

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHAS DE *Portulaca elatior***

RECIFE

2019

SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHAS DE *Portulaca elatior***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

RECIFE

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Suéllen Pedrosa da
Purificação, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina de folhas de *Portulaca elatior* / Suéllen Pedrosa da Silva - 2019.
63 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão
Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Lectinas 2. *Portulaca elatior* 3. Atividade antimicrobiana
I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-348

SUÉLLEN PEDROSA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHAS DE *Portulaca elatior***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque (Membro Externo)
Universidade Federal do Piauí

Dra. Pollyanna Michelle da Silva (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 30 / 07 / 2019

Dedico a Mainha, Painho e a
Vovó Ângela, que sei que está
sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

Aproveito esse espaço para expressar minha gratidão às pessoas que deixam a caminhada da vida mais leve.

Agradeço primeiramente a Deus, pois seu amor é infinito e se renova todos os dias assim como o amanhã que se levanta.

Mainha e Painho, obrigada por serem minha base e terem dedicado a mim tanto amor, carinho e tempo. De vocês recebi valores que vou guardar sempre comigo, aprendi resistência, solidariedade, honestidade e determinação. Me ensinaram principalmente a ser forte e buscar acima de tudo ser uma mulher dona de si e independente, buscando meu lugar no mundo, lugar esse que vocês sempre deixaram claro que era aquele que eu escolhesse. Amo muito vocês, cheguei até aqui graças a todo os esforços que fizeram desde o início dessa jornada. Mesmo com a distância física entre a gente, vocês são meu maior bem.

Ao professor e orientador Thiago por ser sempre tão solícito e me acolher desde a minha chegada à UFPE. Sou grata pelo seu tempo doado, apoio e conhecimento compartilhado. A professora Patrícia, por ser sempre tão acolhedora... sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus amigos que sonham junto comigo e estão sempre me apoiando. Desde a família Bioprot até meus amigos e amigos de infância. Um agradecimento especial a Dayvid que me acompanhou durante 3 anos de iniciação científica e está comigo desde então. Carlos, Pollyana com y, Poliana sem y, Caio, Jainaldo, Lívia, Robson, Matheus, Nathalia, Wenio, Clarice, Fanny, Daniel, Alexandre, Manuela, Larissa, Lucas, Paloma, Mayara, enfim, a todos vocês (menos a Ewerton, que esqueceu de mim nos agradecimentos dele). Vocês foram essenciais nesse processo, me sinto muito privilegiada por compartilharmos nossas vidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por último, agradeço à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de Mestrado e pelo suporte às pesquisas nas quais estive envolvida desde a graduação.

Não há tempestade que não passe, nem dias de sol que durem para sempre. O segredo está na forma com que você lida com essas passagens.

Autor desconhecido

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não-imunológica capazes de se ligar de forma seletiva e reversível a carboidratos, sendo amplamente difundidas na natureza e possuindo diversas aplicações biológicas, como atividade antimicrobiana. O presente trabalho teve como objetivos purificar e caracterizar uma lectina de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL, *P. elatior leaf lectin*) e avaliar sua atividade antimicrobiana. As folhas de *P. elatior* foram secas, trituradas e homogeneizadas em NaCl 0,15 M (5%, p/v) durante 6 h para obtenção do extrato bruto (EB). O EB foi submetido à cromatografia em coluna de quitina, previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. PeLL foi eluída com ácido acético 1,0 M, dialisada para remoção do eluente e avaliada quanto à atividade hemaglutinante (AH) e concentração de proteínas. A lectina foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE). A especificidade de ligação foi determinada por meio da incubação de PeLL com carboidratos e glicoproteínas anteriormente ao ensaio de AH. Estabilidade da AH de PeLL frente ao aquecimento e variação de pH também foi avaliada. Adicionalmente, o efeito de cátions divalentes na AH de PeLL foi determinado. No ensaio de atividade antimicrobiana, foram utilizadas as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e as bactérias fitopatogênicas *Pectobacterium carotovorum brasiliensis*, *Pectobacterium carotovorum* e dois outros isolados de *Pectobacterium* sp. As concentrações mínima inibitória (CMI), mínima fungicida (CMF) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas através do ensaio de microdiluição em caldo. EB apresentou concentração proteica de 4,55 mg/mL e AH específica de 0,439. As proteínas do extrato foram fracionadas com sulfato de amônio em diferentes saturações, no entanto as frações obtidas (precipitadas e sobrenadantes) não apresentaram AH. Na etapa cromatográfica utilizando o EB, o pico de proteínas adsorvidas e eluídas com ácido acético apresentou AH específica de 744,2 (fator de purificação de 1.695 vezes) e foi denominado PeLL. PeLL se apresentou como uma única banda polipeptídica em PAGE para proteínas nativas ácidas e não apresentou nenhuma banda em PAGE para proteínas básicas. SDS-PAGE revelou PeLL como uma única banda de massa molecular de aproximadamente 20 kDa. A AH de PeLL foi inibida principalmente por albumina sérica bovina, manose e galactose. A AH de PeLL não foi alterada pelo aquecimento por 30 min em temperaturas de até 100 °C. Quando fervida por diferentes períodos, PeLL apresentou redução da AH somente após 5 h de incubação.

A lectina demonstrou ser mais ativa em faixa de pH ácido; por outro lado, a AH foi reduzida em pH 8 e 12 e não foi detectada em pH 7, 9, 10 e 11. PeLL não teve sua AH influenciada pela presença dos cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} , mas teve sua AH parcialmente inibida por íons Mn^{2+} . PeLL apresentou CMI de 0,185 $\mu\text{g/mL}$ e CMB de 0,74 $\mu\text{g/mL}$ para todas as bactérias testadas. Para as leveduras, foi determinado CMI de 1,48 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*; já para *C. parapsilosis* foram obtidos CMI e CMF de 0,74 e 2,96 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Análise por citometria de fluxo indicou que PeLL induz apoptose das células de *Candida albicans*. Em conclusão, uma nova lectina termestável e com atividade antimicrobiana foi isolada a partir do extrato de folhas de *P. elatior*.

Palavras-chave: Atividade antifúngica. Atividade antibacteriana. Fitopatógenos. *Candida*. Lectina termoestável.

ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immunological origin capable of selectively and reversibly bind to carbohydrates, being widely spread in nature and having several biological applications, such as antimicrobial activity. The objective of the present work was to purify and characterize a *Portulaca elatior* leaf lectin (PeLL) and to evaluate its antimicrobial activity. The *P. elatior* leaves were dried, ground and homogenized in 0.15 M NaCl (5%, w/v) for 6 h to obtain the crude extract (CE). The CE was submitted to chromatography on chitin column, previously equilibrated with 0.15 M NaCl. PeLL was eluted with 1.0 M acetic acid, dialyzed to remove the eluent and evaluated for hemagglutinating activity (HA) and protein concentration. The lectin was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis under native (PAGE) and denaturant (SDS-PAGE) conditions. The binding specificity was determined by incubating PeLL with carbohydrates and glycoproteins prior to the HA assay. Stability of PeLL HA to heating and pH variation was also evaluated. Additionally, the effect of divalent cations on the HA of PeLL was determined. In the antimicrobial activity assay, it was used the yeasts *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and the phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum brasiliensis*, *Pectobacterium carotovorum carotovorum* and two other isolates of *Pectobacterium* sp. Minimal inhibitory (MIC), fungicide (MFC) and bactericidal (MBC) concentrations were determined by the broth microdilution assay. The CE showed protein concentration of 4.55 mg/mL and specific HA of 0.439. The extract proteins were fractionated with ammonium sulfate at different saturations, however the obtained fractions (precipitates and supernatants) did not present HA. In the chromatographic step using the CE, the peak of proteins adsorbed and eluted with acetic acid presented specific HA of 744.2 (purification factor of 1,695 times) and was denominated PeLL. PeLL presented a single polypeptide band on PAGE for native acidic proteins and no band in PAGE for basic proteins. SDS-PAGE revealed PeLL as a single band of approximately 20 kDa. PeLL HA was inhibited mainly by bovine serum albumin, mannose and galactose. The HA of PeLL was not altered by heating for 30 min at temperatures up to 100 °C. When boiled for different periods, PeLL presented a reduction of HA only after 5 h of incubation. The lectin was shown to be more active at the acid pH range; on the other hand, HA was reduced at pH 8 and 12 and was not detected at pH 7, 9, 10 and 11. PeLL did not have its HA influenced by the presence of Mg²⁺ and Ca²⁺ cations, but its HA was partially inhibited by Mn²⁺. PeLL presented

MIC of 0.185 µg/mL and MBC of 0.74 µg/mL for all bacteria tested. For yeasts, CMI of 1.48 µg/mL was determined for *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*; for *C. parapsilosis*, MIC and MFC of 0.74 and 2.96 µg/mL, respectively, were obtained. Flow cytometric analysis indicated that PeLL induced apoptosis of *Candida albicans* cells. In conclusion, a new thermostable lectin with antimicrobial activity was isolated from the *P. elatior* leaf extract.

