



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS

**Purificação, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano da lectina
da folha de *Guazuma ulmifolia* LAM**

Recife

2021

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS

Purificação, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano da lectina da folha de *Guazuma ulmifolia* LAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBAS/UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador (a): Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Recife
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, João Victor de Oliveira
Purificação, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano da lectina da
folha de *Guazuma ulmifolia* LAM / João Victor de Oliveira Santos. - 2021.

55 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Coorientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde da, Recife, 2021.
Inclui referências e apêndice.

1. Plantas medicinais. 2. Proteínas. 3. Lectinas. I. Porto, Ana Lúcia
Figueiredo (orientadora). II. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro
(coorientadora). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-374

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS

Purificação, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano da lectina da folha de *Guazuma ulmifolia* LAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBAS/UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 28/10/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora_
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Profa. Dra. Priscila Gubert
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Thiago Pajeú Nascimento
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dedicado aos meus companheiros da vida: **minha família e meus amigos**. Pois, mesmo alcançando o destino, sem vocês a estrada teria sido mais conturbada, a vista menos apreciada, e a vitória apenas um momento passageiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em todas as decisões e me oportunizar essa fase de aprendizado e crescimento intelectual, pessoal, profissional e também espiritual.

À minha orientadora Profa. Ana Porto, pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, pela oportunidade de realizar o mestrado com a senhora e por todo conhecimento que me foi oportunizado. A senhora é um exemplo de dedicação e competência. Obrigado professora.

Ao professor Romero, que me ajudou antes mesmo de me conhecer pessoalmente. Romero é pau pra toda obra, abraça tudo e a todos, mesmo quando não pode. Mas ele é assim, faz porquê ama. Que todos possam ter a oportunidade de trabalhar com o senhor, porque o conhecimento transborda, e que sorte a minha por ter tido essa chance. Obrigado professor.

À minha orientadora Profa. Isabella Macário, que me acolheu de braços abertos lá em 2017 e é uma das principais incentivadoras e responsáveis por eu ter chegado onde cheguei. Agradeço por todos os ensinamentos divididos, pelos momentos de alegria, preocupações, conquistas e conselhos dados, saiba que levarei pra sempre comigo. E me sinto muito orgulhoso de dizer que fui seu aluno. Obrigado professora.

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa LABTECBIO, aos pós-graduandos e aos pós-docs que me acolheram desde o primeiro dia que cheguei, muito obrigado. Diante de um momento tão tenso pra todos, o dia a dia com vocês tornou a jornada mais leve.

À Vivianne Cavalcante (Vivi), que nem segurou na mão, colocou no colo mesmo, e me ensinou um mundo novo em 6 meses, gratidão eterna. Encontrar alguém como você no mundo acadêmico, deve ser semelhante a publicar numa revista A1 sem revisões (isso ainda não consegui). Que a vida te retribua o tanto que você se doa, porquê você merece. Obrigado Vi.

A todos que fazem e fizeram parte do grupo de pesquisa MICRONAT, em especial a Sérgio e André, obrigado pela convivência, pela amizade, pela parceria nos momentos difíceis. Sem equipe não há pesquisa, e sem vocês não teria conquistado o pouco que conquistei.

Aos amigos da faculdade e da vida, que torcem e vibram com as minhas conquistas, mesmo que de longe, só gratidão por ter vocês na minha vida. Aos que estavam mais próximos dividindo os perrengues da vida acadêmica (Mauro, Renata, Beatriz, Vivi) eu afirmo com convicção, sem vocês ali segurando minha mão e me acalmando nos momentos em que duvidei de tudo, eu não teria conseguido. Minha eterna gratidão.

À minha família, agradeço o apoio incondicional em tudo que me proponho a fazer. Aos meus pais, irmãos, irmãs, cunhada, tias/tios, primos, cunhada, sobrinhos, avô, madrastra, muito obrigado por se fazerem presentes em minha vida. Vocês são a base de tudo em minha vida.

Ao meu pai, obrigado pela formação, por me mostrar por exemplo o caminho certo e pelo apoio incondicional. Te amo pai. Obrigado sempre.

À minha mãe, que tem sido meu norte durante toda minha existência, obrigado por ser você. Ela é exemplo, força e inspiração para todos que estão ao redor dela. E que sorte a minha, que ela tá sempre ao meu. Dizer que te amo e me declarar pra ti já virou clichê, mas amor bom, é amor clichê. Obrigado mãe.

À Universidade Federal de Pernambuco pelo conhecimento cedido.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, minha segunda casa desde 2016, pelo acolhimento, pelas oportunidades e pelos ensinamentos. E aos professores da Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Lectinas são proteínas (hemaglutininas) multivalentes encontradas de forma ubíqua na natureza, as quais podem apresentar atividade catalítica, reconhecimento de modo específico de carboidratos na superfície de microrganismos, bem como atividade citoprotetora frente antígenos e/ou patógenos. O objetivo deste trabalho foi isolar, purificar e caracterizar uma lectina presente na folha de *Guazuma ulmifolia* LAM (GuaZuL) e avaliar sua atividade antibacteriana. As folhas foram lavadas, secas, trituradas até a forma de pó. O extrato bruto (EB) foi obtido por agitação do pó das folhas (10%, p/v) durante 4 h em solução de NaCl 0,15 M, seguido de centrifugação. Em seguida, o EB foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio, onde a fração 0-40% apresentou maior atividade hemaglutinante (AH), sendo esta, submetida à cromatografia por troca iônica (aniônica) em DEAE-Sephadex. A amostra foi dialisada e liofilizada e submetida a SDS-PAGE, e a banda proteica visualizada foi denominada de GuazuL. Após esse procedimento a proteína foi caracterizada através de análises físico-químicas (temperatura, pH e íons). A detecção da lectina foi realizada através de testes de atividade hemaglutinante (AH) utilizando eritrócitos humanos (ABO) e sangue de coelho, pelo método de diluição seriada. Os ensaios antibacterianos foram realizados por meio do método de microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) frente a diferentes cepas bacterianas ATCCs. GuaZuL é uma glicoproteína de aproximadamente 35 kDa que aglutinou eritrócitos de coelho e humanos com maior especificidade para tipo sanguíneo B e foi inibida pelas glicoproteínas Azoalbumina, azocaseína e caseína. A lectina foi termoestável até 100°C, com maior estabilidade em pH 5.0-8.0 e os íons não afetaram sua atividade. Na avaliação da atividade antibacteriana, GuaZuL apresentou atividade bacteriostática e bactericida (CIM: 15,62 µg mL⁻¹; CBM: 15,62-62,5 µg mL⁻¹), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Em conclusão, a GuazuL é uma lectina obtida a partir das folhas de *G. ulmifolia*, termoestável, com amplo espectro de ação antibacteriana e com características relevantes que permitem a sua possível aplicação em diferentes processos biotecnológicos.

Palavras-chave: proteína; GuaZuL; mutamba; antimicrobiano.

ABSTRACT

Lectins are multivalent proteins (hemagglutinins) found ubiquitously in nature, which may have catalytic activity, specific recognition of carbohydrates present on the surface of microorganisms, as well as cytoprotective activity against antigens and/or pathogens. The objective of this work was to isolate, purify and characterize a lectin present in the leaf of *Guazuma ulmifolia* LAM (GuaZuL) and evaluate its antibacterial activity. The leaves were washed, dried, ground into powder. The crude extract (EB) was obtained by shaking the powder from the leaves (10%, w/v) for 4 h in 0.15 M NaCl solution, followed by centrifugation. Then, the EB was subjected to saline fractionation with ammonium sulfate, where the 0-40% fraction showed greater hemagglutinating activity (HA), which was subjected to chromatography by ion exchange (anionic) in DEAE-Sephadex. The sample was dialyzed and lyophilized and submitted to SDS-PAGE, and the protein band visualized was called GuaZuL. After this procedure, the protein was characterized through physicochemical analyzes (temperature, pH and ions). Lectin detection was performed through hemagglutinating activity (HA) tests using human erythrocytes (ABO) and rabbit blood, by the serial dilution method. And the antibacterial assays were performed through the broth microdilution method to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) against different bacterial strains ATCCs. GuaZuL is a glycoprotein of approximately 35 kDa that agglutinates rabbit and human erythrocytes with greater specificity for blood type B and was inhibited by the glycoproteins Azoalbumin, azocasein and casein. The lectin was thermostable up to 100 °C, with greater stability at pH 5.0-8.0, the ions did not affect its activity. In the evaluation of antibacterial activity, GuaZuL showed bacteriostatic and bactericidal activity (MIC: 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$; MBC: 15,62-62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. In conclusion, GuaZuL is a lectin obtained from the leaves of *G. ulmifolia*, thermostable, with a broad spectrum of antibacterial action and relevant characteristics that allow its possible application in different biotechnological processes.

