

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS – CCAA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCAM

**INTERAÇÃO LECTINA-NEOMICINA DE *Dioclea violacea* E SEU EFEITO
MODULADOR CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES PROMOVE A
PURIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO EM COLUNA DE LECTINA
IMOBILIZADA**

Chapadinha/MA

2022

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

**INTERAÇÃO LECTINA-NEOMICINA DE *Dioclea violacea* E SEU EFEITO
MODULADOR CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES PROMOVE A
PURIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO EM COLUNA DE LECTINA
IMOBILIZADA**

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira.

Chapadinho/MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Helena Cruz dos Santos, Maria.

Interação lectina-neomicina de *Dioclea violacea* e seu efeito modulador contra cepas multirresistentes promove a purificação do antibiótico em coluna de lectina imobilizada / Maria Helena Cruz dos Santos. - 2022.

60 f.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais/CCAA, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2022.

Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

INTERAÇÃO LECTINA-NEOMICINA DE *Dioclea violacea* E SEU EFEITO
MODULADOR CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES PROMOVE A
PURIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO EM COLUNA DE LECTINA IMOBILIZADA

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais.

Aprovada em: 08 / 02 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Doutor em Bioquímica)
Universidade Federal do Cariri (UFCA)
(Orientador)

Dr.^a Daiany Alves Ribeiro (Doutora em Etnobiologia e Conservação da Natureza)
Universidade Federal do Cariri (UFCA)
(Examinadora)

Dr.^a Gerlânia de Oliveira Leite (Doutora em Farmacologia)
Universidade de Fortaleza (Unifor)
(Examinadora)

Chapadinha/MA

2022

*“Exausta, a pobre Lesma da
vanglória, ao atingir o cume do
obelisco, disse, olhando da própria
baba o risco: Meu rastro ficará
também na História!”*

Trilussa

*A minha mãe, irmã, irmão e avós.
Por todo amor e momentos
grandiosos.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A princípio a Deus, este como uma energia contida em milhares de partículas dispersas de maneira coordenada presente em cada canto do Universo, agradecida estou, por ter me dado motivos para continuar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira um ser iluminado de destreza e sabedoria, por cada conhecimento transmitido, o senhor é fonte de inspiração no meio acadêmico.

A minha família que sempre me apoia, em especial a minha mãe Elizângela, minha irmã Emanuelle e meu irmão Rafael, minha tia Eliane e meu vô e vó José Façanha e Francisca, respectivamente, a minha prima Mayara e mesmo distante ao meu irmão Osias Neto, vocês são o meu motivo.

A todos os amigos e pesquisadores que são ou já foram do LaBEM, por toda ajuda, concelhos e risadas.

Aos colegas de turma do PPGCAM, em especial, Marcos Garreto, Ana Mara, Joecila e Camila, assim como os professores que fazem parte do mesmo.

As “Bakas”, Marina Ângela, Laryssa, Hyanka e Sarah Shelda que sempre estão presentes me dando forças, em qualquer momento da minha vida.

Aos meus amigos que fiz no decorrer desta trajetória, em especial Ana Lúcia, Romério. Auricelia, Justiane, Valquiria, Dávila, e todos aqueles que de alguma forma me acrescentaram algo nesta jornada. E em especial a Dr.^a Neudymara.

Por fim, agradeço aos pesquisadores e doutores que fizeram parte desta pesquisa. Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM da Universidade Regional do Cariri – URCA. E sem esquecer da FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão).

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde instituiu a resistência bacteriana aos antibióticos como uma das mais importantes ameaças à saúde pública do século XXI, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o uso dos antibióticos, a fim de mitigar as consequências desta problemática. Estudos destacaram uma classe de proteínas que reconhecem e interagem com carboidratos específicos denominadas lectinas, estas, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas destaca-se seu efeito modulador da atividade de antibióticos contra patógenos multirresistentes. A neomicina é um aminoglicosídeo bactericida que inibe a síntese proteica de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A combinação de lectinas com neomicina pode ser capaz de aumentar o efeito antibacteriano do aminoglicosídeo, assim mostrando ser uma potencial ferramenta biotecnológica. Este estudo teve como objetivo avaliar se a lectina de *Dioclea violacea* (DVL) tem a capacidade de interagir com a neomicina via domínio de reconhecimento a carboidrato e em modular a atividade antibiótica da neomicina em bactérias multirresistentes. A lectina foi purificada a partir de cromatografia de afinidade e utilizada nos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante com neomicina e ensaios antibacterianos. Foram feitos ensaios para avaliar a interações da neomicina-DVL imobilizada em coluna -Sephrose® 4B. O teste de atividade hemaglutinante revelou que a neomicina inibiu a atividade hemaglutinante da DVL com concentração inibitória mínima de 50 mM, indicando que o antibiótico interage com o DVL via domínio de reconhecimento de carboidratos. A DVL imobilizada em Sepharose® 4B ativado por brometo de cianogênio ligou 41% da neomicina total aplicada à coluna, indicando que a interação DVL-neomicina é eficiente para processos de purificação. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) para a atividade antibacteriana obtida para a DVL contra todas as cepas estudadas não foi observada em $CIM \geq 1.024 \mu\text{g/mL}$. No entanto, quando DVL foi combinado com neomicina, um aumento significativo na atividade antibiótica foi observado contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados demonstram o primeiro relato de interação lectina-neomicina, indicando que DVL imobilizado tem potencial para isolar neomicina por cromatografia de afinidade. Além disso, a DVL aumentou a atividade antibiótica da neomicina contra cepas multirresistentes (MDR), sugerindo ser um potente adjuvante no tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: DVL. Aminoglicosídeo. Antibacteriano. Sepharose® 4B.