Key words: Antifungal activity. Antibacterial activity. Phytopathogens. *Candida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Dimorfismo de <i>Candida albicans</i> , apresentando morfologia leveduriforme (a) e filamentosa (b).....	17
Figura 2- <i>Pectobacterium</i> spp. causando a podridão radicular em diferentes tecidos. (A) Estágio intermediário da doença. (B, C) Estágio avançado da doença com maiores sintomas de necrose.....	21
Figura 3- Ensaio para detecção de lectinas através da aglutinação de eritrócitos. (A) Esquema representando a malha de aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. (B) Inibição da formação da malha de aglutinação por carboidratos livres.....	25
Figura 4- Atividade hemaglutinante e inibição por carboidratos (A) Formação da malha de hemaglutinação (B) Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B).....	26
Figura 5- Atividade hemaglutinante e inibição por carboidratos (A) Formação da malha de hemaglutinação (B) Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B).....	26
Figura 6- <i>Portulaca elatior</i>	31

ARTIGO

Figura 1- Purificação da lectina de folhas de <i>Portulaca elatior</i> (PeLL) (A) Cromatografia do extrato de folhas em coluna de quitina. A etapa de lavagem foi realizada com NaCl 0,15 M e a eluição de PeLL com ácido acético 1 M. Frações contendo 2.0 mL foram coletadas a cada 6 minutos e lidas em espectrofotômetro a uma absorbância de 280 nm. As amostras que continham picos acima de 0,100 foram reunidas. (B) SDS PAGE (10%) de PeLL em condições desnaturantes, (C) Eletroforese em condições nativas proteínas ácidas (10%).....	~
Figura 2- Caracterização da atividade hemaglutinante (AH) de PeLL em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cátions. (A) PeLL foi incubada por 30 min em temperaturas que variaram de 30 a 100 °C antes de ser avaliada quanto a sua AH. (B) Amostras de PeLL foram incubadas por até 6 h a 100 °C. (C) PeLL foi incubada com diferentes valores de pH (3-12) previamente à determinação da sua AH. (D) PeLL foi incubada com MgCl ₂ , MnCl ₂ e CaCl ₂ e teve sua AH avaliada. AHE: AH específica. Nos ensaios controle a AH da lectina em NaCl 0,15 M foi determinada.....	49

Figura 3- 3 Avaliação da ocorrência de apoptose e necrose em células de *Candida* tratadas com a lectina de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL). Os seguintes tratamentos foram avaliados: controle negativo (A), PeLL a ½ CMI (B), PeLL na CMI (C), PeLL a 2 x CMI (D) e controle positivo álcool isopropílico (E). Nos dot plots, células em apoptose podem ser vistas no quadrante Q1-LR e células em necrose no quadrante Q1-UL. Células viáveis aparecem no quadrante Q1-LL. No quadrante Q1-UR encontram-se células em necrose ou apoptose tardia.....50

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Cores indicativas de acordo com o grau de toxicidade do pesticida utilizado.....	22
Tabela 2- Atividades biológicas de lectinas vegetais.....	28

ARTIGO

Tabela 3- Atividade hemaglutinante (AH) de PeLL na presença de carboidratos (200 mM) e glicoproteínas (1 mg/mL.....	51
Tabela 4- Atividade antimicrobiana de PeLL.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
3.1	OBJETIVO GERAL.....	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	18
2.1.1	Principais drogas utilizadas contra infecções por <i>Candida</i>.....	20
2.2	FITOPATÓGENOS.....	21
2.3	PESTICIDAS.....	23
2.4	CONTROLE ALTERNATIVO DE PRAGAS E DOENÇAS.....	25
2.5	LECTINAS.....	26
2.5.1	Generalidades.....	26
2.5.2	Lectinas vegetais.....	28
2.5.3	Purificação e aplicações de lectinas.....	28
2.6	FAMÍLIA PORTULACACEAE.....	32
4	Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana a partir das folhas de <i>Portulaca elatior</i>.....	34
5	CONCLUSÃO.....	53
6	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Os fungos oportunistas são os principais agentes etiológicos de infecções que acometem indivíduos imunodeprimidos, em especial pacientes em tratamentos quimioterápicos, recém-transplantados ou portadores do vírus HIV (VENKATESAN *et al.*, 2005; ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2017). Destacam-se como causadores de micoses sistêmicas *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* e espécies dos gêneros *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Microsporium* (VASCONCELOS *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013; VINCHE *et al.*, 2018).

Cepas de espécies de *Candida* têm apresentado resistência a azóis, antifúngicos cujo principal alvo é uma enzima da biossíntese do ergosterol. A resistência se dá pelo aumento da produção de transportadores envolvidos no efluxo de drogas e a mutações na enzima que impedem a ligação do antifúngico. Há um menor número de cepas resistentes a outros antifúngicos, como os polienos (ex: anfotericina B), porém esses são extremamente tóxicos a pacientes que já se encontram em estado debilitado (SHAPIRO *et al.*, 2011; BERTO *et al.*, 2018).

Doenças causadas por pragas sempre foram um problema na Agricultura, podendo alcançar grandes proporções. O Brasil enquadra-se como segundo maior produtor mundial de soja, produzindo anualmente mais de 70 milhões de toneladas. Além disso, juntamente com Índia, Mianmar e EUA, o Brasil é responsável pela produção de 51,1% das 23,9 milhões de toneladas de feijões produzidos mundialmente (SALVADOR, 2017). No cultivo de frutas e hortaliças, o Brasil aparece como terceiro maior produtor mundial, gerando em torno de 45 milhões de toneladas anualmente dos mesmos, sendo 65% desse montante consumidos internamente e 35% exportados. O mercado brasileiro de hortaliças tem sua maior produção distribuída entre seis espécies: tomate, batata, melancia, alface, cebola e cenoura (EMBRAPA, 2019). Contudo, há um grande desperdício de colheitas atribuído principalmente a ação de fitopatógenos, insetos-praga, mau acondicionamento e transporte inadequado (NOBREGA *et al.*, 2018). Uma perda anual de mais de 125 milhões de toneladas de feijão, arroz, trigo, batata, milho e soja provocadas por fungos e bactérias fitopatogênicas e insetos-praga foi estimada (FREIRE *et al.*, 2015).

Nesse contexto, pesticidas são usados em larga escala para o controle de pragas, sendo o Brasil responsável pelo uso de 50% dos defensivos agrícolas utilizados anualmente na América Latina. A longo prazo, o uso indiscriminado dessas substâncias pode levar ao surgimento de cepas resistentes de fitopatógenos (FERRAREZI *et al.*, 2019) oferecendo riscos de contaminação ao meio ambiente, à saúde dos trabalhadores pela exposição direta e para a sociedade em geral, através do consumo de alimentos contaminados. Esses fatores impactam severamente a qualidade e expectativa de vida da população (SCORZA *et al.* 2014; BRONDINI *et al.*, 2018).

Um dos maiores desafios atuais consiste na elaboração de estratégias alternativas, que sejam eficazes no controle de pragas agrícolas e patógenos humanos e, ao mesmo tempo, menos tóxicas. Ainda, é importante a busca por novos agentes antimicrobianos a fim de aumentar as possibilidades de rotatividade e assim minimizar a pressão seletiva que favorece o estabelecimento da resistência. A biodiversidade brasileira possui uma gama de plantas com potencial biotecnológico devido à produção de diferentes tipos de moléculas bioativas (tais como proteínas e metabólitos secundários), que vêm sendo estudadas, para que possam ser empregadas para esse fim (PAIVA *et al.*, 2010; BARNABÉ, 2018).

