamente na concentração de  $125 \mu\text{g/mL}$ , resultados similares foram encontrados em todas outras concentrações (reduções acima de 80% da biomassa). Quanto à contagem de células viáveis (figura 9e), não houve redução nas diferentes concentrações testadas, senão para a menor ( $7,8125 \mu\text{g/mL}$ ).

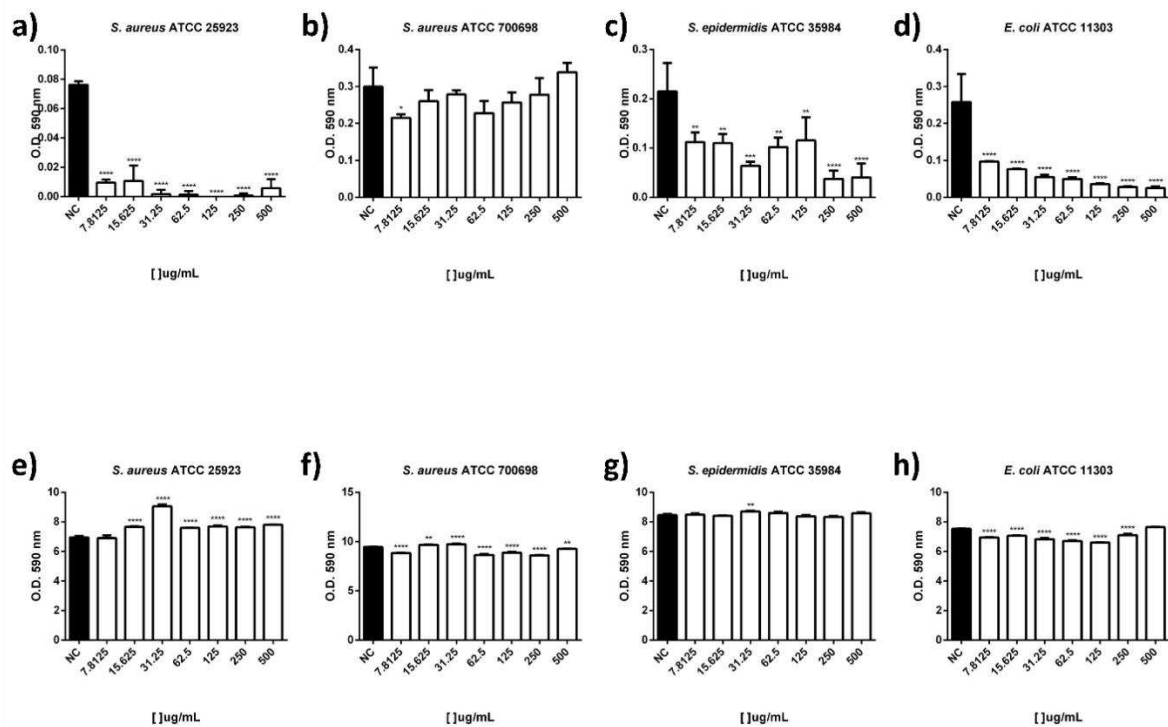
A AcL demonstrou redução da biomassa de biofilme de *S. aureus* ATCC 700698 (figura 9b), observado para as diferentes concentrações testadas, com exceção para a mais alta ( $500 \mu\text{g/mL}$ ), que mostrou crescimento. Na contagem de células viáveis (figura 9f), a lectina não proporcionou diminuições contundentes, mas sim um aumento moderado para as concentrações  $15,625 \mu\text{g/mL}$  e  $31,25 \mu\text{g/mL}$ .

Foram avaliadas diminuições significativas também em biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228 (pelo menos 50% da biomassa em todas as concentrações), reduções mais pronunciadas foram observadas nas maiores concentrações ( $250 \mu\text{g/mL}$  e  $500 \mu\text{g/mL}$ ), que chegou a diminuir acima de 70% do biofilme. Na contagem de células viáveis também não

houve diminuições, e assim como em ATCC 700698, um leve crescimento foi notado em algumas concentrações (31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL e 500 µg/mL).