Keywords: protein; GuaZuL; mutamba; antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Classificação das lectinas quanto a estrutura.....	17
Figura 2 –	Representação esquemática da atividade hemaglutinante em presença de eritrócitos promovida por lectinas.....	18
Figura 3 –	Representação esquemática da inibição da atividade hemaglutinante aglutinação promovida por carboidratos.....	18
Figura 4 –	Cromatografia de troca iônica.....	20
Figura 5 –	Cromatografia por afinidade.....	21
Figura 6 –	<i>Guazuma ulmifolia</i> LAM.....	24
Figura 7 –	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. A- Árvore; B- tronco; C- folhas; D e E- Folhas e flores; F e G- flor; H- frutos verdes; I e J- Frutos maduros (de cor preta); K- seção transversal da fruta; L- sementes.....	24
Figura 8 –	Cromatograma DEAE-Sephadex.....	33
Figura 9 –	Resultado colorimétrico da atividade antibacteriana de GuaZuL frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etapas do processo de purificação de lectina extraída de <i>G. ulmifolia</i> LAM.....	32
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante de GuaZuL.....	35
Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante da lectina purificada por carboidratos e glicoproteínas.....	36
Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante da lectina purificada por íons divalentes.....	37
Tabela 5 – Atividade antibacteriana de GuaZuL.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ATCC	American Type Culture Collection
AH	Atividade hemaglutinante
AMH	Ágar Müeller Hinton
BCA	Ácido bicinconínico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM-Celulose	Carboximetil-celulose
CMH	Caldo Müeller Hinton
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
DEAE-	
Celulose	Dietilaminoetil-celulose
EB	Extrato bruto
F0-40	Fração 0-40% do extrato
F40-70	Fração 40-70% do extrato
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
°C	Graus Celsius
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
CMH	Caldo Müeller Hinton
PACs	Proantocianidinas
PAMs	Proteínas ou peptídeos antimicrobianos
Pi	Ponto isoelétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	LECTINAS.....	16
2.1.1	Definição e classificação.....	16
2.1.2	Detecção e especificidade.....	17
2.1.3	Purificação de lectinas: Fracionamento salino e métodos cromatográficos.....	19
2.1.4	Caracterização de lectinas.....	21
2.1.5	Atividade antibacteriana de lectinas.....	22
2.2	<i>GUAZUMA ULMIFOLIA</i> LAM.....	23
3	ARTIGO 1 – PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE LECTINA DA FOLHA DE <i>GUAZUMA ULMIFOLIA</i> LAM.....	26
4	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	APÊNDICE A – POTENTIAL APPLICATION OF COMBINED THERAPY WITH LECTINS AS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR THE TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A humanidade tem utilizado as plantas medicinais, através da fitoterapia tradicional há milhares de anos, como base para o desenvolvimento de medicamentos e para tratamento de diversas enfermidades (Jamshidi-Kia, Lorigooini, Amini-Khoei, 2018). Apesar dos avanços, as infecções bacterianas permanecem como uma das principais causas de mortalidade e morbidade mundial (Kamaruzzaman et al., 2018). Em 2019, a taxa de mortalidade anual era em torno de 700.000 pacientes acometidos por infecções bacterianas associadas a resistência antimicrobiana. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a taxa de mortalidade anual em 2050 será de 10 milhões (Gosh et al., 2019).

A rica biodiversidade vegetal distribuída ao redor do mundo, inclui inúmeras plantas cujo potencial biotecnológico ainda não foi investigado, que podem ser essenciais para estudos atuais e futuros (Dar, Shahnawaz, Qazi, 2017). Dos medicamentos antimicrobianos atualmente disponíveis, cerca de 60% são derivados de plantas, e cerca de 50.000 espécies são destinadas para indústria farmacêutica e de cosméticos (Bakal, Bereswill, Heimesaat, 2017; Jamshidi-Kia, Lorigooini, Amini-Khoei, 2018). A identificação de compostos bioativos ao longo dos anos, tem estimulado estudos com foco em compostos derivados de plantas como fonte de novos medicamentos.

Lectinas podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se distinguem de outras macromoléculas pela seletividade na interação pelos carboidratos (Figueirôa et al., 2017). Vastamente encontrada em plantas, pode ser extraída de diferentes fontes como sementes, cascas, rizomas, folha. Além de diversos organismos, incluindo animais, vírus, bactérias, cianobactérias, entre outros (Figueirôa et al., 2017; Tsaneva, Van Damme, 2020).

A capacidade das lectinas de reconhecerem carboidratos presentes na superfície celular de microrganismos, despertou o interesse da aplicação biotecnológica destas biomoléculas para os mais diversos setores. O estudo da interação carboidrato-lectina, permitiu descobertas quanto as suas propriedades, incluindo sua atividade imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, inseticida, nematicidas e antibacteriana (Campos et al., 2016; De Medeiros et al., 2017; Bai et al., 2018; Camaroti et al., 2018; Gautam et al., 2018; Torres et al., 2019).

A atividade antibacteriana resulta da capacidade de interação entre lectinas e os carboidratos (lipopolissacarídeos e peptidoglicanos) por meio de ligações fracas, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Lagarda-Diaz; Guzman-Partida; Vazquez-Moreno, 2017). Essas ligações podem resultar na inibição do crescimento, aglutinação celular, regulação da adesão e migração de células microbianas, importantes mecanismos para bloqueio da invasão e da infecção (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018).

Guazuma ulmifolia Lam. (Malvaceae) é uma planta conhecida popularmente como mutamba (Dos Santos et al., 2018). Essa planta é encontrada comumente em países da América Latina, como no México, Cuba, Guatemala, Honduras, Equador e Brasil (Pereira et al., 2020). Suas propriedades medicinais já foram comprovadas através de estudos *in vitro* e *in vivo* e atribuídas a diferentes partes, incluindo sua folha, flor, fruta, casca do caule e raiz (Felipe et al., 2006; Al Muqarrabun, Ahmat, 2015; Pereira et al., 2019).

Tendo em vista os usos etnobotânicos de *G. ulmifolia* e seu potencial para a terapêutica, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a presença de lectina em folha de *Guazuma ulmifolia*, purificar, caracterizar, avaliar sua afinidade por carboidratos e/ou glicoproteínas e estabilidade frente a variações de temperatura, pH e íons divalentes, além de avaliar seu potencial antibacteriano.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Isolar, purificar, caracterizar e investigar o potencial antibacteriano da lectina presente na folha da *Guazuma ulmifolia* LAM.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto da folha da *Guazuma ulmifolia* LAM;
- Purificar parcialmente a lectina da folha da *Guazuma ulmifolia* LAM por fracionamento com sulfato de amônio;
- Purificar a lectina através de técnicas cromatográficas em resina de troca iônica e gel filtração;
- Caracterizar a lectina isolada por método eletroforético;
- Determinar a afinidade da lectina por carboidratos e/ou glicoproteínas;
- Avaliar sua estabilidade frente a variações de temperatura, pH e influências de íons;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da lectina através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

2 REVISÃO DE LITERATURA

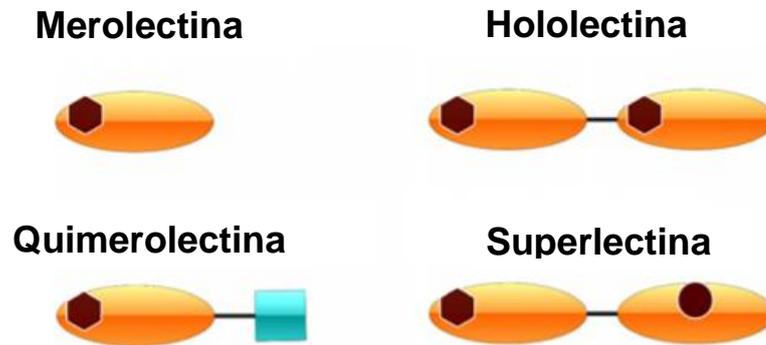
2.1 LECTINAS

2.1.1 Definição e classificação

Lectinas são glicoproteínas que contêm um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD- Carbohydrate Recognition Domain) para ligação de forma específica e reversível a mono, oligo ou polissacarídeos (Figueirôa et al., 2017; Elumalai et al., 2019). O primeiro relato de lectinas foi realizado por Stillmark em 1888 quando ele observou a capacidade de uma proteína, a ricina, de aglutinar eritrócitos durante um estudo de avaliação da toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (Kennedy et al., 1995). As lectinas foram relatadas primeiramente em plantas, porém atualmente sabe-se que são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontrada em animais, vírus, bactérias, cianobactérias, entre outros (Loris, 2002; Ferreira et al., 2011; Coelho et al., 2017).

Quanto à estrutura geral das lectinas de plantas é possível classificá-las em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (**Figura 1**). As merolectinas são proteínas que contêm um único domínio de ligação aos carboidratos. Devido a sua natureza monovalente, são incapazes de aglutinar células ou precipitação de glicoconjugados. As hololectinas, exibem dois ou mais domínios idênticos de ligação a carboidratos, sendo capazes de aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a esse grupo. As quimerolectinas são lectinas formadas pela fusão proteica de duas cadeias diferentes, onde uma cadeia expõe atividade catalítica ou alguma atividade biológica diferente da habilidade de ligação aos carboidratos, que atua de forma independente. Por fim, as superlectinas, que possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos não idênticos, exibindo a capacidade de identificar carboidratos diferentes (Lordache et al., 2015).

Figura 1 – Classificação das lectinas quanto à estrutura.



Fonte: Adaptado de Tsaneva, Van Damme (2020).

As lectinas também podem ser classificadas de acordo com o monossacarídeo ligante, podendo ser lectinas ligadoras de glicose/manose, ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, ligadoras de N-acetilglucosamina, ligadoras de L-fucose e lectinas ligadoras de ácido N-acetilneuramínico (Kumar et al., 2012).

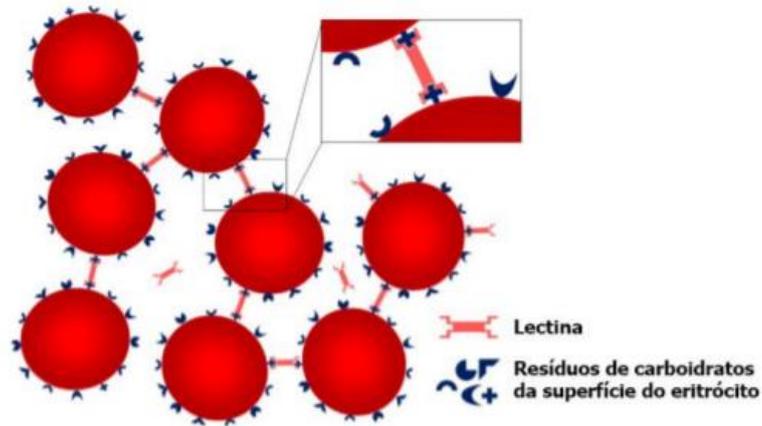
2.1.2 Detecção e especificidade

Lectinas possuem a capacidade de induzir a aglutinação celular, através do reconhecimento a estruturas de carboidratos presentes na superfície de eritrócitos humanos e/ou animais através de seus sítios de ligação (De Juan et al., 2017).

A presença dessas proteínas é detectada através de um ensaio de hemaglutinação (Correia et al., 2008). Apesar de técnicas mais modernas terem sido implementadas ao longo dos anos, até hoje a Atividade Hemaglutinante (AH) permanece como método mais utilizado para detecção de lectinas, devido a sua simplicidade de realização e obtenção de resultado (Paiva et al., 2010; Tsaneva, Van Damme, 2020).

Ao reconhecer o carboidrato na superfície dos eritrócitos, uma rede reticulada em suspensão se forma (**Figura 2**). Esses eritrócitos podem ser tratados previamente com enzimas (tripsina, papaína entre outros) ou soluções químicas (gluraldeído ou formaldeído) para o aumento da sensibilidade de aglutinação das células a lectina, além de aumentar a sua viabilidade (Sano, Ogawa, 2014).