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas, estrutural e funcionalmente, apresentando diversas atividades biológicas, tais como: inseticida, anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora e antimicrobiana (BRITO *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana desempenhada pelas lectinas parece estar associada com a capacidade de ligação dessas moléculas a componentes de membrana ou parede celular de microrganismos, tais como: peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, ácido teicoicos e outros glicoconjugados. Essas interações podem causar desregulações bioquímicas metabólicas nas células, alteração da permeabilidade celular e inibir a produção de componentes necessários para seu desenvolvimento e sobrevivência (FERREIRA *et al.*, 2018).

O gênero *Portulaca* apresenta cerca de 120 espécies no mundo e no Brasil apenas 13 espécies foram relatadas. Espécies desse gênero são descritas no Nordeste brasileiro, sendo *Portulaca elatior* encontrada na Bahia, Pernambuco e Paraíba. Uma lectina, denominada PeRoL, já foi isolada da raiz de *P. elatior* e

apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos ao homem (SILVA *et al.*, 2019a).

O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar uma nova lectina a partir das folhas de *P. elatior*. A lectina, denominada PeLL, foi avaliada quanto à atividade antibacteriana contra fitopatógenos do gênero *Pectobacterium* e atividade antifúngica contra espécies de *Candida*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar lectina presente em folhas de *P. elatior* e investigar sua atividade antimicrobiana.

1.1.2 Objetivos específicos

- Definir procedimento de purificação da lectina de folhas de *P. elatior* (PeLL).
- Caracterizar a lectina quanto à especificidade de ligação a carboidratos e composição em subunidades.
- Avaliar a estabilidade da propriedade ligadora de carboidratos de PeLL frente a variações de temperatura e de pH.
- Determinar o efeito de cátions bivalentes na propriedade ligadora de carboidratos da lectina.
- Avaliar atividade antibacteriana de PeLL frente a isolados fitopatogênicos do gênero *Pectobacterium*.
- Avaliar a atividade antifúngica de PeLL contra espécies de *Candida*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida*, pertence ao reino Fungi, Filo Ascomycota, Ordem Saccharomycetales e Família Saccharomycetaceae, possuindo espécies responsáveis por causar infecções no homem através de micoses superficiais e invasivas (SANCHES, 2018). São fungos leveduriformes, podendo produzir hifas e pseudo-hifas de acordo com o ambiente nutricional (COLOMBO *et al.*, 2003; FIGUEIRA, *et al.*, 2016). Espécies de *Candida* são cosmopolitas e fazem parte da microbiota normal dos animais, colonizando mucosas do trato gastrointestinal, boca, vagina e pele (SERRACABARSSA, 2002; FIGUEIRA *et al.*, 2016; DA PAZ, 2018).

As micoses podem ser classificadas em superficiais ou profundas. São classificadas ainda em micoses oportunistas (como a candidíase), quando ocorrem em indivíduos imunocomprometidos, ou micoses endêmicas (como a histoplasmose, blastomicose e coccidioidomicose), causadas por fungos geograficamente restritos que infectam hospedeiros imunocompetentes. A incidência de infecções por *Candida* varia de 2 a 6,7 por 1.000 admissões hospitalares no mundo, sendo 5 a 10 vezes maiores em unidades de tratamento intensivo (UTIs) que nas enfermarias em geral (DELALOYE *et al.*, 2014).

As espécies de maior importância médica são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitaniae*. No entanto, há registros de casos envolvendo espécies emergentes de *Candida*, tais como: *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis* e *Candida inconspicua*, entre outras (PANIZZO, 2000; SILVA, 2002; TAPIA, 2003; BRANDÃO, 2017). Um estudo realizado no Reino Unido, tendo como amostra 102 pacientes envolvidos com episódios de candidemia, demonstrou que a maioria dos casos tiveram como causadores isolados de *C. albicans*, seguido de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. norvegensis*, nessa ordem. Esse mesmo estudo reportou uma taxa de mortalidade de 37% associada a esses isolados (DAS, *et al.*, 2011).

Uma outra pesquisa, realizada no Japão pelo Comitê de Investigação de Micoses Humanas, traçou um perfil epidemiológico das espécies de *Candida* responsáveis pela causa de candidemias em 10 hospitais universitários no período de 2003 a 2014. *Candida albicans* apresentou a maior incidência nos pacientes (39,5% dos casos), seguida por *Candida tropicalis* (7,1%), *Candida krusei* (3,2%) e outras espécies de *Candida* (13,7%), reforçando a importância da ampliação dos estudos voltado para o controle dessas espécies mais incidentes (KAKEYA *et al.*, 2018).

Mundialmente, a *C. albicans* é a espécie mais isolada em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos. Possui patogenicidade e fatores de virulência que auxiliam na invasão e adesão ao epitélio e mucosa, como o dimorfismo. O dimorfismo de *C. albicans* compreende o crescimento leveduriforme (blastoconídeos) e em forma filamentosa (Figura 1). As hifas possuem maior capacidade de aderência e penetração em células animais do que os blastoconídeos. São ainda termotolerantes e produzem enzimas como proteases e fosfolipases. (HILLER, 2011; ROCHA *et al.*, 2017). *C. albicans* é uma espécie geralmente sensível às drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência a compostos azólicos após exposição prolongada já foram descritos (SILVA *et al.*, 2002; KAUR *et al.*, 2016).

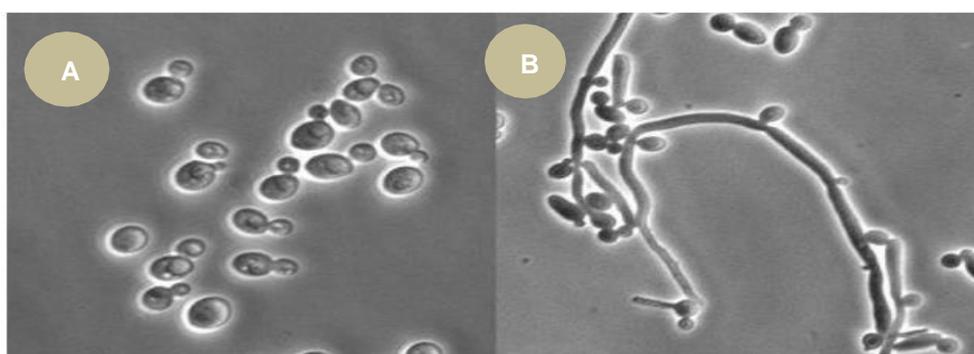


Figura 1 - Dimorfismo de *Candida albicans*, apresentando morfologia leveduriforme (a) e filamentosa (b). (Fonte: Emazer, 2016)

C. glabrata possui uma grande importância médica, surgindo entre as três principais causadoras de candidemia em territórios da Europa e EUA (NUCI *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2011). No entanto, em hospitais públicos do Brasil, os episódios de candidemia causados por essa espécie até 2005 não passavam de 5-8% do total.

Esses dados são similares aos encontrados em 2013, em que os isolados dessa espécie somaram 9% do total. Está associada à alta mortalidade quando em pacientes de idade avançada (KHOURI et al., 2013).

C. tropicalis é um patógeno oportunista em pacientes que apresentam neutropenia e supressão da flora bacteriana pelo uso de antibióticos ou danos a mucosas gastrointestinal. É uma das principais causadoras de candidemia em pacientes que possuem neoplasias, sendo mais frequente em pacientes leucêmicos do que nos que possuem tumores sólidos (ROCHA et al., 2017). No Brasil, mesmo em pacientes que não são acometidos por neoplasias, *C. tropicalis* é uma das três principais causadoras de candidemia (SILVA et al., 2002; NUCI et al., 2002; VALLABHANENI et al., 2016).

A maior incidência de *C. krusei* é em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e receptores de transplante de medula óssea. É uma espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol (LIN, et al., 2005; GONG, et al., 2018). *C. parapsilosis* é responsável por 15-30% dos casos de candidemia no Brasil (COLOMBO et al., 2006; SILVA et al., 2016). Essa espécie é uma exímia produtora de biofilme e as infecções causadas por elas estão associadas à sua presença em cateter venoso central em adultos e crianças (MORACE et al., 2010; SOLDINI et al., 2018).

2.1.2 Principais drogas utilizadas contra infecções por *Candida*

O número de antifúngicos disponíveis no mercado vêm aumentando, no entanto ainda é consideravelmente menor quando comparados ao número de antibióticos. Além disso, a resistência aos antifúngicos representa um desafio para a clínica (MENOZZI et al., 2017).