Contra a cepa de *E. coli* ATCC 11303, a lectina apresentou forte efeito inibitório contra a formação do biofilme, com efeito dependente da dose, as maiores reduções na biomassa foram observadas para as maiores concentrações administradas (250 µg/mL e 500 µg/mL). A contagem de células viáveis reduziram nas concentrações entre 7,8125 µg/mL e 250 µg/mL, já para a maior concentração (500 µg/mL), a contagem apresentou um aumento.

Figura 13 - Efeito de AcL na formação de biofilme e contagem de células viáveis.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

\* Efeito do AcL na formação de biofilme de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Quantificação da biomassa do biofilme (a – d) e contagens de células viáveis (e – h). As barras representam amostras tratadas com AcL; as barras pretas representam grupos não tratados (controles). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística foi calculada em comparação aos controles não tratados usando ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Bonferroni:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Os resultados de espectrometria de massas e bioinformática indicaram que a AcL possui uma estrutura primária com domínio relacionado ao fibrinogênio. Essa configuração estrutural sugere uma disposição eficiente de seus domínios de ligação, aspecto fundamental para a sua interação com glicanos presentes na superfície das bactérias e na matriz do biofilme.

Em conjunto com os achados termodinâmicos, as análises de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), que revelaram uma afinidade elevada da lectina por componentes específicos de PSM, corrobora com essa possibilidade de que a AcL pode atuar ligando-se às estruturas de glicanos na superfície bacteriana, que favorece a inibição da formação do biofilme bacteriano.

Lectinas extraídas de esponjas pertencentes a família Aplysinidae também demonstraram potencial antibiofilme. A ALL, extraída de *Aplysina lactuta*, demonstrou capacidade de reduzir significativamente a biomassa do biofilme bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, este com efeito dose-dependente e concentrações variando de 250 para 15.6 µg/mL (Carneiro *et al.*, 2017).

Foi observado que a AFL, isolada de *Aplysina fulva*, mesmo não inibindo o crescimento planctônico das bactérias testadas, apresentou-se capaz de reduzir significativamente a biomassa do biofilme das bactérias testadas, principalmente para *S. aureus*, *S. epidermidis*, além disso, demonstrou redução significativa na contagem das células viáveis de *E. coli* (Carneiro *et al.*, 2019).

Ainda a respeito da família Aplysinidae, resultados relevantes foram encontrados na lectina extraída de *Aplysina cauliformis* (AfiL). A proteína exibiu atividade antibiofilme significativa contra cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, e para *E. coli*, apresentou o maior efeito inibitório com reduções de 50–75% em concentrações entre 15,6 e 250 µg/mL (Andrade *et al.*, 2025).

## 5 CONCLUSÃO

Nesse estudo a lectina AcL, isolada da esponja marinha *Aplysina cauliformis*, foi purificada e caracterizada bioquimicamente, apresentando 320 aminoácidos, com 13 resíduos de cisteína.

A lectina destaca-se como a primeira representante do filo Porifera a possuir o domínio fibrilar (FReD), o que sugere a presença de mecanismos sofisticados de reconhecimento de padrões. Em termos de atividade biológica, a proteína demonstrou uma expressiva capacidade inibitória na formação de biofilmes de patógenos clinicamente relevantes, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*.

Por calorimetria de titulação isotérmica foi observado que a lectina AcL apresenta alta afinidade com PSM em comparação com outras lectinas marinhas. Esse dado destaca a capacidade que a lectina possui em reconhecer glicanos presentes em PSM de forma específica e eficiente, revelando um potencial de atuar na modulação de processos mediados por mucinas ou componentes funcionais da superfície bacteriana. Combinando os achados termodinâmicos e estruturais, é possível justificar a capacidade inibitória da lectina de *Aplysina cauliformis* na formação de biofilme.