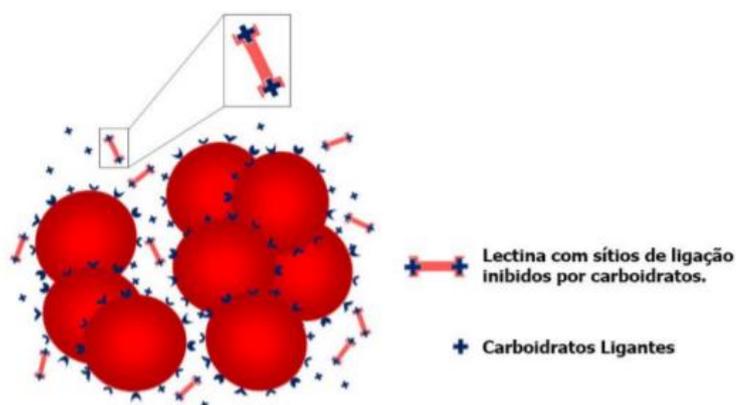
Figura 2 – Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas.



Fonte: Santos et al. (2014).

Taninos, lipídeos e fenóis quando em alta concentração podem gerar um resultado falso positivo. Assim são necessários ensaios subsequentes de inibição da AH por carboidratos distintos (Rüdiger, 1998; Correia et al., 2008). Além disso, através do ensaio de inibição, é possível descobrir a especificidade da lectina ao carboidrato, que é determinada por aquele que inibe mais efetivamente a AH (**Figura 3**).

Figura 3 – Representação esquemática da inibição da aglutinação promovida por carboidratos.



Fonte: Santos et al. (2014).

2.1.3 Purificação de lectinas: Fracionamento salino e métodos cromatográficos

A primeira etapa consiste na extração da biomolécula a partir do tecido animal ou vegetal. No caso das plantas, de suas folhas, sementes, cascas, rizomas, entre outros, que serão inicialmente triturados para aumento da área de exposição da proteína ao solvente, que pode ser uma solução salina ou solução tampão, submetidos a temperatura, tempo e agitação controladas (Moure, Sineiro, Domínguez, 2001; Karnchanatat, 2012). A preparação obtida, é centrifugada, e o sobrenadante é denominado extrato bruto (EB).

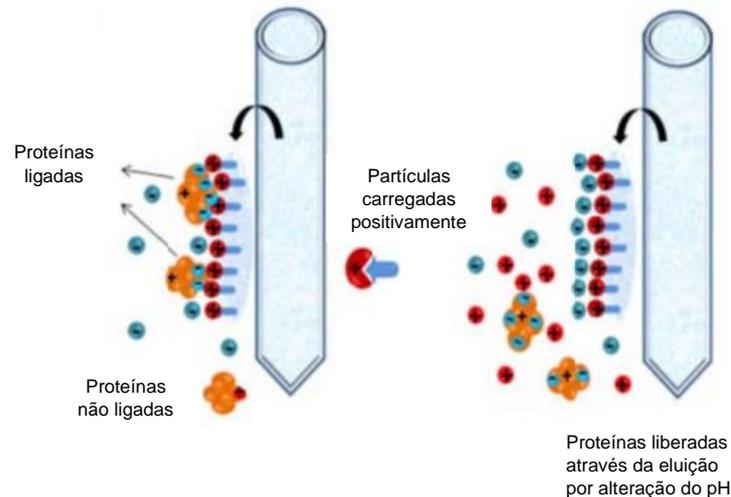
Em seguida, o extrato bruto é submetido a um processo de precipitação proteica em diferentes concentrações de um sal, sendo o sulfato de amônio o mais utilizado, devido a sua alta solubilidade, processo conhecido como *salting out* (Coelho, Da Silva, 2000). O sal é utilizado para remoção de contaminantes e outros constituintes (como polissacarídeos no caso das plantas), e purificação parcial do EB, obtendo uma amostra mais concentrada devido à redução da solubilidade das proteínas diante da elevada concentração de sais (Karnchanatat, 2012; Wingfield, 2016). A fração obtida é submetida a um processo de diálise, através de uma membrana semipermeável, onde as partículas grandes, como as proteínas ficam retidas no saco de diálise, enquanto as menores como sais, passam pela membrana e permanecem na solução (Shi, Lei, 2016).

O método clássico que permite a purificação final de lectinas, envolve as técnicas de cromatografia líquida em coluna. Nesse, o conteúdo proteico presente em uma mistura será dissolvido em um líquido (fase móvel), e irão se separar à medida que são aplicadas numa coluna sólida e porosa (fase estacionária) (Coskun, Ozlem, 2016). Essas técnicas separam proteínas explorando suas diferenças de polaridade (cromatografia de troca iônica), massa molecular (filtração em gel), e sua especificidade (cromatografia de afinidade) (Nascimento et al., 2012; Tsaneva, Van Damme, 2020).

A cromatografia de troca iônica se baseia na separação de proteínas com base na sua interação eletrostática com a matriz (**Figura 4**). A proteína irá se ligar à matriz de carga oposta a ela. A quebra da interação pode se dar através da mudança de pH ou adição de algum sal. Exemplos de matrizes de troca iônica são DEAE-Celulose (dietilaminoetilcelulose) matriz de troca aniônica carregada positivamente, e a CM-

Celulose (carboximetilcelulose) matriz de troca catiônica carregada negativamente (Coskun, Ozlem, 2016).

Figura 4 – Cromatografia de troca iônica.

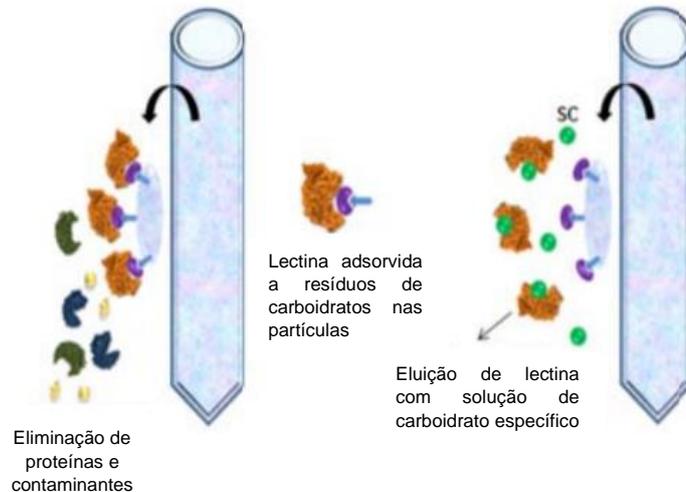


Fonte: Adaptado de Santos et al. (2013).

A cromatografia de filtração em gel, separa macromoléculas de acordo com o seu tamanho molecular. A amostra é aplicada no topo de uma coluna constituída por poros de um polímero insolúvel. Moléculas grandes passam continuamente, enquanto as menores ficam retidas nos poros. É um método que permite não só a separação, como também permite a caracterização de proteínas quanto ao seu peso molecular (Ó'Fágáin, Cummins, O'Connor, 2011). Sephadex e Sepharose são bastante utilizados como material da coluna (Determann, Helmut, 2012).

A cromatografia por afinidade explora a principal característica dessa biomolécula, que é a sua ligação específica e reversível a carboidratos. A lectina vai interagir com os ligantes que podem ser monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos ou ainda glicoproteínas, imobilizados a matriz (**Figura 5**). A proteína de interesse é obtida com alto grau de pureza em uma única etapa, alterando as condições de pH e/ou força iônica (Paiva et al., 2010; Coskun, Ozlem, 2016). Também são usados para purificação de hormônios, enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos (Wilchek, Chaiken, 2000).

Figura 5 – Cromatografia por afinidade.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2013).

2.1.4 Caracterização de lectinas

Métodos eletroforéticos são comumente empregados para separação e caracterização estrutural de lectinas, baseado na migração de macromoléculas carregadas através de uma matriz de gel por meio de um campo elétrico. Os géis de poliacrilamida geralmente são o meio de suporte ideal para eletroforese. Ele atua como uma peneira molecular, quanto maior for a concentração de acrilamida, menor o tamanho dos poros da matriz, e mais próximas do ponto de origem as proteínas maiores permanecerão (Maizel, 2000; Manns, 2011). Uma de suas vantagens é a separação e visualização da proteína, permitindo determinar a presença de distintas proteínas presentes numa mistura (Westermeier, Reiner, 2014).

O método universalmente utilizado é a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença do detergente Dodecil sulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE) (Rath et al., 2009). O SDS promove a desnaturação inicial das proteínas, conferindo carga negativa proporcional à sua massa molecular. Essa etapa é seguida da eletroforese, que irá separar as proteínas com base na massa molecular (Manns, 2011). Por ser submetida a condições desnaturantes, não requer as condições nativas daquela proteína, revelando assim o grau de pureza de amostras proteicas, composição de subunidades, peso molecular, avaliação da expressão, dentre outros (Coelho, Da Silva, 2000; Nowakowski, Wobig, Petering, 2014).

Diferentes ensaios podem ser realizados para avaliação da estabilidade proteica frente diferentes fatores físicos e/ou químicos. A depender das condições do meio em que estão, proteínas podem perder sua atividade biológica. Assim, a estabilidade das lectinas varia quando expostas a diferentes agentes físicos como temperatura, agitação, radiações, assim como agentes químicos como ácidos, bases, solventes, detergentes e metais pesados. Esses agentes podem influenciar na quebra de ligações químicas (pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals e eletrostáticas) presentes na estrutura nativa daquela proteína, impedindo a sua funcionalidade (Moraes et al., 2013).

O pH apresenta um efeito variado sobre as lectinas, podendo ou não afetar a sua AH (Wititsuwannakul et al., 1998). Valores de pHs extremos podem induzir a uma desnaturação proteica, a partir da exposição de regiões hidrofóbicas, que poderá gerar agregados (por interação hidrofóbica) levando à precipitação da mesma (Konozy et al., 2003). Quanto ao efeito da temperatura, variações bruscas de temperatura podem levar a sua precipitação e a perda de função. Cada proteína apresenta uma certa estabilidade para determinada temperatura, podendo ser ou não desnaturadas pela baixa ou alta temperatura (Suseelan et al., 2002; Moraes et al., 2013). Adicionalmente, é importante avaliar a função de diferentes íons para as lectinas exercerem sua atividade biológica, principalmente os íons de Ca^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+} . A ocupação dos sítios de ligação por esses íons gera uma alteração na conformação da lectina, promovendo o reconhecimento do carboidrato pelo qual tem afinidade. Algumas lectinas não requerem desses íons para sua atividade, pois possuem a conformação estrutural necessária para o reconhecimento aos carboidratos (Zanetti, 2007; Favero et al., 2019). Esses ensaios são importantes não somente com o intuito de definir as características da molécula, mas para definição do melhor parâmetro que venha a contribuir na sua futura aplicação biológica.