A anfotericina B é um dos antifúngicos mais antigos e atua ligando-se aos esteróis de membrana dos fungos, culminando no extravasamento e morte celular. É um agente fungistático e fungicida, tendo sido isolado a partir de cepas de *Streptomyces nodosus*. Seu espectro inclui todas as espécies de *Candida*, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, entre outros (KANAFANI et al., 2008; SHAPIRO et al., 2011; BERTO, 2018). Mesmo sendo uns dos antifúngicos mais eficazes, seu uso é restrito devido à toxicidade sistêmica e local. Os efeitos

tóxicos incluem disfunção renal, distúrbios gastrintestinais, febre, calafrios, tromboflebite, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações alérgicas e parada cardíaca (SERRACARBASSA *et al.*, 2003; MENDEZ *et al.*, 2017). A nistanina possui espectro e mecanismo de ação semelhantes aos da anfotericina B, sendo fungistática e fungicida, mas também altamente tóxica. A nistatina foi isolada primeiramente de cepas de *Streptomyces noursei* (PANIZZO, 2002).

Os imidazóis vêm sendo amplamente estudados, demonstrando menos toxicidade que os polienos (anfotericina B e nistatina) e são eficazes contra várias espécies de fungos (ALONSO, 2018). O cetoconazol é um imidazol aprovado para uso no tratamento de micoses sistêmicas. Atua inibindo a síntese de esteróis de membrana e seus efeitos colaterais variam de vômitos, diarreias até quadros de disfunções hepáticas. Possui uma boa ação contra a maioria das espécies de *Candida* (SILVA *et al.*, 2002; NUCCI *et al.*, 2002; MENOZZI *et al.*, 2017).

Os triazóis são derivados dos azóis e são mais eficazes que os imidazóis sendo, pois lesam os fosfolípidios da membrana celular do fungo (NAGORE, 2019). O itraconazol é ativo contra as espécies de *Candida*, bem absorvido via oral e apresenta baixa toxicidade (GAVALDA *et al.*, 2003; GODOY, *et al.*, 2003).

A fluorocitosina, um análogo fluorado da citosina não pertencente a classe dos azóis e polienos, foi descoberta em 1957 e possui uma alta absorção gastrintestinal, porém pode induzir efeitos colaterais como diarreia, náusea, vômitos, anemia e leucopenia. O uso da fluorocitosina oferece obstáculos no tratamento de *Candida*, já que 7 a 47% das cepas isoladas apresentam resistência adquirida durante o tratamento (TAPIA *et al.*, 2003). Além disso essa droga geralmente apresenta eficácia apenas quando associada com outras drogas, como a anfotericina B e fluoconazol (BEZERRA, 2015).

2.2 Fitopatógenos

Insetos-praga e patógenos interferem na agricultura desde os primórdios dessa prática há cerca de 10.000 anos atrás. Registros arqueológicos de alimentos estocados para consumo humano datados aproximadamente há 3.800 anos a.C. revelam que as pragas agrícolas sempre foram um desafio para os produtores de alimentos (BOROJEVIC *et al.*, 2010). O PIB brasileiro é fortemente influenciado pela Agricultura, com a produção de cereais, leguminosas, frutas e hortaliças. Anualmente, a produção

de hortaliças movimenta no Brasil cerca de 55 bilhões de reais, sendo 820.000 hectares de terra destinados à produção das mesmas de acordo com a ABCSEM (Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas). Cerca de 20 milhões de toneladas/ano de 18 tipos de hortaliças são produzidas em território brasileiro, dos quais 50% é referente a produção de tomate, cebola, alface e melancia.

O impacto econômico que o mercado de hortaliças traz fica ainda mais evidente quando se observa que a porcentagem de produção do tomate e alface que, quando somados, correspondem ao valor total da produção de arroz, item mais presente na mesa dos brasileiros (ABCSEM, 2019).

Um grande desperdício de colheitas ocorre, no entanto, devido à ação de insetos-praga, mau acondicionamento, transporte inadequado e fitopatógenos, causando prejuízos bilionários e reais ao ano (PIMENTA, *et al.*, 2018). Os fitopatógenos são grupos de microrganismos responsáveis por causar diversas doenças nas plantas através da indução de distúrbios metabólicos celulares das mesmas. Esses microrganismos secretam toxinas, enzimas e fitorreguladores, utilizando esses mecanismos para absorverem nutrientes das plantas pra seu próprio desenvolvimento (REGINA e BORBA, 2018).

As bactérias fitopatogênicas são de grande importância agrícola devido a sua facilidade de disseminação e dificuldade do seu controle. Em regiões de ambiente favorável, a ocorrência de certas bacterioses de plantas pode condicionar ou inviabilizar a exploração econômica de diversas culturas agrícolas (TEBALDI & VIOLATTI, 2016). Isolados da espécie *Pectobacterium carotovorum*, pertencente à família Enterobacteriaceae, se diferenciam quanto às suas características fenotípicas e bioquímicas e hospedeiros que possuem a capacidade de colonizar. *P. carotovorum* e suas subespécies podem se associar especificamente a alguns hospedeiros, mostrando uma maior adaptação aos mesmos (TOTH, *et al.*, 2003; FILHO & MELO, 2008; WALERON, 2018). Essas bactérias são responsáveis por causar a podridão mole em diversas hortaliças, como: couve-flor, rúcula, tomate, alface e cebola, dentre outros.

O ciclo da podridão mole é iniciado a partir da penetração da bactéria em seu hospedeiro por meio de ferimentos mecânicos ou naturais. Durante a penetração, bactérias liberam enzimas pectolíticas que agem quebrando a pectina (polissacarídeo ramificado contido na parede celular das plantas), auxiliando sua disseminação no organismo do hospedeiro. O órgão afetado apodrece rapidamente (Figura 2) pela

ação das enzimas e/ou toxinas liberadas; ainda, essas bactérias possuem a habilidade de retirar seus nutrientes de tecidos mortos, característica marcante de patógenos necrotróficos (MELLO, *et al.*, 2017).



Figura 2 - *Pectobacterium* spp. causando a podridão radicular em diferentes tecidos. (A) Estágio intermediário da doença. (B, C) Estágio avançado da doença com maiores sintomas de necrose. (Fonte: Agrolink)

Duas possíveis soluções para o controle de fitopatógenos seriam o uso de sementes resistentes e a rotação de culturas. No entanto, não há cultivares resistentes comerciais a alguns dos principais fitopatógenos, embora genótipos moderadamente resistentes já tenham sido identificados. (MENGISTU *et al.*, 2007, 2011, 2013). A rotação de cultura, por sua vez, apresenta uma problemática pois várias espécies de fitopatógenos conseguem sobreviver e se disseminar em restos de cultura (SILVA, 2018b). Uma outra problemática que favorece a incidência de enfermidades no Brasil, é a aplicação da semeadura direta, sistema mais utilizado para preparação do solo em áreas de produção de grãos (FEBRAPDP, 2013). A contínua produção de monoculturas em campos de semeadura direta pode causar o acúmulo de palha, facilitando a disseminação de fitopatógenos.

2.3 Pesticidas

Os pesticidas, também denominados de defensivos agrícolas, agroquímicos e agrotóxicos, são substâncias químicas utilizadas principalmente para se obter o controle ou morte das pragas agrícolas, sendo a forma mais empregada no Brasil para o controle das mesmas. O uso de pesticidas, no entanto está relacionado a uma série de problemáticas: apresentam alta toxicidade, não são alvo-específicos e geralmente são descartados de forma inadequada podendo se disseminar facilmente. (GONÇALVES, *et al.*, 2016).

Os pesticidas se dividem principalmente em quatro categorias, são elas:

Inseticidas, fungicidas, herbicidas e nematicidas. São ainda classificados quanto sua toxicidade, de acordo com sua DL₅₀ e devem carregar obrigatoriamente um rótulo de cor indicando essa classificação (Tabela 1).

Tabela 1 - Cores indicativas de acordo com o grau de toxicidade do pesticida utilizado.