Apesar da imunidade em invertebrados ser historicamente classificada como estritamente inata, carecendo da especificidade e memória características do sistema adaptativo de vertebrados, é possível observar eventos como a presença de domínios FRED em metazoários basais como um tipo de “*Immune Priming*”, sugerindo que organismos como os poríferos possuem mecanismos sofisticados de reconhecimento de padrões.

Os resultados obtidos nesse trabalho posicionam essa molécula como uma candidata promissora para futuros estudos em bioprospecção genômica, desenvolvimento de novas estratégias anti-virulência ou fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas.

A AcL representa mais uma de algumas lectinas investigadas dentre as oriundas de esponjas pertencentes a família Aplysinidae. Atualmente há relatos de cinco lectinas encontradas em poríferos dessa mesma família. Portanto, AcL integra mais uma das proteínas desse meio com potencial antibacteriano e antibiofilme porém com uma característica singular que até então não havia sido documentada para o filo Porifera.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. D. R. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 3, 2022.
- ADEWOLE, Taiwo Scholes *et al.* **Lectins: (Glyco-)Proteins for Health and Longevity**. 1. ed. Londres: CRC Press, 2024.
- AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific Binding of Concanavalin A to Cross-Linked Dextran Gels. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 23C-35C, 1 set. 1965.
- AHMED, M. K. *et al.* An Update of Lectins from Marine Organisms: Characterization, Extraction Methodology, and Potential Biofunctional Applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 430, 29 jun. 2022.
- ALMEIDA, A. S. D. *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**, [s. l.], v. 95, n. suppl 2, p. e20220619, 2023.
- ANDRADE, Francisco Regivanio Nascimento *et al.* Afil, a Lectin from *Aplysina fistularis*, Exhibits Antibiofilm and Synergistic Antibacterial Activity Against Resistant Bacteria. **Microorganisms**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1349, 10 jun. 2025.
- ANDRADE, F. R. N. **Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis***. 2022. Tese (Doutorado em biotecnologia de recursos naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 18 de fevereiro de 2022.
- ANDRADE, F. R. N. *et al.* New lectin isolated from the tropical sponge *Haliclona (Reniera) implexiformis* (Hechtel, 1965) shows antibiofilm effect. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. e20220379, 2023.
- ANJUM, K. *et al.* Marine Sponges as a Drug Treasure. **Biomolecules & Therapeutics**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 347–362, 1 jul. 2016.
- ASHWELL, Gilbert; MORELL, Anatol. The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. *In*: MEISTER, Alton (Org.). **Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology**. 1. ed. [s. l.]: Wiley, 1974. v. 41 p. 99–128.
- BALA SUBRAMANIYAN, Siva; VEERAPPAN, Anbazhagan. Lectins as the prominent potential to deliver bioactive metal nanoparticles by recognizing cell surface glycans. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. e29394, abr. 2024.
- BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 480–482, dez. 1988.

BARZKAR, N.; SUKHIKH, S.; BABICH, O. A comprehensive review of marine sponge metabolites, with emphasis on *Neopetrosia* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 280, p. 135823, nov. 2024.

BEKTAS, Suna; KAPTAN, Engin. Microbial lectins as a potential therapeutics for the prevention of certain human diseases. **Life Sciences**, [s. l.], v. 346, p. 122643, jun. 2024.

BELL, J. J. The functional roles of marine sponges. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 341–353, set. 2008.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011.

BIDULA, Stefan; SEXTON, Darren W.; SCHELENZ, Silke. Ficolinas e o reconhecimento de microrganismos patogênicos: uma visão geral da resposta imune inata e a contribuição dos polimorfismos de nucleotídeo único. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2019, p. 1–13, 5 fev. 2019.

**Biodiversity4all - *Aplysina cauliformis***. Disponível em:

<https://www.biodiversity4all.org/taxa/131711-Aplysina-cauliformis>. Acesso em: 2 fev. 2025.