2.1.5 Atividade antibacteriana de lectinas

Diferentes proteínas com atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica ou antiparasitária, já foram isoladas de raízes, sementes, flores, caules e folhas de uma ampla variedade de espécies de plantas (Montesinos, 2007). Estudos tem priorizado a investigação de compostos antimicrobianos de plantas medicinais, visto que as

mesmas têm sido uma fonte inestimável de diversos compostos com utilidade terapêutica (Khan, Gurav, 2018).

Proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem uma classe heterogênea de proteínas, descritos como componentes importantes do sistema de defesa das plantas, e surgem como candidatos promissores para combater infecções. As lectinas se destacam, uma vez que podem inibir o crescimento de microrganismos e/ou serem agentes bactericidas (Barbosa Pelegrini et al., 2011; Sinha, Shukla, 2019).

A atividade antibacteriana das lectinas é resultado de sua interação com o ácido teicóico, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, constituintes da parede celular bacteriana (Bourne et al., 1996). Também tem sua ação através de diferentes mecanismos, como alteração da permeabilidade celular, formação de poros e consequente extravasamento de conteúdo extracelular (Mukherjee et al., 2014).

Lectinas antibacterianas já foram isoladas de animais como *Bothrops leucurus* (Dos Santos Nunes et al., 2011), *Eriocheir sinensis* (Huang et al., 2014), *Marsupenaeus japonicus* (Zhang et al., 2014), e plantas tais como *Eugenia uniflora*, *Phthirusa pyrifolia* e *Myracrodruon urundeuva* (Paiva et al., 2010). As lectinas podem inibir o crescimento celular, através da alteração da permeabilidade celular, redução da absorção de nutriente, formação de poros, induzindo a morte celular bacteriana pelo extravasamento do conteúdo extracelular e/ou através da interação com receptores de membrana que promovem respostas intracelulares (Mukherjee et al., 2014; Procópio et al., 2017).

Além disto, esses compostos apresentam vantagens como menor propensão das bactérias desenvolverem resistência devido ao diferente mecanismo de ação em comparação aos antimicrobianos utilizados na clínica, e menor custo por ser renovável por natureza (Gur, Turgut-Balik, Gur, 2006; Hemaiswarya, Kruthiventi, Doble, 2008; Hollmann et al., 2018).

2.2 GUAZUMA ULMIFOLIA LAM.

Guazuma ulmifolia Lam., pertencente à família Malvaceae, é conhecida popularmente como mutamba ou mutambo, nome de origem Tupi guarani que significa “fruta dura” (**Figura 6**). Outras nomenclaturas incluem guácimo, guaximacho, pau-de-bicho, algodão ou coração-de-negro, dentre outros (Nunes et al., 2015; Castillo-Diaz, Urzedo, Rodrigues, 2019). É uma espécie arbórea tropical, de

copa larga, de 8 a 16 m de altura em média, podendo chegar até 30 m de altura (Scalon et al., 2011).

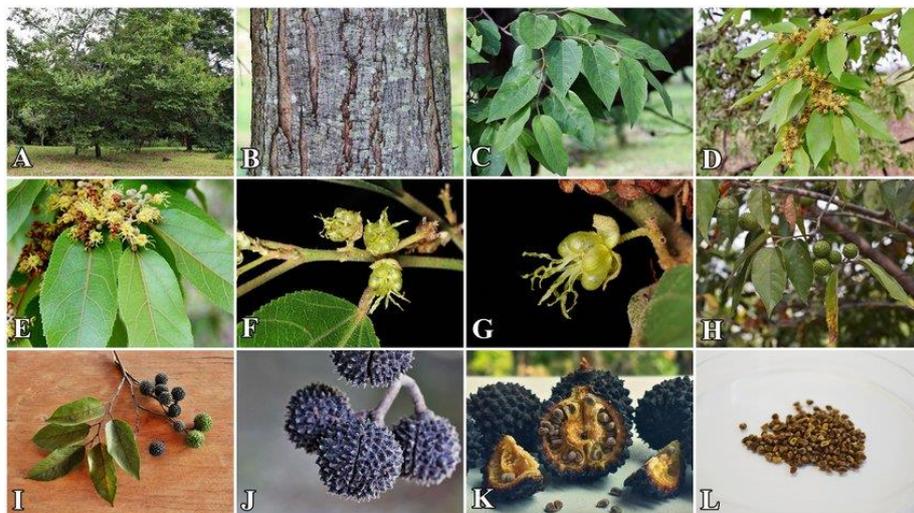
Figura 6 – *Guazuma ulmifolia* LAM.



Fonte: Castillo-Diaz, Urzedo, Pina (2019).

Com tronco levemente tortuoso, apresenta numerosos ramos, flores amarelas irregulares, fruto globosos e de cor negra, com muitas sementes pequenas e esbranquiçadas (**Figura 7**) (Scalon et al., 2011).

Figura 7 – *Guazuma ulmifolia* Lam. A- Árvore; B- tronco; C- folhas; D e E- Folhas e flores; F e G- flor; H- frutos verdes; I e J- Frutos maduros (de cor preta); K- seção transversal da fruta; L- sementes.



Fonte: Pereira et al. (2019).

Sua época de floração varia de acordo com a localidade. No Mato Grosso acontece de fevereiro a outubro, em São Paulo e Minas Gerais de setembro a dezembro, e em Pernambuco de novembro a abril (Pereira, 2007). No Brasil, pode ser encontrado do norte a sul do país, em áreas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica e às margens de pequenos cursos de água (Brandão et al., 2002; Carvalho, 2006; Castillo-Diaz, Urzedo, Rodrigues, 2019).

Devido as suas características de rápido crescimento, tolerância a secas temporárias e resistência ao fogo, são bastante utilizadas para restauração florestal em toda a América Latina (Campos-Filho, Sartorelli, 2015; Pereira et al., 2019). Além disso, estudos etnofarmacológicos descrevem o potencial antidiabético de folhas (Adnyana, Yulinah, Yuliet, 2013), efeitos hipotensores e vasorrelaxantes da casca do caule (Magos et al., 2008), atividade gastroprotetora (Berenguer et al., 2007) e anti-hipercolesterolêmica das folhas de *G. ulmifolia* (Sukandar, Nurdewi, Elfahmi, 2012). Posteriormente suas atividades antimicrobiana, antioxidante, antiprotozoária e cardioprotetora foram comprovados através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Pereira et al., 2019).

Assim, *G. ulmifolia* é uma espécie com uma ampla gama de propriedades medicinais intrínsecas, pois é uma fonte potencial de compostos fenólicos bioativos, com potencial exploratório para diversos fins. A investigação das possíveis atividades biológicas das lectinas aumentou nos últimos anos diante dos resultados positivos observados pela comunidade científica.

3. ARTIGO 1 – PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE LECTINA DA FOLHA DE GUAZUMA ULMIFOLIA LAM

João Victor de Oliveira Santos^a, Vivianne Lays Ribeiro Cavalcante^b, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa^d, Silvio Assis de Oliveira Ferreira^b, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{a,c*}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,d}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brasil.

^c Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

^d Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author:

Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Fone: 21012501, Recife/PE, Brasil

Email: isabella.cavalcanti@ufpe.br

RESUMO

O objetivo desse estudo foi isolar, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana da lectina da folha de *Guazuma ulmifolia* LAM (GuaZuL). As folhas foram lavadas, secas,

trituras até a forma de pó. O extrato bruto (EB) foi obtido por agitação do pó das folhas em solução de NaCl 0,15 M, seguido de centrifugação. Em seguida, o EB foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio, sendo o precipitado submetido à cromatografia por troca iônica (aniônica) em DEAE-Sephadex. A amostra foi dialisada e liofilizada e submetida a SDS-PAGE, e a banda proteica visualizada foi denominada de GuaZuL. Após esse procedimento a proteína foi caracterizada através de análises físico-químicas (temperatura, pH e íons). A detecção da lectina foi realizada através de testes de atividade hemaglutinante (AH) utilizando eritrócitos humanos (ABO) e sangue de coelho, pelo método de diluição seriada. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a atividade antibacteriana, a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A lectina foi obtida a partir do extrato da folha com NaCl 0,15M, sendo submetida a um único procedimento cromatográfico em DEAE-Sephadex e exibiu um único pico (~35 kDa), com um fator de purificação de 12,23. GuaZuL é uma glicoproteína que aglutinou eritrócitos de coelho e humanos com maior especificidade para tipo sanguíneo B, e foi inibida pelas glicoproteínas Azoalbumina, azocaseína e caseína. Essa lectina foi termoestável até 100 °C, com maior estabilidade em pH 5.0-8.0, os íons não afetaram sua atividade. GuaZuL mostrou ser um agente bacteriostático e bactericida frente as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (CIM: 15,62 µg mL⁻¹; CMB: 15,62 – 62,5 µg mL⁻¹). Assim, GuaZuL se mostrou uma lectina termoestável, com amplo espectro de ação antibacteriana se mostrando como uma promissora opção terapêutica para o tratamento de infecções bacterianas.

Palavras-chave: proteína, GuaZuL, mutamba, antimicrobiano.

1. Introdução

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se distinguem de outras macromoléculas pela seletividade na interação com carboidratos através de pelo menos um domínio não catalítico (Figueirôa et al., 2017). Vastamente encontrada em plantas, elas podem ser extraídas de diferentes fontes como

sementes, cascas, rizomas, folha. Além de diversos organismos, incluindo animais, vírus, bactérias, cianobactérias, entre outros (Figueirôa et al., 2017; Tsaneva, Van Damme, 2020).

Lectinas vegetais são descritas como componentes importantes do sistema de defesa das plantas para combater fungos, bactérias e insetos (De Souza Cândido et al., 2011). As lectinas podem inibir o crescimento de microrganismos e/ou serem agentes bactericidas através da sua interação com diferentes glicoconjugados. (Barbosa Pelegrini et al., 2011; Sinha, Shukla, 2019). Além disso, as interações lectina-carboidrato têm sido associadas a diversas aplicabilidades (Jandú et al., 2017).