CLASSE	GRUPO	RÓTULO
Classe I	Extremamente tóxico	
Classe II	Altamente tóxico	
Classe III	Moderadamente tóxico	
Classe IV	Pouco tóxico	

(Fonte: A autora)

O Brasil é responsável pelo uso de 50% dos defensivos agrícolas utilizados anualmente na América Latina, gastando cerca de 2,5 bilhões de dólares por ano na aquisição desses produtos (FONSECA *et al.*, 2015). Em 2019, o número de agrotóxicos licenciados no Brasil foi 42% maior quando comparado ao ano de 2018 (CARVALHO, 2019). A consequência disso são maiores contaminações dos alimentos e recursos hídricos e ambientais, reduzindo a qualidade e expectativa de vida da população. Observou-se que de 2011 a 2017 esses casos de contaminações pelos compostos químicos presentes em pesticidas vêm aumentando no Brasil (LOPES *et al.*, 2018).

Um estudo demonstrou a presença de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em solos não destinados à produção agrícola, além de benalaxil presente nos recursos hídricos degradando a própria microbiota aquática (MENDEZ, 2016). Substâncias já proibidas no Brasil como hexaclorociclohexano (HCH) ainda vêm sendo detectadas em amostras de mananciais (KUSSUMI *et al.*, 2011). Lagos localizados no Paraná próximo a regiões de produção agrícola apresentaram contaminações por

organofosforados (CEMBRANEL *et al.*, 2017) e análises demonstraram que a água da chuva em regiões de plantações de soja continha diferentes agrotóxicos (BELO *et al.*, 2012). Os pesticidas são encontrados também contaminando alimentos. Por exemplo, em 2014 em São Paulo, 40% de uma cultura de laranjas apresentavam agrotóxicos, muito deles não autorizados e acima do limite máximo de resíduos. A presença desses compostos foi constatada também em culturas de morango, tomate e maçã (ARAÚJO, *et al.*, 2014).

Um estudo de revisão realizado no período de 1999 a 2009 demonstrou que 10 mil casos de intoxicação por agrotóxicos foram registrados no Nordeste brasileiro, sendo Pernambuco o estado com maior incidência de casos (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Ainda no Nordeste nos anos de 2000 a 2009 mais de 2.050 óbitos causados por intoxicação com agrotóxico foram contabilizados (MEDEIROS, *et al.*, 2014). Análises realizadas com trabalhadores rurais expostos quase que diariamente a agrotóxicos revelaram que os mesmos possuíam danos celulares, alteração na atividade da telomerase, transtornos mentais, dores de cabeças, náuseas, entre outros sintomas (FARIA, *et al.*, 2017; KAHL, *et al.*, 2017; CARGNIN, *et al.*, 2017). Essas questões tornam cada vez mais urgente a necessidade de um controle utilizando compostos menos tóxicos e mais específicos.

2.4 Controle alternativo de pragas e doenças

O controle alternativo de pragas visa minimizar os prejuízos trazidos por patógenos/pragas com um menor impacto ambiental, menor risco ao homem e redução de custos em relação ao emprego de métodos químicos tradicionais (VIEIRA *et al.*, 2016). O uso de extratos de plantas se enquadra como forma alternativa de controle natural de pragas, já tendo demonstrado resultados eficientes no controle das mesmas em regiões de produção agrícola sustentável (FREITAS, 2008; FERREIRA *et al.*, 2014).

Um estudo em que sementes de milho foram tratadas com extrato vegetal de *Moringa oleifera* para controle de fungos fitopatógenos demonstrou que as sementes tratadas com diferentes doses do extrato possuíam um menor percentual de colonização por esses fungos quando comparadas as sementes controle não tratadas

(SILVA *et al.*, 2018c). Extratos de *Luffa* sp., *Momordica* sp. e *Xanthosoma* sp. se mostraram eficientes na inibição de crescimento de diferentes espécies de *Fusarium* (BRITO *et al.*, 2018) Além dos extratos, compostos secundários e primários (como as lectinas) isolados vêm se mostrando ferramentas biotecnológicas contra pragas agrícolas (VENTUROSO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2014).

O uso de plantas medicinais vem sendo considerado uma importante aliada da Saúde Pública por profissionais da área, pesquisadores e pela população em geral. O Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos e, em 2008, publicou pela primeira vez a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de Interesse do SUS abrangendo 71 espécies de plantas (BRASIL, 2009). O desenvolvimento de estudos com plantas medicinais contribui na busca de novos compostos com potencial biotecnológico, dentre eles: óleos essenciais, extratos e proteínas bioativas que vêm sendo testados no combate de diversos tipos de doenças em humanos, como infecções, hipertensão, diabetes, inflamações, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2018).

Diferente de fármacos e produtos químicos sintéticos que tendem a apresentar elevada toxicidade e tempo de vida longo no meio ambiente, os extratos e compostos extraídos de plantas geralmente são mais alvo-específicos, biodegradáveis e estão associados a um processo mais lento de desenvolvimento de resistência (CHAGAS, 2004; TAVECHIO *et al.*, 2009).

2.5 Lectinas

2.5.1. Generalidades

Lectinas são proteínas de origem não-imunológica que se ligam de forma seletiva e reversível a carboidratos através de pontes de hidrogênio ou interações de Van der Waals, sem promover alterações na estrutura covalente do ligante (SHARON e LIS, 1998; FREIRE, 2015). Podem ser detectadas através de ensaios de hemaglutinação, por promoverem a formação de uma malha de aglutinação ao se ligarem a açúcares presentes na superfície dos eritrócitos (Figura 3). Os eritrócitos usados podem ser tratados quimicamente ou enzimaticamente aumentando o tempo de estocagem e a sensibilidade das células à lectina (COELHO & SILVA, 2000). Essa

aglutinação deve ser inibida pela adição de carboidratos livres em solução, comprovando que o agente hemaglutinante é uma lectina e não um outro composto, como taninos, lipídios e íons bivalentes, que podem causar dispersão dos eritrócitos (MOURA, *et al.* 2016).

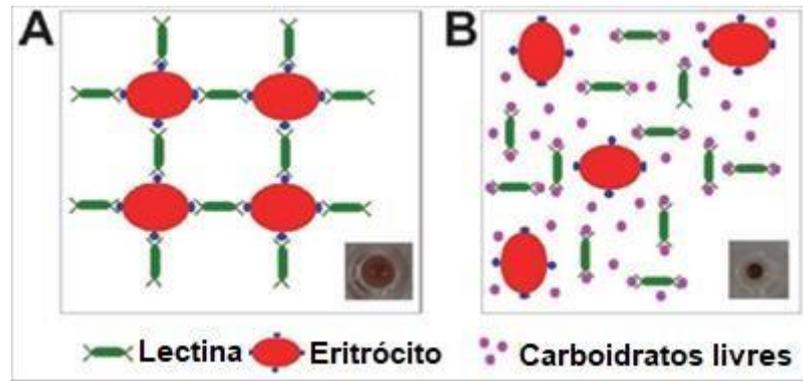


Figura 3 – Ensaio para detecção de lectinas através da aglutinação de eritrócitos. (A) Esquema representando a malha de aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. (B) Inibição da formação da malha de aglutinação por carboidratos livres.

O teste de inibição é realizado através da incubação da lectina separadamente com glicoproteínas e carboidratos livres na solução. Esse processo faz com que a lectina tenha seu(s) sítio(s) de ligação a carboidratos ocupados pelos mesmos, não podendo assim interagir com os carboidratos de superfície dos eritrócitos. Esse ensaio auxilia também na determinação da especificidade de ligação da lectina a carboidratos, sendo a lectina mais específica para o carboidrato que proporcionar maior inibição da atividade hemaglutinante (PAIVA *et al.*, 2013).

Quanto à especificidade de ligação a carboidrato das lectinas, são observadas interações principalmente com os seguintes grupos de carboidratos: galactose/N-acetilgalactosamina, manose/glicose, fucose, ácido siálico e N-acetilglicosamina (OLIVEIRA, 2018).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais e micro-organismos. Nas plantas já foram detectadas nas sementes constituindo de 2% a 10% do total de proteínas (CHAPMAN, 1980). Estão presentes também em raízes (AGARWAL *et al.*, 2011), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2012), flores (SANTOS *et al.*, 2009), cascas e rizomas (SANTANA *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2015), entre outros órgãos e tecidos.