BOSCHER, Cecile; DENNIS, James W.; NABI, Ivan R. Glicosilação, galectinas e sinalização celular. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 383–392, ago. 2011.

BOUTET, A. **Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging**. Erscheinungsort nicht ermittelbar: Taylor & Francis, 2022.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, [s. l.], v. 119, n. 3091, p. 419–419, 26 mar. 1954.

BRETTING, H.; KABAT, E. A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, [s. l.], v. 15, n. 15, p. 3228–3236, 27 jul. 1976.

BROOKS, Susan. Lectins as versatile tools to explore cellular glycosylation. **European Journal of Histochemistry**, [s. l.], v. 68, n. 1, 29 jan. 2024.

BROWN, G. D.; WILLMENT, J. A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 374–389, jun. 2018.

BRUSCA, Richard; MOORE, Wendy. **Invertebrados**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan 2018.

BUCK, F. *et al.* Comparative investigations on the amino-acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1159, n. 1, p. 1–8, set. 1992.

CAMUS, M. L. Recherches experimentales sur une agglutinine produite par la glande de l'albumen chez l'*Helix pomatia*. **CR Acad. Sci**, [s. l.], v. 129, p. 233, 1899.

CANTACUZENE, J. Sur certains anticorps naturels observes chez *Eupagurus prideauxii*. **Compt. Rend. Soc. Biol**, [s. l.], v. 73, p. 663, 1912.

CARNEIRO, R. F. *et al.* A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 72, p. 1368–1375, jan. 2015.

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

CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2864–2873, dez. 2013.

CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 99, p. 213–222, jun. 2017.

CARNEIRO, R. F. *et al.* Toward Enhanced Antibiotic Efficacy: Exploring the Synergistic Potential of Marine-Derived Lectins Against Human Pathogenic Bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. e20240072, 2024.

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

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 175–223, 2020.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 362–413, 2021.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 1122–1171, 2022.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 275–325, 2023.

CASTELÃO, V. **Lectinas Uma nova atitude no diagnóstico e tratamento do cancro**. 2017. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. 2017.

CATANZARO, E. *et al.* Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 11, 21 dez. 2019.

CHATTERJEE, B. P.; ADHYA, M. Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves. *In*: KIM, Se-Kwon (Org.). **Marine Proteins and Peptides**. 1. ed. [s. l.]: Wiley, p. 41–68, 2013.

CHEN, L.; LI, J.; YANG, G. A comparative review of intelectins. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. e12882, jul. 2020.

CHEN, V. B. *et al.* *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2010.

CIOFU, O. *et al.* Tolerance and resistance of microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], p. 1-15, 2022.

CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J. M. Review: The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, [s. l.], v. 313, p. 111096, dez. 2021.

**Coralpedia - Your guide to Caribbean corals and sponges**. Disponível em: [https://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/en/sponges/aplysina\\_cauliformis\\_a](https://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/en/sponges/aplysina_cauliformis_a). Acesso em: 11 abr. 2025.

CUMMINGS, Richard *et al.* **Galectins: Essentials of glycobiology**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 2022.

CUNHA, Cássia Regina Albuquerque da. **Avaliação da atividade antitumoral da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos**. Tese (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12105>. Acesso em: 05 jan. 2026.

DEBITUS, C. *et al.* Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. **Journal of Marine Biotechnology**. [s. l.], v. 6, n.3, p. 136-141. Ago. 1998.

DEL MOURO, L. *et al.* A new sponge from the Marjum Formation of Utah documents the Cambrian origin of the hexactinellid body plan. **Royal Society Open Science**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 231845, set. 2024.

DIAS, Anne Shyrley Ferreira. **Lectina da esponja marinha *Tedania ignis*: purificação, caracterização e interação com leishmanias**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/12602>. Acesso em: 30 jan. 2026.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 167–193, abr. 2002.