Guazuma ulmifolia Lam. (Malvaceae) é conhecida popularmente como mutamba, e ocorre em quase todo o Brasil (Dos Santos et al., 2018). Devido as suas características de rápido crescimento, tolerância a secas temporárias e resistência ao fogo, são bastante utilizadas para restauração florestal em toda a América Latina (Campos-Filho, Sartorelli, 2015; Pereira et al., 2019). Além disso, estudos etnofarmacológicos já descreveram o potencial antidiabético de folhas (Adnyana, Yulinah, Yuliet, 2013), efeitos hipotensores e vasorrelaxantes da casca do caule (Magos et al., 2008), atividade gastroprotetora (Berenguer et al., 2007) e anti-hipercolesterolêmica das folhas de *G. ulmifolia* (Sukandar, Nurdewi, Elfahmi, 2012). Posteriormente suas atividades antimicrobiana, antioxidante, antiprotozoária e cardioprotetora foram comprovados através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Pereira et al., 2019).

O aumento da resistência antimicrobiana representa uma crise global, que ameaça pacientes, o sistema de saúde e a economia global. Devido ao arsenal de fatores de virulência e resistência, bactérias tem se sucedido em provocar infecções graves (Campos, Antunes, Ferreira, 2020). Embora nos últimos anos, tenha se observado a introdução de novos antibióticos na prática clínica, resistência a vários desses agentes também tem sido relatadas (Tamma et al., 2020). Esse cenário reafirma a necessidade do desenvolvimento/descobertas de novas terapias antimicrobianas, como uma possibilidade de aliviar a pressão seletiva da terapia antimicrobiana tradicional (Morrison, Zembower, 2020).

Apesar do aumento da investigação das possíveis atividades biológicas das lectinas nos últimos anos diante dos resultados positivos que estas tem apresentado a comunidade científica, não foram encontrados na literatura trabalhos sobre lectinas extraídas de *Guazuma ulmifolia* LAM. Assim, o objetivo do presente estudo foi a

purificação de uma lectina extraída da folha de *G. ulmifolia* e investigação do seu potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal e preparação de extrato

As folhas de *Guazuma ulmifolia* LAM foram recolhidas na região rural da cidade de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Elas foram lavadas e secas em estufa a 37 °C, e trituradas com um moinho de facas cegas. Uma suspensão a 10% (p/v) em NaCl 0,15 M foi preparada e a extração foi obtida por 4 horas sob agitação constante. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4 °C a 6.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante resultante, extrato bruto, foi submetido à precipitação salina com sulfato de amônio na fração de 0-40%, 40-70%. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 4 °C a 12.000 x g por 20 minutos e o precipitado resultante, foi dialisado em membrana semipermeável de celulose em NaCl 0,15 M a 4 °C por 1 hora (Costa et al., 2010).

2.2 Atividade Hemaglutinante

A atividade de hemaglutinação (AH) foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços utilizando uma suspensão de eritrócitos de coelho ou suspensões de sangue humano (A, B, O e AB) (2,5% v / v) anteriormente tratado com glutaraldeído. Inicialmente, 50 µL da amostra foram diluídos em NaCl 0,15 M e depositadas nos poços, em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço. A AH foi definida como o inverso do título que corresponde a menor diluição da amostra que apresentou hemaglutinação completa, após incubação por 45 min. A AH específico foi definido como a razão entre a AH e a concentração de proteína (mg mL⁻¹). Esta atividade foi realizada após cada etapa de purificação e testes de caracterização de lectina (Correia, Coelho, 1995).

2.3 Teor de proteína

A dosagem de proteína durante as etapas de extração e purificação da lectina foi calculada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA), onde 25 µL da amostra foram adicionados a 200 µL de solução de BCA em uma microplaca e incubado a 37

°C durante 30 min. As absorbâncias foram medidas a 595 nm em um leitor de microplaca (iMark™ Microplate Absorbance Reader - Bio Rad) (Smith et al., 1985).

2.4 Purificação da lectina de *Guazumia ulmifolia* LAM

DEAE-Sephadex (5 mL) foi equilibrada com NaCl 0,15 M, e teve seu fluxo ajustado para 1 mL/min. Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com o mesmo tampão de equilíbrio. Feito os devidos passos de ativação da coluna, com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, respectivamente, foi feita a corrida cromatográfica, utilizando uma alíquota de 1 mL de precipitado. A eluição do material adsorvido foi efetuada com NaCl 0,5 M. Frações de 1 mL foram coletadas e lidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm. As frações obtidas (não-adsorvidas e adsorvidas) foram reunidas para análise de AH e dosagem de proteínas (Costa et al., 2010).

2.5 Eletroforese em gel

A eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada usando um gel de poliácrlamida a 12% de acordo com o método de (Laemmli, 1970) e uma amostra de 10 µL, correspondendo a 1000 µg de proteína. A massa molecular foi calibrada usando um marcador de massa molecular (GE Healthcare 17044601, São Paulo, SP, Brasil) como padrão. As bandas de proteína foram detectadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250.

2.6 Especificidade para carboidratos e glicoproteínas

A especificidade para carboidratos e glicoproteínas foi avaliada em placas de microtitulação segundo Correia e Coelho (Correia, Coelho, 1995). A lectina (50 µL) foi diluída em série nas soluções de carboidratos. Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão de hemácias de coelho a 2,5% (v/v). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 45 min para avaliar a inibição da atividade hemaglutinante. Os açúcares avaliados foram: arabinose, frutose, glicose, galactose, rafinose, lactose e N-acetil-D-glucosamina, todos a 0,4 M. As glicoproteínas utilizadas a 1 mg/mL foram azoalbumina, caseína e azocaseína.

2.7 Efeitos de íons divalentes, pH e temperatura

O efeito dos íons divalentes na AH da lectina foi determinada com 10 mM de

FeO₄S, MgSO₄, Na₂S₂O₃, ZnCl₂ e CaCl₂. Em seguida, eritrócitos humano tipo B, foram adicionadas em cada poço, incubadas por 45 min em temperatura ambiente, e a AH foi avaliada.

A atividade hemaglutinante foi avaliada em eritrócitos humano tipo B, em diferentes valores de pH e após aquecimento a diferentes temperaturas. O efeito do pH na AH foi realizado em diferentes soluções de citrato-fosfato pH 5,0 e 6,0; Tris – HCl pH 7-9; glicina-NaOH pH 10-12, incubadas por 30 min em temperatura ambiente. O efeito da temperatura foi avaliado incubando a 70, 80, 90 e 100 °C por 30, 60 e 90 min antes de realizar o ensaio de hemaglutinação.

3.0 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Inicialmente, o caldo Müller Hinton (CMH) foi adicionado em placas de microdiluição. Em seguida, a lectina foi adicionada por diluição seriada para obter as concentrações de 0,9 a 500 µg/mL. As suspensões dos isolados clínicos bacterianos foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de McFarland, e em seguida, depositadas nos poços, obtendo uma concentração final de 10⁵ UFC/poço. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e após a incubação foi feita a leitura utilizando a resazurina, um corante de viabilidade celular, e leitura por espectrofotometria utilizando leitor de placa de Elisa no comprimento de onda de 620 nm (Multiskan FC - Thermo Scientific). No método da resazurina os poços que apresentam coloração rosa, indicam crescimento bacteriano, poços azuis representam a morte das bactérias, e os poços roxos indicam inibição do crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir mais de 90% do crescimento microbiano. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota da amostra dos poços em que não houve crescimento foi inoculada em ágar Müller Hinton (AMH) e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após este período, a CBM foi determinada como a menor concentração que não houve crescimento microbiano (CLSI, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento da lectina

O extrato da folha de *G. ulmifolia* LAM foi obtido a partir da extração com solução salina 0,15 M, seguido de fracionamento com sulfato de amônio em duas etapas: F0-40% (AH: 1024), F40-70% (AH: 256). A fração 0-40% por ter apresentado maior AH foi escolhida para dar continuidade ao protocolo de purificação (**Tabela 1**). Diversos estudos utilizam o fracionamento com sulfato de amônio para isolamento e purificação parcial de lectinas, como por exemplos, De Freitas Pires et al., (2019) com a purificação da LCaL, lectina da semente de *Lonchocarpus campestres*, e El-Araby et al. (2020) na purificação e caracterização de lectina extraída da semente de uma leguminosa egípcia. Além disso, pós precipitação com sulfato de amônio, a AH da lectina pode se manter estável após longo período de armazenamento (Kennedy et al., 1995).

Tabela 1. Etapas do processo de purificação de lectina de *G. ulmifolia* LAM.

Fração	Proteína (mg mL ⁻¹)	^a AH	^b AHE (AH/mg mL ⁻¹)	^c Purificação
Extrato bruto	52,859	262144	4,95	1.0
F 0-40%	39,93	1024	25,26	1.2
DEAE- Sephadex	1,057	64	60,54	12,23

^a AH - Atividade hemaglutinante.

^b AHE - Atividade hemaglutinante específica com eritrócitos de sangue humano tipo B

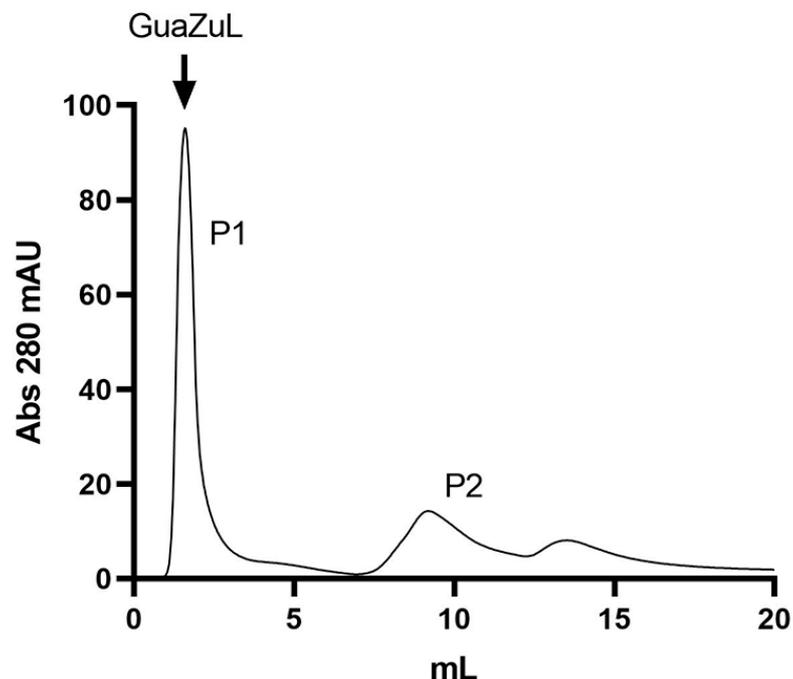
^c Purificação – relação entre AHE do extrato bruto e da AHE da lectina.