2.5.2. Lectinas vegetais

As lectinas de origem vegetal podem ser divididas em quatro classes principais de acordo com sua estrutura (Figura 5): merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998). As merolectinas possuem apenas um domínio de ligação a carboidrato e, por serem monovalentes, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas são as lectinas mais bem estudadas amplamente distribuídas e dotadas de no mínimo dois sítios de ligações a carboidratos, sendo eles idênticos ou muito semelhantes. Por serem divalentes ou multivalentes, elas podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são constituídas por um ou mais domínios de ligações a carboidratos e um domínio com atividade catalítica ou outra função biológica que age independente do(s) domínio(s) de ligação a carboidratos. De acordo com o número de sítios de ligações, as quimerolectinas podem agir como hololectinas ou merolectinas. As superlectinas possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos, diferenciando-se das hololectinas por reconhecer açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes (VAN DAMME, *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2015).

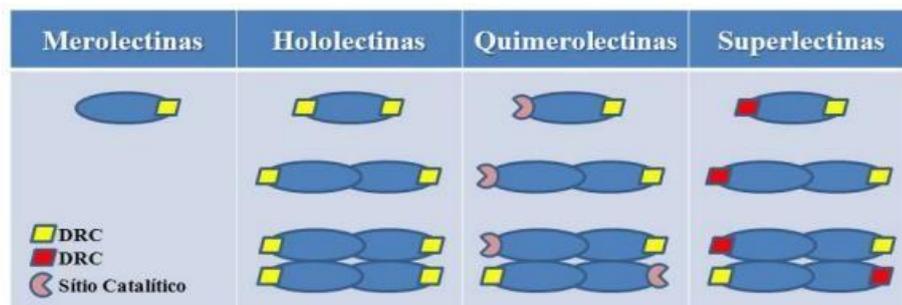


Figura 5 - Classificação estrutural de lectinas das plantas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (Van Damme et al., 1998).

2.5.3 Purificação e aplicações de lectinas

As características das lectinas que definem sua especificidade de ligação a carboidratos e capacidade de hemaglutinação são importantes para o estabelecimento de um protocolo de purificação, processo crucial na determinação das características físico-químicas e funcionais das lectinas, que devem ser avaliadas

quando em seu estado puro, bem como para definição de suas atividades biológicas (OLIVEIRA, 2018; BEZERRA, 2018).

A purificação de uma lectina é iniciada através da preparação de um extrato bruto (EB), que geralmente é precedida pela trituração ou maceração do órgão da planta que será submetida ao estudo, processo que aumenta a superfície de contato da planta com o solvente empregado (AUGUSTO *et al.*, 2012; BEZERRA 2018).

Os solventes utilizados para extração de proteínas relatados na literatura são diversos, por exemplo: emprego de solução salina (NaCl) para extração de lectinas de *Crotalaria spectabilis* e de *Portulaca elatior* (OLIVEIRA, 2017; SILVA, 2019), etanol por exemplo na extração de lectinas de *Jatropha curcas* (VIRGENS *et al.*, 2016) e água destilada, como no caso da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (COELHO *et al.*, 2009).

O EB normalmente irá conter não só lectinas, mas carboidratos, fenóis, entre outras moléculas. Sendo assim, as lectinas devem ser isoladas dos demais componentes presentes, geralmente através do emprego de técnicas de fracionamento e técnicas cromatográficas. A técnica escolhida irá depender da especificidade de ligações a carboidratos da lectina em questão (cromatografia de afinidade), da carga líquida (cromatografia de troca iônica) e do seu tamanho (cromatografia por gel filtração) (PAN *et al.*, 2010; QU *et al.*, 2015).

A cromatografia por afinidade consiste em uma matriz estacionária composta por polímeros de moléculas (ligantes) pelas quais a lectina de interesse possua afinidade, a lectina contida no extrato então se ligará a matriz por meio de interações fracas. É passado um primeiro tampão que arrasta as proteínas que não se ligaram a matriz por não possuírem afinidade com a mesma. Para que as moléculas aderidas à matriz tenham sua interação desestabilizada faz-se necessário a adição de um eluente que irá alterar o pH ou a força iônica do meio ou que seja rico em formas livres do ligante (BEZERRA, 2018).

O emprego da cromatografia de afinidade vem se mostrando efetivo no estabelecimento de diversos protocolos de purificação de lectinas, como observado no isolamento de SteLL a partir das folhas de *Schinus terebinthifolius*, WSMoL isolada a partir de sementes de *Moringa oleifera* e PeRoL isolada das raízes de *Portulaca elatior*, ambas purificadas com auxílio da matriz de quitina, rica em resíduos de N-acetilglicosamina (GOMES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019).

As lectinas compõem um grupo heterogêneo de proteínas, tanto estruturalmente quanto funcionalmente e possuem uma vasta gama de atividades (Tabela 2), abrangendo da Medicina à Agricultura. Muitas são as funções das lectinas vegetais, podendo estar envolvidas na proteção contra insetos e patógenos, transporte e armazenamento de carboidratos, reserva de aminoácidos e regulação de crescimento. Dentre as atividades de defesa desempenhadas pelas lectinas estão: atividade antifúngica, atividade inseticida e efeito antinutricional (NAPOLEÃO *et al.*, 2012; CAVALCANTE *et al.*, 2013; PAIVA *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Atividades biológicas de lectinas vegetais.

Lectina e fonte	Atividades biológicas	Referências
CasuL (extraída de <i>Calliandra surinamensis</i>, <i>ClaveLL</i> (extraída de <i>Cladonia verticillaris</i>), <i>WSMoL</i> (extraída de <i>Moringa oleifera</i>))	Atividade antimicrobiana	(MOURA, <i>et al.</i> , 2015; PROCÓPIO <i>et al.</i> , 2017; RAMOS, <i>et al.</i> , 2019)
MuHL, MuLL, MuBL (extraídas de <i>Myracrodruon urundeuva</i>), PLA (extraída de <i>Pinellia ternata</i>).	Atividade inseticida	(ZUO, <i>et al.</i> , 2012; LIMA <i>et al.</i> , 2017)
BG 2 (extraída de <i>Bauhinia variegata</i>), DLasiL (extraída de <i>Dioclea lasiocarpa</i>) BFL (extraída de <i>Bauhinia forficata</i>), SteLL (extraída de <i>Calliandra surinamensis</i>)	Atividade antitumoral	(SILVA, <i>et al.</i> , 2014; GONDIM, <i>et al.</i> , LIN, <i>et al.</i> , 2008; ZHANG, <i>et al.</i> , 2017, RAMOS, <i>et al.</i> , 2019)
PHA (extraída de <i>Phaseolus vulgaris</i>) WGA (extraída de <i>Triticum aestivum</i>) e Jacalina (extraída de <i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Atividade pró inflamatória	(MOVAFAGH, <i>et al.</i> , 2013; VAKHANIA, <i>et al.</i> , 2013)

BmoLL (extraída de <i>Bauhinia monandra</i>), HGA (extraída de <i>Holothuria grisea</i>), ConV (extraída de <i>Canavalia virosa</i>)	Atividade anti-inflamatória	(MOURA, <i>et al.</i> , 2013; OSTERNE, <i>et al.</i> , 2017; CAMPOS, <i>et al.</i> , 2016.)
BmoLL, TKL (extraída de <i>Trichosanthes kirilowi</i>), CrataBL (extraída da casca de <i>Crataeva tapia</i>)	Atividade Hipoglicemiante	(KAVALALI <i>et al.</i> , 2003; LI <i>et al.</i> , 2012; ROCHA <i>et al.</i> , 2013; LO <i>et al.</i> , 2017)

As lectinas são ferramentas importantes no avanço da Biotecnologia ao apresentarem propriedades como: atividade inseticida, atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória, efeito antitumoral, ação antimicrobiana, ação antibiofilme, entre outras (SANTOS *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017; PROCÓPIO *et al.*, 2017).

A atividade antifúngica de lectinas está relacionada com a ligação a glicoconjugados e polissacarídeos de parede e da membrana celular, inibindo o desenvolvimento do micro-organismo através da interferência na homeostase celular, germinação de esporos e crescimento em geral, podendo culminar em sua morte (PAIVA *et al.*, 2010). O principal constituinte da parede dos fungos é a quitina, um polímero de N-acetil-glicosamina (GlcNAc), sendo assim, lectinas ligantes de quitina geralmente podem inibir o crescimento celular fúngico (RUDIGER, 1997; SANTOS, *et al.*; 2012).