ABSTRACT

The World Health Organization has established bacterial resistance to antibiotics as one of the most important threats to public health in the XXI century, making it necessary to develop new strategies for the use of antibiotics in order to mitigate the consequences of this problem. Studies have highlighted a class of proteins that recognize and interact with specific carbohydrates called lectins, these have several biological activities, among them its modulating effect on the activity of antibiotics against multidrug-resistant pathogens. Neomycin is a bactericidal aminoglycoside that inhibits protein synthesis in Gram-negative and Gram-positive bacteria. The combination of lectins with neomycin may be able to increase the antibacterial effect of the aminoglycoside, thus proving to be a potential biotechnological tool. This study aimed to evaluate whether *Dioclea violacea* lectin (DVL) has the ability to interact with neomycin via the carbohydrate recognition domain and to modulate the antibiotic activity of neomycin in multidrug-resistant bacteria. The lectin was purified from affinity chromatography and used in the hemagglutinating activity inhibition assays with neomycin and antibacterial assays. Assays were performed to evaluate the interactions of column-immobilized neomycin-DVL -Sephacryl® 4B. The hemagglutinating activity test revealed that neomycin inhibited the hemagglutinating activity of DVL with a minimum inhibitory concentration of 50 mM, indicating that the antibiotic interacts with DVL via the carbohydrate recognition domain. The DVL immobilized on Sepharose® 4B activated by cyanogen bromide bound 41% of the total neomycin applied to the column, indicating that the DVL-neomycin interaction is efficient for purification processes. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) for the antibacterial activity obtained for DVL against all strains studied was not observed at $MIC \geq 1024 \mu\text{g/mL}$. However, when DVL was combined with neomycin, a significant increase in antibiotic activity was observed against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. These results demonstrate the first report of lectin-neomycin interaction, indicating that immobilized DVL has the potential to isolate neomycin by affinity chromatography. In addition, DVL increased the antibiotic activity of neomycin against multidrug-resistant (MDR) strains, suggesting that it is a potent adjunct in the treatment of infectious diseases.

Key-words: DVL. aminoglycoside. Antibacterial. Sepharose® 4B.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
cm	Centímetros
Con A	Concanavalina A
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
g	Gravitacional
h	Horas
HGT	Transferência horizontal de genes
kDa	Kilodalton
m	Massa
M	Molaridade
MDR	Cepas multirresistentes
mg	Miligramas
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
mL	Mililitros
mL min ⁻¹	Mililitros por minutos
MurNAc	Ácido <i>N</i> -acetilmurâmico
NI	Não inibiu
nm	Nanômetros
PAGE	Eletroforese em gel e poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI	Pico I
PII	Pico II

PPL	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
RAMs	Genes de resistência antimicrobiana
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
U.H.	Unidade de hemaglutinação
v	Volume
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
μG	Microgramas
μL	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor
\geq	Maior ou igual
μ	Micro

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – *Dioclea violacea* lectin increases the effect of neomycin against multidrug-resistant strains and promotes the purification of the antibiotic in immobilized lectin column

Table 1. Bacterial source and antibiotic resistance profile.	41
Table 2. Inhibitory effect of neomycin and carbohydrates on DVL hemagglutinating activity.	43
Table 3. Minimum Inhibitory Concentration values - MIC for $\mu\text{g/mL}$	48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Considerações gerais

- Figura 1.** Estruturas químicas da neomicina B, C e A. 19
- Figura 2.** Domínio de Reconhecimento a Carboidrato..... 23
- Figura 3.** (A) Inflorescência, (B) sementes e (C) vargem de *Dioclea violacea*. 25

CAPÍTULO 2 – *Dioclea violacea* lectin increases the effect of neomycin against multidrug-resistant strains and promotes the purification of the antibiotic in immobilized lectin column

- Figure 1.** Ovalbumin purification on DVL-Sepharose 4B column. The column was equilibrated with 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂ (flow rate of 0.5 mL/min). The retained fraction was eluted with 0.2 M α -methyl-D-mannoside. All fractions were monitored at 280 nm. 45
- Figure 2.** Neomycin interaction on DVL-Sepharose 4B column. The column was equilibrated with 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂ (flow rate of 0.5 mL/min). The retained fraction was eluted with 0.2 M α -methyl-D-mannoside. All fractions were monitored at 300 nm. 47
- Figure 3.** Modulation of the antibiotic activity of neomycin complexed with *Dioclea violacea* lectin - DVL. A) Modulation of the antibiotic activity against *S. aureus* 10. B) Modulation of the antibiotic activity against *P. aeruginosa* 15. C) Modulation of the antibiotic activity against *E. coli* 06. Quadruple asterisks indicate statistically significant difference with $p < 0.0001$; NS, not statistically significant value with $p > 0.05$ 49

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	16
1 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	16
1.1 Resistência e modulação bacteriana aos antimicrobianos	16
1.2 Neomicina.....	18
1.3 Imobilização de proteínas.....	20
1.4 Lectinas vegetais: aspectos histórico, estruturais e de classificação.....	21
1.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas	24
1.6 Características da espécie <i>Dioclea violacea</i> Mart ex Benth.....	25
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 – <i>Dioclea violacea</i> lectin increases the effect of neomycin against multidrug-resistant strains and promotes the purification of the antibiotic in immobilized lectin column	34