A cada etapa se observa uma redução da proteína total e um aumento da AHE, o que sugere eficiência no processo de isolamento e pré-purificação da lectina. Após purificação é possível observar que a AHE foi 12,23 maior, indicando uma maior

concentração de lectinas. Na sequência o precipitado foi submetido a cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex, visando separar a lectina de outros compostos. Onde se obteve uma amostra com uma concentração de 1 mg, AHE de 60,54 correspondente a um fator de purificação de 12,23 vezes (Tabela 1).

Devido o extrato apresentar uma forte pigmentação esverdeada, a resina de troca iônica também foi utilizada para esse fim, visto que a mesma pode ser usada para clarificar solução de extratos (Shi, Lei, 2016). A amostra também foi purificada em coluna DEAE-Sephadex em sistema de cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC), no qual o cromatograma mostrou 2 picos, o P1 obtido durante a fase não adsorvida, e o PII, adsorvido obtido através do gradiente salino (**Figura 8**). No entanto, apenas P1 promoveu aglutinação dos eritrócitos, como se pode observar na figura 8, e esse pico foi chamado de GuaZuL. O P2 por não ter AH, foi considerado um contaminante.

Figura 8. Cromatografia por troca iônica em DEAE-Sephadex.



A purificação de diferentes lectinas já foi obtida em apenas uma etapa por cromatografia de troca iônica. A EuniSL, lectina extraída da semente de *Eugenia uniflora* L, foi obtida por cromatografia de troca iônica utilizando a matrix DEAE-Sephadex (Oliveira et al., 2008), e a LMA, lectina extraída da semente de *Macrotyloma*

axillare obtida através de cromatografia de troca iônica utilizando a matrix Q-Sepharose (De Santana et al., 2008).

GuaZul foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após coloração, o gel evidenciou uma única banda proteica, confirmando a pureza da amostra, que tem aproximadamente 35 kDa. Outras lectinas com tamanho semelhante foram descritas na literatura, tais como Ddel (38 kDa), glicoproteína extraída da semente de *Dypsis decaryi*, a SAL (39 kDa), lectina extraída da semente de *Sophora alopecuroides*, e a lectina extraída da semente de *Archidendron jiringa* (35.7 kDa) (Charungchitrak et al., 2011; Li et al., 2012; Torres et al., 2019).

4.2 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da lectina foi verificada usando eritrócitos humanos (A, B, O) e de coelho. O presente estudo observou que a lectina apresentou AH frente a todos os tipos de eritrócitos testados, o que indica uma natureza não específica de grupo sanguíneo (**Tabela 2**). A EuniSL também aglutinou de forma não específica eritrócitos humanos e de coelho (Oliveira et al., 2008). No entanto, GuaZul demonstrou preferência por sangue do tipo B, evidenciada pelos seu maior valor de AH, assim como a lectina extraída da semente de *Entada rheedii* (Naik, Sumar, 2020). A detecção de lectinas a partir da aglutinação de diferentes grupos sanguíneos, se baseia no reconhecimento de glicoproteínas presentes na superfície de hemácias às quais a lectinas podem se ligar (Moreira et al., 1991; El-Araby et al., 2020). Essas diferenças de aglutinação podem ser resultado, de um fraco ou de não reconhecimento das glicoproteínas presentes na superfície dos eritrócitos pela lectina (Oliveira et al., 2002).

Tabela 2. Atividade hemaglutinante de GuaZuL.

<i>Espécies</i>	Atividade hemaglutinante (HA)
Coelho	32
Eritrócitos de sangue humano	
A+	32
B+	64
O+	32
AB+	32

4.3 Inibição por carboidratos e glicoproteínas

O ensaio de inibição da AH da lectina por açúcares e glicoproteínas, mostrou que a AH não foi inibida por monossacarídeos ou oligossacarídeos (**Tabela 3**). No entanto, foi totalmente inibida por três glicoproteínas (Azoalbumina, azocaseína e caseína), indicando uma especificidade para açúcares complexos. Assim como a DdeL, lectina extraída da semente de *Dypsis decaryi* (Torres et al., 2019), a cMol, lectina da semente de *Moringa oleífera* (Santos et al., 2009) e a EuniSL, lectina da semente de *Eugenia uniflora* (Oliveira et al., 2008), todas inibidas por carboidratos complexos. Através desse ensaio, não só foi possível identificar a especificidade da lectina, como também, se confirmou que o agente em questão responsável pela aglutinação, era de fato, uma lectina (Rüdiger, H., 1998; Correia et al., 2008).

Tabela 3. Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos e glicoproteínas.

GuaZuL	AH 64
Carboidratos:	Inibição
Frutose	64 (NI)
Glicose	64 (NI)
Arabinose	64 (NI)
Galactose	64 (NI)
N-acetil-D-glicosamina	64 (NI)
Rafinose	64 (NI)
Lactose	64 (NI)
Glicoproteínas:	
Azoalbumina	0
Azocaseína	0
Caseína	0

Os ensaios foram realizados com eritrócitos humanos tipo B.

*NI: nenhuma inibição detectada.

4.4 Efeito dos íons

Segundo Silva e colaboradores (2014), algumas lectinas dependem de íons metálicos para exercer sua atividade hemaglutinante. Esses íons são responsáveis por estabilizar a ligação ao CRD, além de fixar os resíduos de aminoácidos que interagem com o carboidrato ligante (Moreira et al., 1991). Através do ensaio de íons, se observou a AH não foi afetada quando na presença dos íons. No entanto quando

incubada com o Ca^{2+} , a lectina teve sua AH reduzida pela metade, diferentemente quando na presença dos íons de Fe^{2+} e Zn^{2+} , na qual a AH foi potencializada, sendo superior ao controle (**Tabela 4**). Similarmente a cMoL, cuja AH aumentou na presença dos íons de Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+ (Santos et al., 2009). Já a SteLL, não foi afetada na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Gomes et al., 2013). E a CVL, lectina de *Chlorella vulgaris*, teve sua atividade fortemente reduzida na presença dos íons metálicos monovalentes e divalentes (Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+}) (Cavalcanti et al., 2021).

Tabela 4. Inibição da atividade hemaglutinante por íons divalentes.

Íons divalentes (10 mM)	Atividade hemaglutinante (AH)
Controle	64
FeS	128
ZnCL ₂	128
MgSO ₄	64
Na ₂ S ₂ O ₃	64
CaCl ₂	32

4.5 Efeito do pH

Outro fator relevante no estudo da estabilidade da molécula proteica é o pH. Assim, se avaliou a AH frente a variações de pH, e se observou que a AH da GuazuL apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 5.0-8.0. Similarmente a lectina de *Euphorbia antiquorum* (EanH) (5.0-9.0) (Gautam et al., 2018). No entanto, houve uma gradual diminuição da atividade a partir do pH 9.0. GuaZuL ainda reteve 50% da atividade até pH 11, e 25% em pH 12, diferentemente da lectina de *Entada rheedii*, que perdeu totalmente sua atividade em pHs acima de 10 (Naik, Sumar, 2020).

Proteínas apresentam um pH ótimo de atuação, no qual sua atividade é máxima. Variações de pH tendem a modificar a carga líquida de proteínas, promovendo a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura proteica

ocasionando a sua desnaturação e conseqüentemente perda de sua atividade biológica (Procópio et al., 2017; Silva et al., 2019).

4.6 Efeito da temperatura

Através do ensaio de estabilidade térmica, verificou-se que a lectina da folha de *G. ulmifolia* é uma proteína termoestável, mantendo sua AH após aquecimento a 70, 80, 90 e 100 °C por 90 min. Aos 70 °C sua AH permaneceu numa titulação de 64 durante todo o tempo avaliado. A 80 °C, a AH foi decrescente, de 256, 128, 64 para os três tempos, respectivamente. A 90 °C sua AH foi de 128, 256 e 256, e a 100 °C a AH permaneceu em 256.

A estabilidade térmica é comumente relatada em lectinas de plantas, como a DdeL e a CasuL, lectina extraída da folha de *Calliandra surinamensis*, mantiveram sua atividade AH após aquecimento em todas as temperaturas testadas (30-100 °C) (Procópio et al., 2017; Torres et al., 2019). Outras lectinas, como a lectina extraída de *Egletes viscosa* (EgviL), tem sua AH reduzida de 128 para 16 quando expostas a temperatura entre 70-100 °C (Goes et al., 2021). E em geral, essa estabilidade varia de acordo com a complexidade da estrutura terciária, grau de dependência da estrutura da proteína nas ligações de hidrogênio e grau de glicosilação da proteína (Procópio et al., 2017; Naik, Sumar, 2020).

4.7 Atividade antibacteriana

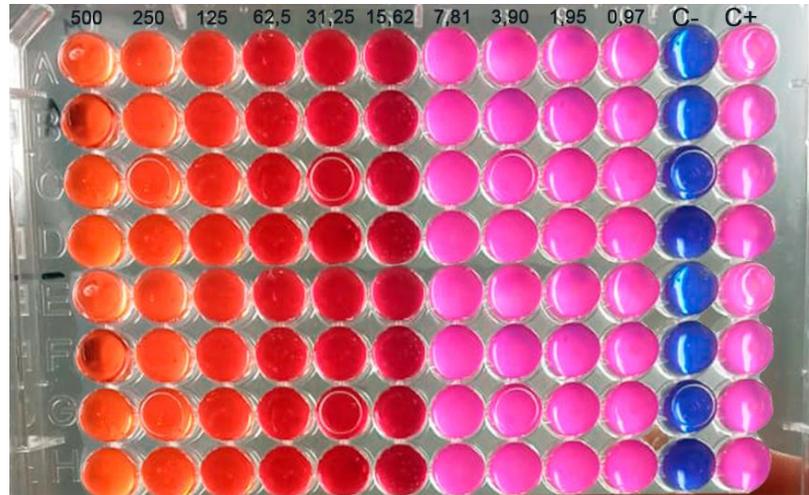
Os resultados da atividade antibacteriana mostraram que a lectina de *G. ulmifolia* possui um amplo espectro de ação, pois apresentou atividade bacteriostática e bactericida *in vitro* frente a todas as cepas testadas (CIM: 15,62 µg mL⁻¹; CBM: 15,62-62,5 µg mL⁻¹), atuando de forma não seletiva frente a importantes bactérias patogênicas humanas (**Tabela 5**). A **Figura 9** representa os resultados da CIM de GuaZul através do método da rezasurina. GuaZuL, por ter potencial oxidante, reagiu com a rezasurina gerando uma coloração laranja-avermelhada.