A lectina purificada do cerne de *Myracrodruon urundeuva* foi capaz de inibir mais de 50% do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium fusarioides* (SÁ *et al.*, 2009). CasuL, extraída de folhas de *Calliandra surinamensis*, demonstrou eficácia na inibição de biofilmes produzidos por *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus*, apresentando ainda atividade antifúngica frente a *Candida krusei*, causando alterações em sua morfologia e danos na parede celular (PROCÓPIO *et al.*, 2017).

PgTeL, extraída da sarcotesta de *Punica granatum*, demonstrou ser bacteriostática contra bactérias patogênicas ao homem assim como lectinas isoladas de *Cladonia verticillaris* (ClaveLL) e WSMoL extraída de sementes de *Moringa oleifera*

(RAMOS et al., 2013; MOURA et al., 2015; SILVA et al., 2016; MOURA et al., 2017; CORIOLANO et al., 2019). PgTeL se mostrou ainda capaz de inibir o crescimento de cepas MRSA (*S. aureus* resistente à metilina) inibindo sua formação de biofilme, alterando seu crescimento e diminuindo a viabilidade celular (SILVA et al., 2019b), bem como apresentou atividade contra isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro estendido (SILVA et al., 2019c). Ainda, PgTeL apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida krusei* causando inibição do crescimento, estresse oxidativo, colapso energético e alterações ultraestruturais (SILVA et al., 2018b). Lectinas de *Archidendron jiringa* e *Curcuma longa* também possuem atividade frente a *Candida* spp., induzindo distúrbios metabólicos como o estresse oxidativo das células desses microrganismos.

2.6 Família Portulacaceae

A Caatinga possui uma grande diversidade de espécies, numa área de mais de 800.000 km², correspondendo a 54% do Nordeste e 11% do Brasil (CAVALCANS, 2006; FRANCISCO et al., 2017). O clima é caracteristicamente quente e semiárido, e sua flora é adaptada a déficits hídricos (RODAL et al., 2002; MELO, et al., 2011). A identificação de compostos bioativos em plantas da Caatinga auxilia o desenvolvimento biotecnológico do semiárido, valorizando o bioma como fonte de recursos e estimulando assim sua conservação (TABARELLI et al. 2000; LUSTOSA, 2017).

Portulacaceae é uma família de plantas que possui 115 espécies sendo agrupadas em um único gênero, *Portulaca*. Tem uma distribuição cosmopolita, com a maior incidência em regiões semiáridas do Hemisfério Sul da África, Austrália e América do Sul, mas com algumas espécies no norte das regiões árticas (SOUZA, 2009; JOLY; 2005, SILVA et al., 2019f). O gênero *Portulaca* inclui plantas herbáceas, carnosas, perenes ou anuais, com folhas alternas, apresentando 2 sépalas, 4-5 pétalas livres, estames numerosos, ovário ínfero e fruto cápsula com deiscência longitudinal ou transversal (ROHRBACH, 1872). No Brasil, apenas 13 espécies foram relatadas. *Portulaca elatior* Mart. ex Rohrb (Figura 6) é uma espécie encontrada nos municípios de Juazeiro e Castro Alves, Estado da Bahia, no município de Petrolândia,

Estado de Pernambuco, no município de Aroeiras, Estado da Paraíba e em diversos outros locais do semiárido nordestino (SOUZA, 2009; JOLY; 2005).



Figura 6 - *Portulaca elatior*. Fonte: A autora

P. elatior foi relatada por produtores rurais como causa de manifestações clínicas de perturbações gastrintestinais em bovinos (COELHO *et al.*, 2010). Esse fato motivou a busca de moléculas que podem atuar como fatores antinutricionais, tais como inibidores de protease e lectinas.

Recentemente uma nova lectina nomeada como PeRoL foi isolada das raízes de *P. elatior*, apresentando massa molecular de 33 kDa, sendo composta por duas subunidades unidas por pontes dissulfeto apresentando aproximadamente 15kDa cada uma. A lectina demonstrou ser específica para trealose, dissacarídeo sintetizado por fungos, plantas e animais. PeRoL é uma lectina termoestável, não dependente de íons bivalentes e não é citotóxica para células do sangue periférico humano. Essa lectina foi capaz de inibir o crescimento de diversas espécies de *Candida*, como

3 ARTIGO

Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana a partir das folhas de *Portulaca elatior*

Suéllen Pedrosa da Silva^a, José Dayvid Ferreira da Silva^a, Clarice Barbosa Lucena da Costa^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Ana Rosa Peixoto^b, Roberto Araújo Sá^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, Bahia, Brazil.*

^c*Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Pernambuco, Brazil.*

*Autor para correspondência. E-mail: thiago86@yahoo.com.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos purificar e caracterizar uma lectina de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL, *P. elatior leaf lectin*) e avaliar sua atividade antimicrobiana. Proteínas das folhas de *P. elatior* foram extraídas em NaCl 0,15 M e PeLL foi isolada por cromatografia em coluna de quitina. A lectina foi caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE) e quanto à especificidade de ligação a carboidratos, bem como estabilidade da atividade hemaglutinante (AH) frente ao aquecimento, variação de pH e presença de cátions divalentes. No ensaio de atividade antimicrobiana, foram utilizadas as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e as bactérias fitopatogênicas *Pectobacterium carotovorum brasiliensis*, *Pectobacterium*

carotovorum carotovorum e dois outros isolados de *Pectobacterium* sp. As concentrações mínima inibitória (CMI), mínima fungicida (CMF) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas. PeLL foi isolada com AH específica de 744,2 (fator de purificação de 1.695 vezes) e apresentou como uma única banda polipeptídica em PAGE para proteínas nativas ácidas. SDS-PAGE revelou PeLL como uma única banda de aproximadamente 20 kDa. A AH de PeLL foi inibida principalmente por albumina, manose e galactose e não foi alterada pelo aquecimento por 30 min em temperaturas de até 100 °C, nem mesmo quando fervida por até 4 h. A lectina demonstrou ser mais ativa em faixa de pH ácido e teve sua AH parcialmente inibida por íons Mn^{2+} . PeLL apresentou CMI de 0,185 µg/mL e CMB de 0,74 µg/mL para todas as bactérias testadas. Para as leveduras, foi determinado CMI de 1,48 µg/mL para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*; já para *C. parapsilosis* foram obtidos CMI e CMF de 0,74 e 2,96 µg/mL, respectivamente. Análise por citometria de fluxo indicou que PeLL induz apoptose das células de *Candida albicans*. Em conclusão, uma nova lectina termoestável e com atividade antimicrobiana foi isolada a partir do extrato de folhas de *P. elatior*.

Palavras-chave: atividade antifúngica; atividade antibacteriana; fitopatógenos;

Candida; lectina termoestável.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira inclui uma variedade de plantas com potencial biotecnológico, que podem ser usadas para controlar pragas agrícolas e doenças humanas. Essas atividades estão associadas à presença de diversas moléculas bioativas nessas plantas, tais como metabólitos secundários e proteínas bioativas, dentre essas as lectinas (COELHO *et al.*, 2017; RODRIGUEZ, 2019).

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e têm apresentado várias atividades biológicas e aplicações tanto na Medicina quanto na Agricultura. A interação de lectinas com glicoconjugados e polissacarídeos presentes na superfície celular de microrganismos pode desencadear uma série de respostas, resultando na inibição do crescimento e morte do microrganismo (PROCÓPIO *et al.*, 2017).

A candidíase é uma infecção oportunista causada por fungos do gênero *Candida* e está entre as principais causas de mortalidade em pacientes imunossuprimidos (RAIMUNDO, *et al.* 2017). Tem sido relatada a ocorrência de cepas de *Candida* resistentes aos agentes antifúngicos da classe dos azóis. Um número menor de cepas resistentes aos polienos (anfotericina B) é descrito, mas esses antifúngicos são mais tóxicos, causando diversos efeitos colaterais (SHAPIRO *et al.*, 2011; BERTO *et al.*, 2018).

O PIB brasileiro é fortemente influenciado pela Agricultura, que sofre um grande impacto da ação de fitopatógenos e insetos-praga. Bactérias fitopatogênicas possuem grande importância agrícola pelo seu alto potencial de disseminação e dificuldade no seu controle. A ocorrência de bacterioses em plantações pode trazer a inviabilidade de toda a cultura (TEBALDI & VIOLATTI, 2016). *Pectobacterium carotovorum* e suas subespécies pertencem a família Enterobacteriaceae, e se distinguem entre si através das suas características fenotípicas e bioquímicas, podendo se associar de forma específica a diferentes hospedeiros (WALERON, 2018). Essas bactérias são conhecidas por causar principalmente a podridão mole em hortaliças e o ciclo dessa doença é caracterizado pela liberação de enzimas e toxinas pela bactéria, causando a necrose dos tecidos do hospedeiro (REIS & CASA, 1998; MELLO, 2017).