DOOLITTLE, R. F.; MCNAMARA, K.; LIN, K. Correlating structure and function during the evolution of fibrinogen-related domains. **Protein Science**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1808–1823, dez. 2012.

DUARTE, Jéssica de Assis. **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) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em:

<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/69552>. Acesso em: 30 jan. 2026.

DUARTE, J. D. 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**, [s. l.], v. 214, p. 165–175, nov. 2023.

DUARTE, P. L. *et al.* A fibrinogen-related Lectin from *Echinometra lucunter* represents a new FReP family in Echinodermata phylum. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 131, p. 150–159, dez. 2022.

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

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 705–712, maio 2011.

ERESKOVSKY, Alexander; LAVROV, Andrey. (2021). Porifera. In: Invertebrate Histology. In: LADOUCEUR, E. E. B. (Ed.). **Invertebrate Histology**. 1. ed. [s. l.] Wiley, 2021. p. 19–54.

FILSHTEIN, A. P. *et al.* Spatial Structure of Lectin from the Mussel *Mytilus trossulus*: In-Sights from Molecular Modelling and Practical Proof. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 10, 23 dez. 2022.

FLEMMING, C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 563–575, set. 2016.

FLEMMING, C. *et al.* The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 70–86, fev. 2023.

FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. Snake venom in relation to hæmolysis, bacteriolysis, and toxicity. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 277–301, 1 mar. 1902.

FREESE, J. L.; WING, B. L. Juvenile red rockfish, *Sebastes* sp., associations with sponges in the Gulf of Alaska. **Marine Fisheries Review**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 38–42, 2003.

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

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

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

GRANGEIRO, Yasmim. *et al.* A Review of the Leishmanicidal Properties of Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 443–453, jul. 2024.

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, dez. 2006a.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2876–2890, dez. 2006b.

GUNDAKER, 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, 1 jan. 2001.

GURAV, M. J. *et al.* Lectin-glycan interactions: a comprehensive cataloguing of cancer-associated glycans for biorecognition and bio-alteration: a review. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 41, n. 4–5, p. 301–322, out. 2024.

HADAS, E.; SHPIGEL, M.; ILAN, M. Particulate organic matter as a food source for a coral reef sponge. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 212, n. 22, p. 3643–3650, 15 nov. 2009.

HANINGTON, P. C.; ZHANG, S. The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. **Journal of Innate Immunity**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 17–27, 2011.

HÅKANSSON, Kjell; REID, Kenneth B. M. Collectin structure: A review. **Protein Science**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1607–1617, jan. 2000.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 26, p. 4910–4919, 19 dez. 1972.

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

HAYASHI, Ryuhei *et al.* Novel Galectins Purified from the Sponge *Chondrilla australiensis*: Unique Structural Features and Cytotoxic Effects on Colorectal Cancer Cells Mediated by TF-Antigen Binding. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 400, 31 ago. 2024.

HICKMAN, C. P. *et al.* 2016. **Princípios integrados de Zoologia**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 952.

HO, C. S. *et al.* Antimicrobial resistance: a concise update. **The Lancet – Microbe**. [s. l.], v. 6, n. 1, p. 101069, 2025.

HULTGREN, K.; DUFFY, J. Sponge host characteristics shape the community structure of their shrimp associates. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 407, p. 1–12, 20 mai. 2010.

IDREES, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 14, p. 7602, 16 jul. 2021.

IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 998–1031, 2018.

JEYACHANDRAN, Sivakamavalli; RADHAKRISHNAN, Akshaya; RAGAVENDRAN, Chinnasamy. Harnessing the power of mollusc lectins as immuno-protective biomolecules. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 182, 23 jan. 2024.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s. l.], v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

KAWABATA, Shun-ichiro; TSUDA, Ryoko. Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 414–421, set. 2002.

KAWSAR, S. *et al.* In vitro antibacterial and antifungal effects of a 30 kDa D-galactoside-specific lectin from the demosponge, *Halichondria okadai*. **Int. J. Biol. Life Sci**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 31–37, 2010.