Tabela 5. Atividade antibacteriana de GuaZuL.

Microrganismos	Faixa de concentração 0,9 – 500 µg mL ⁻¹	
	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,62	31,25
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 33591	15,62	31,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,62	31,25
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13864	15,62	62,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	15,62	31,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase ATCC 700603	15,62	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15,62	15,62
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	15,62	15,62

*CIM: Concentração inibitória mínima; **CBM: Concentração bactericida mínima; ATCC: American Type Culture Collection; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; NCTC: National Collection of Type Cultures.

Figura 9- Resultado colorimétrico da atividade antibacteriana de GuaZuL frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC19606.



O potencial antibacteriana de *Guazuma ulmifolia* já havia sido descrito na literatura. Em estudo realizado com o óleo essencial obtido a partir das folhas de *G. ulmifolia*, se observou atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e, *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) assim como frente a isolados clínicos de *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 500 e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) (Boligon, Feltrin, Athayde, 2013). Violante e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico e diferentes frações resultantes da partição dos extratos iniciais de *G. ulmifolia*. O extrato de etanol bruto, a fração hidrometanólica e a fração de acetato de etila inibiram o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 (CIM: 125, 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Além disso, a fração de acetato de etila também apresentou atividade frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29218 (CIM: 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Outro estudo conduzido por Camporese e colaboradores (2003) verificou a atividade dos extratos de hexano e metanólicos da casca de *G. ulmifolia* frente a *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CIM: 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, a lectina purificada, GuaZuL se mostrou um agente antibacteriano mais eficiente quando comparada a essas outras preparações.

Quando comparada com outras lectinas, GuaZuL também apresentou maior potencial antibacteriano, com valores de CIM menores (CIM = 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que aos valores encontrados para a lectina extraída da semente de *Sterculia foetida* L., planta da mesma família que *G. ulmifolia*, frente a *Bacillus subtilis* CCT 0516 e *P. aeruginosa*

ATCC 8027 e *P. aeruginosa* ATCC 23243 (CIM = 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e frente *E. coli* ATCC 2536, *S. aureus* ATCC 25619 e *S. aureus* ATCC 25925 (CIM = 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Braga et al., 2015). A Ddel, uma lectina com especificidade para glicoproteínas, assim como a GuaZuL, apresentou uma atividade inibitória baixa com CIM de 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a maioria das cepas ATCCs (Torres et al., 2019).

Outras lectinas, se destacam quanto ao seu notável efeito antibacteriano. A glicoproteína isolada da semente de *Eugenia uniflora* (EuniSL) inibiu fortemente o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* sp. (CIM: 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e frente a *B. subtilis*, *Streptococcus* sp. e *E. coli* (CIM: 16,5 $\mu\text{g/mL}$) e CBM variando de 16,5 a 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A SteLL, lectina da folha de *Schinus terebinthifolius*, apresentou atividade frente a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* e *S. aureus* (CIM: 0,45 a 28,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CBM: 7,18 e 115 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Gomes et al., 2013).

O reconhecimento entre lectinas e glicoconjugados presentes na parede celular bacteriana pode resultar na aglutinação e/ou inibição do crescimento celular, através de diferentes mecanismos como, alteração de permeabilidade celular, inibição da síntese da parede celular, alteração de função da membrana, alteração da síntese de proteínas e ácido nucleico, dentre outros (Paiva et al., 2010; Da Silva et al., 2019). No entanto, através do ensaio de inibição, se constatou que a GuaZuL não apresenta especificidade por carboidratos, e sim por glicoproteínas. Desse modo, sua atividade não se deu por meio da interação com carboidratos presentes na superfície bacteriana, e sim por outro mecanismo.

O efeito bactericida de lectinas pode ser uma consequência de danos a parede celular e a membrana (Talas-Ogras et al., 2005). A lectina EuniSL, é capaz de induzir o extravasamento de componentes celulares, através da formação de um canal na membrana (Oliveira et al., 2008). Outro exemplo, é a lectina REG3 α do tipo-C, ataca a membrana formando poros, devido à interação eletrostática entre resíduos catiônicos da lectina e as membranas bacterianas carregadas negativamente (Mukherjee et al., 2014).

GuaZuL foi coletada apenas na porção não adsorvida, ou seja, apresenta mesma carga líquida da matriz, carga positiva. Assim a carga positiva da proteína promove uma interação eletrostática com a carga negativa da parede celular bacteriana, o que favorece a interação da mesma. Então semelhantemente a REG3 α , GuaZuL, possivelmente poderia formar um canal na membrana, que promoveria o

extravasamento de conteúdo celular levando assim a morte celular. No entanto, para confirmação do mecanismo, seriam necessários outros estudos, dentre eles a microscopia eletrônica.

A multidroga-resistência é uma característica tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, podendo em algum momento abranger todas as classes de antimicrobianos clinicamente disponíveis (Giurazza et al., 2021). Assim, há uma necessidade da busca por agentes bacterianos de amplo espectro, de baixo custo em comparação aos antibióticos convencionais e mecanismo de ação distinto, sendo assim menos propenso ao surgimento de resistência (Lyu et al, 2020).

4. CONCLUSÃO

A GuaZuL é uma nova lectina obtida a partir de folhas de *G. ulmifolia*, purificada por métodos cromatográficos, demonstrando ser uma biomolécula, termoestável, com amplo espectro de ação antibacteriano e com suas características bioquímicas descritas. As quais permitem a sua possível aplicação em diferentes processos biotecnológicos e aplicações terapêuticas, em especial frente a importantes bactérias patogênicas envolvidas em infecções adquiridas na comunidade e associadas a cuidados de saúde.

REFERÊNCIAS

ADNYANA, I. K.; YULINAH, E.; YULIET, Kurniati NF. Antidiabetic activity of aqueous leaf extracts of *Guazuma ulmifolia* Lamk., ethanolic extracts of *Curcuma xanthorrhiza* and their combinations in Alloxan-induced diabetic mice. **Research Journal of Medicinal Plants**, Lagos, v. 7, n. 3, p. 158-164, 2013.

AL MUQARRABUN, L. M. R.; AHMAT, N. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of family Sterculiaceae: A review. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 92, p. 514-530, 2015.

BAH, C. S. F.; FANG, E. F.; NG, T. B. Medicinal applications of plant lectins. In: **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**, Dordrecht, p. 55-74, 2013.

BAI, C. Z. *et al.* Preparation of *Astragalus membranaceus* lectin and evaluation of its biological function. **Biomedical reports**, Londres, v. 9, n. 4, p. 345-349, 2018.

BAKAL, S. N.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants—antimicrobial properties of *Nigella sativa* directed against multidrug resistant bacteria. **European Journal of Microbiology and Immunology**, Budapest, v. 7, n. 1, p. 92-98, 2017.

BARBOSA PELEGRINI, P. *et al.* Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry research international**, New York, v. 2011, 2011.

BERENGUER, B. *et al.* The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, n. 2, p. 153-160, 2007.

BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; ATHAYDE, M. L. Determination of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Guazuma ulmifolia* essential oil. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, New Dheli, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2013.

BOURNE, Y. *et al.* Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. A crystallographic study. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 13, p. 9429-9435, 1994.

- BRAGA, A. A. *et al.* Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, United States, v. 175, n. 3, p. 1689-1699, 2015.
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.
- CAMAROTI, J. R. S. L. *et al.* *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (StELL). **Industrial crops and products**, Amsterdam, v. 116, p. 81-89, 2018.
- CAMPORESE, A. *et al.* Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 87, n. 1, p. 103-107, 2003.
- CAMPOS, J. KL *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie open**, Amsterdam, v. 2, p. 62-68, 2016.
- CAVALCANTI, V. L. R. *et al.* *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. **Algal Research**, Amsterdam, v. 56, p. 102290, 2021.
- CHARUNGCHITRAK, S. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food chemistry**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 2020.
- COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2017, 2017.
- COELHO, L. CBB.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, Chichester, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic. **Recent trends in toxicology**, Pensacola, v. 37, p. 47-59, 2008.

CORREIA, M. TS; COELHO, L. CBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Nova Jersey, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

COSTA, R. B. *et al.* Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 119, p. 517-523, 2018.

COSTA, R. MPB *et al.* A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, Barking, v. 45, n. 4, p. 526-533, 2010.

DA SILVA, J. D. F. *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 126, p. 291-297, 2019.

DAR, R. A.; SHAHNAWAZ, M.; QAZI, P. H. General overview of medicinal plants: A review. **The Journal of Phytopharmacology**, India, v. 6, n. 6, p. 349-351, 2017.

DE FREITAS PIRES, A. *et al.* Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 125, p. 53-60, 2019.

DE JUAN, L. L. *et al.* Pharmaceutical applications of lectins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 42, p. 126-133, 2017.

DE MEDEIROS, M. L. S. *et al.* Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 108, p. 782-789, 2018.

DE SANTANA, M. A. *et al.* A novel and efficient and low-cost methodology for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p. 352-358, 2008.

DE SOUZA CÂNDIDO, E. *et al.* Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, Hoboken, v. 25, n. 10, p. 3290-3305, 2011.

DOS SANTOS NUNES, E. *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.

DOS SANTOS, J. M. *et al.* *Guazuma ulmifolia* Lam. decreases oxidative stress in blood cells and prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, New York, v. 2018, 2018.

EL-ARABY, M. M. *et al.* Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three *Egyptian leguminous* seeds. **AMB Express**, Heidelberg, v. 10, p. 1-14, 2020.

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

FELIPE, A. M. M. *et al.* Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.

FERREIRA, R. S. *et al.* Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 186–192, 2011.