KILPATRICK, David C. **Handbook of animal lectins: properties and biomedical applications: a compendium of galectins, collectins, selectins, pentraxins and other carbohydrate-binding proteins from throughout the animal kingdom**. 7. ed. New York: John Wiley, 2000.

KIM, So Young *et al.* Strategies beyond Decellularization for Optimal Tissue Engineering of Cardiac Xenografts. **Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 1253–1265, set. 2024.

LACERDA, R. B. Bromopyrrole Marine Alkaloids. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2015.

LACROIX, M. *et al.* Residue Lys57 in the Collagen-Like Region of Human L-Ficolin and Its Counterpart Lys47 in H-Ficolin Play a Key Role in the Interaction with the Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Proteases and the Collectin Receptor Calreticulin. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 182, n. 1, p. 456–465, 1 jan. 2009.

LAVROV, D. V. *et al.* Phylomitogenomics bolsters the high-level classification of Demospongiae (phylum Porifera). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. e0287281, 4 dez. 2023.

- LECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, C. D. S. VoromQA web server for assessing threedimensional structures of proteins and protein complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], [s. l.], v. 47, n. W1, p. W437–W442, 2019.
- LEHNINGER; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarver, p.269. 2014.
- LI, Shikang *et al.* Transcriptomic signatures related to the immune priming of *Ruditapes philippinarum* in response to the re-infection of *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 161, p. 110263, jun. 2025.
- LIRA, Simone Possedente De. **Metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de esponjas marinhas e do fungo *Beauveria felina* de origem marinha**. 2007. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-05062007-112443/fr.php>. Acesso em: 30 jan. 2026.
- LIU, S. *et al.* Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 427, 16 fev. 2022.
- LOKER, E. S. *et al.* Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 198, n. 1, p. 10–24, abr. 2004.
- LÓPEZ, Daniel Pemberthy. **Estudio de las lectinas presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus***. 2022. Tese (Mestrado em ciências bioquímicas) - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/82950>. Acesso em: 30 jan. 2026.
- LÓPEZ, Y.; SOTO, S. M. The usefulness of microalgae compounds for preventing biofilm infections. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 9, 2020.
- LORBER, B. FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; KERN, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 372–382, nov. 2012.
- MAARISIT, W. *et al.* Anti-mycobacterial activity of secondary metabolites from marine sponge *Agelas sp.* **Tropical Journal of Natural Product Research**, [s. l.], v. 8, n. 10, 1 nov. 2024.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. [s. l.]: Artmed Editora, 2016.
- MALDONADO, M. *et al.* Siliceous sponges as a silicon sink: An overlooked aspect of benthopelagic coupling in the marine silicon cycle. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 799–809, mai. 2005.
- MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 109, p. 1292–1301, abr. 2018.

- MEDEIROS, D. 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**, [s. l.], v. 155, n. 3, p. 211–216, mar. 2010.
- MEHBUB, M. F. *et al.* Marine sponge-derived natural products: trends and opportunities for the decade of 2011-2020. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 11, p. 1462825, 26 ago. 2024.
- MIARONS, P; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges: purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.
- MISHRA, S. *et al.* Therapeutic Strategies against Biofilm Infections. **Life**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 172, 2023.
- MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson. Contrib. Knowl.** [s. l.], p.89–90, 1860.
- MOHAPATRA, R. *et al.* Marine Natural Products As Antiviral Agents: Current Advances And Future Perspectives. **Biochemical and Cellular Archives**, [s. l.], v. 24, n. 2, 25 set. 2024.
- MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 517–523, dez. 2006.
- NETO, Antonio Moreira Marques. **Uma Nova Lectina Da Esponja Marinha *Aplysina Sp.* (Aplyl-1) Com Atividade Citolóxica Para Célula Tumoral (Hela) E Aglutinante De *Leishmania Amazonensis***. 2015. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/22450>. Acesso em: 30 jan. 2026.
- NETO, L. G. N. *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**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 521–528, 17 jul. 2018.
- NI, J. *et al.* Oncolytic Vaccinia Virus Harboring *Aphrocallistes vastus* Lectin Inhibits the Growth of Cervical Cancer Cells Hela S3. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 532, 23 set. 2021.
- NOURBAKSH, F. *et al.* Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: a brief look at treatment with natural agents. **Folia Microbiologica**, [s. l.], p. 1-20, 2022.
- OCÁDIZ, Berenice Wendoline Balderrama. **Efecto de la administración oral aguda de lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1) en ratones CD-1**. 2023. Tese (Licenciatura em Nutrição) - Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, 2023. Disponível em: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4341>. Acesso em: 30 jan. 2026.

OSTERNE, V. J. S.; DE SLOOVER, G.; VAN DAMME, E. J. M. Revisiting legume lectins: Structural organization and carbohydrate-binding properties. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 544, p. 109241, out. 2024.

OTON, Levi Ferreira. **Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos**. 2023. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/75856>. Acesso em: 30 jan. 2026.

PADUA, A.; LANNA, E.; KLAUTAU, M. Macrofauna inhabiting the sponge *Paraleucilla magna* (Porifera: Calcarea) in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 889–898, 2013.

PAUL, V. J. *et al.* Chemical Ecology of Marine Sponges: New Opportunities through “-Omics”. **Integrative and Comparative Biology**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 765–776, 1 out. 2019.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, [s. l.], v.109, p.347-352, 1995.

QUEIROZ, A. F. S. *et al.* Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 216–221, mar. 2008.

RABELO, L. *et al.* A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 727–743, 28 mar. 2012.

ROSSI, Maria Eleonora *et al.* Independent origins of spicules reconcile paleontological and molecular evidence of sponge evolutionary history. **Science Advances**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. eadx1754, 9 jan. 2026.

SAMANT, Sheetal Sadguru *et al.* The Ocean’s Treasure Trove: Bioactive Compounds from Sea Sponges. **Pharmacognosy Research**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 452–461, 10 abr. 2025.

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

SANTI MARTIGNAGO, Cintia Cristina *et al.* Exploring Antibacterial Properties of Marine Sponge-Derived Natural Compounds: A Systematic Review. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 43, 16 jan. 2025.

SANTOS, G. G.; BEZERRA, C. D. S.; NASCIMENTO, J. B. D. D. Esponjas: O tesouro escondido da zoologia - uma análise crítica dos livros didáticos. **Scientific Electronic Archives**, [s. l.], v. 17, n. 4, 28 jun. 2024.

SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, [s. l.], v. 13, n. spe, p. 64–70, 2004.

SARAIVA, M.A. Determination of the size parameters of  $\alpha$ -synuclein amyloid precursor forms through DLS analysis. **European Biophysics Journal**. [s. l.], p 1-14, 2025.

SCHNEEMANN, I. *et al.* Mayamycin, a Cytotoxic Polyketide from a *Streptomyces* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 1309–1312, 23 jul. 2010a.

SCHNEEMANN, I. *et al.* Nocapyrones A–D,  $\gamma$ -Pyrone from a *Nocardiopsis* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1444–1447, 27 ago. 2010b.

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

SCHRÖDER, H. C. *et al.* The Galactose-Specific Lectin from the Sponge *Chondrilla nucula* Displays Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity *in vitro* via Stimulation of the (2'-5') Oligoadenylate Metabolism. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 99–105, abr. 1990.

SELVIN, J. *et al.* Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 82–90, fev. 2010.

SEYREK, K.; RICHTER, M.; LAVRIK, I. N. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 981–993, jun. 2019.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, dez. 2006.

SHIMIZU, S.; ITO, M.; NIWA, M. Lectins In Hemolymph Of Japanese Horseshoe Crab, *Tachypleus-Tridentatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], p. 71–79, maio 1977.