FIGUEIRÔA, E. O. *et al.* Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 24, n. 34, p. 3667-3680, 2017.

GAUTAM, Aj. K. *et al.* Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. **Biotech**, Berlin, v. 8, n. 6, p. 272, 2018.

GHOSH, C. *et al.* Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 27, n. 4, p. 323–338, 2019.

GIURAZZA, R. *et al.* Emerging Treatment Options for Multi-Drug-Resistant Bacterial Infections. **Life**, Basel, v. 11, n. 6, p. 519, 2021.

GOMES, D. C. *et al.* A new lectin from the floral capitula of *Egletes viscosa* (EgviL): Biochemical and biophysical characterization and cytotoxicity to human cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 168, p. 676-685, 2021.

GOMES, F. S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GUR, S.; TURGUT-BALIK, D.; GUR, Na. Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases. **World journal of agricultural sciences**, Pakistan, v. 2, n. 4, p. 439-442, 2006.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HOLLMANN, A. *et al.* Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. **Frontiers in chemistry**, Lausanne, v. 6, p. 204, 2018.

HUANG, Y. *et al.* Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Developmental & comparative immunology**, New York, v. 46, n. 2, p. 255-266, 2014.

IORDACHE, F. *et al.* Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Nova York, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, Tokyo, v. 7, n. 1, 2018.

JANDÚ, J. JB *et al.* Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. **Frontiers in pharmacology**, Lausanne, v. 8, p. 671, 2017.

KAMARUZZAMAN, N. *et al.* Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. **Materials**, Basel, v. 11, n. 9, p.1705-1732, 2018.

KARNCHANATAT, A. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. In: Bobbarala, V. **Antimicrobial Agents**, Washington, p. 145-178, 2012.

KENNEDY, J. F. *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995.

KHAN, T.; GURAV, P. PhytoNanotechnology: Enhancing delivery of plant based anti-cancer drugs. **Frontiers in pharmacology**, Lausanne, v. 8, p. 1002, 2018.

KONOZY, Em. HE *et al.* Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 410, n. 2, p. 222-229, 2003.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LI, Tingting et al. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 44, n. 7, p. 606-613, 2012.

LIU, Y. *et al.* Potent broad-spectrum antibacterial activity of amphiphilic peptides against multidrug-resistant bacteria. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 9, p. 1398, 2020

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, 2002.

M CAMPOS, J. C.; ANTUNES, L. CM; FERREIRA, R. BR. Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. **Future Microbiology**, Londres, v. 15, n. 8, p. 649-677, 2020.

MAGOS, G. A. *et al.* Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 117, n. 1, p. 58-68, 2008.

MAIZEL JR, J. V. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v. 25, n. 12, p. 590-592, 2000.

MANNS, J. M. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. **Current protocols in microbiology**, New York, v. 22, n. 1, p. A. 3M. 1-A. 3M. 13, 2011.

MONTESINOS, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 1-11, 2007.

MOREIRA, R. A. *et al.* Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 211-218, 1991.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 74, n. 3, p. 327-339, 2001.

MUKHERJEE, S. *et al.* Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. **Nature**, Londres, v. 505, n. 7481, p. 103–107, 2014.

NAIK, S.; KUMAR, S. Biochemical Characterization of Lactose Binding Entadin Lectin from *Entada rheedii* Seeds with Cytotoxic Activity against Cancer Cell Lines. **ACS omega**, Washington, v. 5, n. 27, p. 16430-16439, 2020.

NAKAMURA-TSURUTA, S. *et al.* One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nano-particles. **Journal of biochemistry**, Tokyo, v. 143, n. 6, p. 833-839, 2008.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, Chichester, v. 25, n. 11, p. 527-541, 2012.

NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 1068-1078, 2014.

NUNES, Y. R. F. *et al.* Germinação de sementes de *Guazuma ulmifolia* Lam.(Malvaceae) e *Heteropterys byrsonimifolia* A. Juss (*Malpighiaceae*) sob diferentes tratamentos de escarificação tegumentar. **Unimontes Científica**, MinA Gerais, v. 8, n. 1, p. 43-52, 2015.

Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P. M.; O'CONNOR, B. F. Protein Chromatography: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, Nova Jersey, v. 10, p. 978-1, 2011.

OLIVEIRA, J. TA *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, Londres, v. 61, n. 3, p. 301-310, 2002.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

PEREIRA, G. A. *et al.* Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) fruit as a novel source of dietary fibre and phenolic compounds. **Food chemistry**, Barking, v. 310, p. 125857, 2020.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* CasuL: a new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 98, p. 419-429, 2017.

RATH, A. *et al.* Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 6, p. 1760-1765, 2009.

RÜDIGER, H. Plant lectins—more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.

SANO, K.; OGAWA, H. Hemagglutination (inhibition) assay. In: Lectins. **Humana Press**, Nova Jersey, p. 47-52, 2014.

SANTOS, A. FS *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, Barking, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SANTOS, A. FS *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in peptide & protein research**, Trivandrum, v. 15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, A. FS *et al.* Strategies to obtain lectins from distinct sources. **Advances in Medicine and Biology**, Nova York, v. 63, p. 33-60, 2013.

SCALON, S. P. Q. *et al.* Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 655-662, 2011.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 92, p. 37-48, 2016.

SILVA, H. C. *et al.* BUL: a novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, Barking, v. 49, n. 2, p. 203-209, 2014.

SILVA, M. CC *et al.* *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Amsterdam, v. 1840, n. 7, p. 2262-2271, 2014.

SINHA, R.; SHUKLA, P. Antimicrobial peptides: Recent insights on biotechnological interventions and future perspectives. **Protein and peptide letters**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 79-87, 2019.

SIRITAPETAWE, J. *et al.* Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EanH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 120, p. 1846-1854, 2018.

SMITH, PK *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, Orlando, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOPIRALA, M. M. *et al.* Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 11, p. 4678-4683, 2010.

SUKANDAR, E. Y.; NURDEWI; ELFAHMI. Antihypercholesterolemic Effect of Combination of *Guazuma ulmifolia* lamk. leaves and *Curcuma xanthorrhiza* roxb. rhizomes extract in wistar rats. **International Journal of Pharmacology**, Pakistan, v. 8, n. 4, p. 277-282, 2012.

SUSEELAN, K. N. *et al.* Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova York, v. 407, n. 2, p. 241-247, 2002.

TALAS-OĞRAŞ, T. *et al.* Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 67-72, 2005.

TAMMA, P. D. *et al.* Infectious diseases society of America antimicrobial resistant treatment guidance: gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, 2020.

TORRES, M. É. L. M. *et al.* DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, Barking, v. 86, p. 169-176, 2019.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. JM. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, Norwell, p. 1-19, 2020.

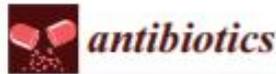
VIOLANTE, I. M. P. *et al.* Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, 2012.

WESTERMEIER, R. Looking at proteins from two dimensions: a review on five decades of 2D electrophoresis. **Archives of physiology and biochemistry**, Londres, v. 120, n. 5, p. 168-172, 2014.

WITTSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, Londres, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

ZHANG, Q. *et al.* Calnexin functions in antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 46, n. 2, p. 356-363, 2014.

APÊNDICE A – POTENTIAL APPLICATION OF COMBINED THERAPY WITH LECTINS AS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR THE TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS



Review

Potential Application of Combined Therapy with Lectins as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Bacterial Infections

João Victor de Oliveira Santos ¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto ² and Isabella Macário Ferro Cavalcanti ^{1,3,*}

- ¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil; joao.oliveirasantos@ufpe.br
- ² Department of Morphology and Animal Physiology Animal, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife 52171-900, Pernambuco, Brazil; analuporto@yahoo.com.br
- ³ Academic Center of Vitória (CAV), Laboratory of Microbiology and Immunology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão 55608-680, Pernambuco, Brazil
- * Correspondence: isabella.cavalcanti@ufpe.br; Tel.: + 55-81-2101-2501

Abstract: Antibiotic monotherapy may become obsolete mainly due to the continuous emergence of resistance to available antimicrobials, which represents a major uncertainty to human health. Taking into account that natural products have been an inexhaustible source of new compounds with clinical application, lectins are certainly one of the most versatile groups of proteins used in biological processes, emerging as a promising alternative for therapy. The ability of lectins to recognize carbohydrates present on the cell surface allowed for the discovery of a wide range of activities. Currently the number of antimicrobials in research and development does not match the rate at which resistance mechanisms emerge to an effective antibiotic monotherapy. A promising therapeutic alternative is the combined therapy of antibiotics with lectins to enhance its spectrum of action, minimize adverse effects, and reduce resistance to treatments. Thus, this review provides an update on the experimental application of antibiotic therapies based on the synergic combination with lectins to treat infections specifically caused by multidrug-resistant and biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. We also briefly discuss current strategies involving the modulation of the gut microbiota, its implications for antimicrobial resistance, and highlight the potential of lectins to modulate the host immune response against oxidative stress.

Keywords: proteins; synergism; bacteria; biofilm



Citation: Santos, J.V.d.O.; Porto, A.L.F.; Cavalcanti, I.M.F. Potential Application of Combined Therapy with Lectins as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Bacterial Infections. *Antibiotics* **2021**, *10*, 520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050520>

Academic Editor: William N. Setzer

Received: 8 April 2021
Accepted: 30 April 2021
Published: 2 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Worldwide, 57 million deaths are reported per year, of which 14.9 million are attributed to infectious diseases [1,2]. For years, clinical therapeutic success was achieved; however, the culture of indiscriminate administration of antibiotics aimed at human health and in agriculture has enabled the dissemination and the acceleration of microbial resistance, which has allowed them to evade the actions of the immune system and drugs, becoming a challenge for current drug therapy [3]. The spread of antimicrobial resistance (AR) represents a major challenge and threat to the future of therapies for various infections [4,5].

In recent years, there has been increasing knowledge of the impact that antibiotics can have on the intestinal microbiota and host immunity response, and how the balance of gut microbiota is essential to regulate numerous aspects of human physiology [6]. The imbalance of the microbiota is related to the loss of the protective effects of the microbiota against pathogens; several metabolic disorders, such as oxidative stress; and the expansion of the host resistance gene pool, known as “resistome”, which can act as an amplifier of antimicrobial resistance [7].

In addition to resistance, bacteria have virulence factors that allow infection to persist, such as biofilms [8]. Biofilm can be defined as complex communities, formed by different microbial cell types, immersed in an extracellular polymeric matrix composed