SIMHA N., Akshaya *et al.* From sugar binders to diabetes fighters: the lectin saga of antihyperglycemic activity through systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 15, p. 1382876, 11 set. 2024.

SINGH, Keerti *et al.* Lectins as a promising therapeutic agent for breast cancer: A review. **Breast Disease**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 193–211, 20 jun. 2024.

SINGRANG, N. *et al.* Biochemical and structural characterization of a recombinant fibrinogen-related lectin from *Penaeus monodon*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2934, 3 fev. 2021.

SOL, F. G., *et al.* Lectinas. **Investigación y Ciencia**, [s. l.], v.361, p.58-67, 2006.

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**, [s. l.], v. 1865, n. 12, p. 129992, dez. 2021.

SOUSA, C. R.; YAMASAKI, S.; BROWN, G. D. Myeloid C-type lectin receptors in innate immune recognition. **Immunity**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 700–717, abr. 2024.

SRUTHY, S.; RATHEESH, S.; ARUN, A. R. A Lectin Isolated From Marine Sponge *Hyatella Cribriiformis* Exhibited Potential Antibacterial and Antiproliferative Activities. **Bio-Science Research Bulletin-Biological Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 16, 1 jan. 2025.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 227–237, ago. 1936.

THAKUR, D.; KUMAR, L. Biofilm-associated *Escherichia coli* infections: pathogenesis, clinical implications, and treatment strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], p. 1–45, 20 ago. 2025.

TORRES, R. C. F. *et al.* Structural insights and antimicrobial synergy of a proto-galectin from the marine sponge *Aiolochoxia crassa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 275, p. 111034, jan. 2025.

TURON, M. *et al.* Sponges and their microbiomes show similar community metrics across impacted and well-preserved reefs. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. AUG, p. 1–13, 2019.

UEDA, T. *et al.* Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 412–425, 1 abr. 2013.

URUÉN, C. *et al.* Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 3, 23 dez. 2020.

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

VASTA, Gerardo R.; AHMED, Hafiz. **Animal Lectins: A Functional View**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

VIANA, Lucas Alecrim Amorim. **Purificação, Caracterização E Estrutura Primária Parcial De Uma Lectina Da Esponja Marinha *Aplysina cauliformis***. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/59869>. Acesso em: 30 jan. 2026.

WAGNER-HÜLSMANN, C. *et al.* A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. **Glycobiology**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 785-793, 1996.

- WANGKANONT, K. *et al.* Structures of *Xenopus* Embryonic Epidermal Lectin Reveal a Conserved Mechanism of Microbial Glycan Recognition. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 291, n. 11, p. 5596–5610, mar. 2016.
- WANG, W. H. *et al.* The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 925–935, dez. 2020.
- WARKENTIN, R.; KWAN, D. H. Resources and Methods for Engineering “Designer” Glycan-Binding Proteins. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 380, 13 jan. 2021.
- WATARI, H. *et al.* A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 7262, 25 nov. 2022.
- WATERLOW, N. R. *et al.* Antimicrobial resistance prevalence in bloodstream infection in 29 European countries by age and sex: An observational study. **PLOS Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. e1004301, 14 mar. 2024.
- WATKINS, W. & MORGAN, W. Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars. **Nature**, [s. l.], v. 169, n. 4307, p. 825–826, mai. 1952.
- WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 19–34, jun. 1998.
- WILLIAMS, C. J. *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 293–315, 2018.
- YAMAUCHI, D.; MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 260, n. 1, p. 127–130, 15 jan. 1990.
- YOUSSEF, D. T. A. *et al.* Marmaricines A-C: Antimicrobial Brominated Pyrrole Alkaloids from the Red Sea Marine Sponge *Agelas* sp. aff. *marmarica*. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 80, 12 fev. 2025.
- XU, X.; DOOLITTLE, R. F. Presence of a vertebrate fibrinogen-like sequence in an echinoderm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 2097–2101, mar. 1990.
- ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 272, n. 24, p. 6179–6217, dez. 2005.