Os pesticidas são usados em larga escala para o controle de pragas. O uso de pesticidas a curto e médio prazo traz benefícios aos produtores rurais, entretanto, a longo prazo, pode induzir o surgimento de cepas resistentes de fitopatógenos às

substâncias químicas ali contidas (KIMATI et al., 1997; FERRAREZI, 2019). Estudos demonstram que solos e recursos hídricos localizados próximos a áreas de plantio agrícola são contaminados por produtos tóxicos contidos em pesticidas, tais como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), benalaxil e até substâncias já proibidas no Brasil pela ANVISA, como hexaclorociclohexano (HCH) (KUSSUMI et al, 2011; MENDEZ, 2016). Além disso, pesticidas já foram encontrados em níveis acima do permitido em diversos alimentos, expondo a população a intoxicações alimentares (ARAÚJO, et al., 2014). Estudos realizados de 1999 a 2009 demonstraram que mais de 10 mil casos de intoxicação por agrotóxicos foram registrados no Nordeste do Brasil, especialmente em Pernambuco (TEIXEIRA et al., 2014). O resultado dessa exposição no intervalo de 2000 a 2009 foi o registro de 2.050 óbitos no Nordeste (MEDEIROS, *et al.*, 2014). O controle alternativo de pragas agrícolas e doenças humanas visa diminuir os prejuízos trazidos pelos mesmos com um menor impacto ambiental e menor risco a saúde humana, além de diminuir custos quando comparado ao emprego de métodos químicos tradicionais. O emprego de compostos naturais vem se mostrando uma ótima ferramenta para esse controle, como o uso de extratos, metabólitos secundários e plantas medicinais (FERREIRA et al., 2014; VIEIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2019).

O gênero *Portulaca* apresenta cerca de 120 espécies no mundo e no Brasil apenas 13 espécies foram relatadas. Espécies desse gênero são descritas no Nordeste brasileiro, sendo *Portulaca elatior* encontrada na Bahia, Pernambuco e Paraíba. Uma lectina, denominada PeRoL, já foi isolada da raiz de *P. elatior* e apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos ao homem (SILVA et al., 2019). O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar uma nova lectina a partir das folhas de *P. elatior*. A lectina, denominada PeLL, foi avaliada quanto à atividade antibacteriana contra fitopatógenos do gênero *Pectobacterium* e atividade antifúngica contra espécies de *Candida*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e microrganismos

Foram utilizadas folhas de espécimes de *P. elatior* coletadas no município de Aroeiras, Estado da Paraíba, com autorização (36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Os fungos utilizados foram disponibilizados pela micoteca (University Recife Mycologia) da Universidade Federal de Pernambuco: *Candida albicans* (URM 5901), *Candida krusei* (URM 6351), *Candida tropicalis* (URM 6551), *Candida parapsilosis* (URM 6345). As bactérias foram cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia (UNEB): *Pectobacterium carotovorum brasiliensis* (isolado de couve, UNEB 23), *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (PJD II, UNEB 2), *Pectobacterium* sp. (isolado de rúcula, UNEB 25) e *Pectobacterium* sp. (isolado de alface, UNEB 28).

2.2. Extração de proteínas

A farinha de folhas de *P. elatior* foi homogeneizada em agitador magnético (6 h a 4 °C) com NaCl 0,15 M na proporção de 5% (p/v). A suspensão foi filtrada em papel de filtro e depois centrifugada (9.000 g; 15 min, 4 °C). O sobrenadante (extrato salino) foi avaliado quanto à concentração de proteínas de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL).

2.3. Determinação da atividade hemaglutinante

A presença de lectinas nas preparações ao longo do processo de purificação foi avaliada através de ensaio de atividade hemaglutinante (AH) em placas de microtitulação, de acordo com Paiva & Coelho (1992). Alíquota de 50 µl da amostra foi serialmente diluída em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µl de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (método de coleta aprovado pelo CEUA-UFPE, processo 23076.033782/2015-70). Uma unidade de atividade hemaglutinante (AH) foi definida como o inverso da maior diluição da amostra que

promover total hemaglutinação. A AH específica foi definida pela razão entre o AH e a quantidade de proteínas (mg).

2.4. Purificação de PeLL

As proteínas presentes no extrato foram precipitadas com sulfato de amônio em diferentes saturações (0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%) de acordo com Green & Hughes (1955). As frações precipitadas e sobrenadantes obtidas após centrifugação (15 min, 5.000 g, 4°C) foram dialisadas contra água destilada (4 h) e NaCl 0,15 M (4 h) e avaliadas quanto à AH e como concentração de proteínas. Uma vez que nenhuma das frações obtidas apresentou AH específica maior que o extrato, o mesmo foi cromatografado (2 mL) em coluna (7,5 × 1,5 cm) de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. A eluição de proteínas foi acompanhada pela medida da absorbância a 280 nm. Após lavagem com a solução de equilíbrio, as proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 1,0 M e as frações correspondentes ao pico foram reunidas e dialisadas contra água destilada para remoção do eluente. Os picos de proteínas não-adsorvidas e adsorvidas foram avaliados quanto à AH e concentração de proteínas como descrito anteriormente. A homogeneidade de PeLL foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas ácidas ou básicas (REISFELD et al.,1962; DAVIS, 1964).

2.5. Caracterização de PeLL

PeLL foi submetida a eletroforese em condições desnaturantes contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). Para a determinação da estabilidade térmica, a lectina foi incubada em diferentes temperaturas (30 a 100 °C) por 30 min antes da realização do ensaio de AH. Adicionalmente, amostras de PeLL foram incubadas a 100 °C por 6 h e avaliadas quanto à AH. Para a avaliação do efeito de íons, o ensaio de AH foi efetuado utilizando MgCl₂, MnCl₂ e CaCl₂ (20 e 40 mM) em substituição ao NaCl 0,15 M. Para a

determinação do efeito do pH, a amostra foi incubada previamente (24 h) em tampões com diferentes valores de pH (3-12) antes da realização do ensaio de hemaglutinação. O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos foi realizado incubando a solução contendo lectina com monossacarídeos (200 mM), dissacarídeos (200 mM) ou glicoproteínas (1 mg/mL) por 15 min a 28 °C antes da determinação da atividade hemaglutinante.

2.6. Atividade antimicrobiana

2.6.1. Determinação de concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima fungicida (CMF)

Os fungos foram inoculados em meio Sabouraud-Dextrose e incubados a 30°C por 16 h, sob agitação. Após isso, as concentrações das culturas foram ajustadas turbidimetricamente (densidade óptica a 600 nm, DO_{600}) para 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. O mesmo foi feito para as bactérias, substituindo o meio Sabouraud-Dextrose por meio NDY a 37 °C.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de diluição em caldo em placas de microtitulação. Para tanto, PeLL (100 μ L) foi adicionada ao terceiro poço de uma fileira e submetida a diluições sucessivas (até 1:1024) em Caldo Sabouraud-Dextrose (fungos) ou NYD (bactérias). O primeiro e o segundo poços continham apenas o meio de cultura. Em seguida, a todos os poços, exceto o primeiro, foram adicionados 20 μ L da suspensão microbiana e a placa foi incubada a 30 °C por (fungos) ou 37 °C (bactérias) por 24 horas. O primeiro poço funcionou como controle de esterilidade do meio e o segundo como controle 100% do crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata. A DO_{600} foi medida em espectrofotômetro para microplacas no tempo zero e ao final do ensaio. A CMI foi determinada como a menor concentração em que ocorreu diminuição igual ou maior que 50% em relação à DO no poço controle.

Para os casos em que houve inibição do crescimento, foi determinada a CMF ou CMB. Uma alíquota de cada poço onde houve inibição do crescimento foi transferida para uma placa de Petri contendo meio Sabouraud-Dextrose-Agar (fungos) ou NYD (bactérias), a qual foi incubada por 24 h a 28 °C (fungos) ou 37 °C por 24 h

(bactérias). A concentração capaz de reduzir o número de UFC/mL em 99,9%, em comparação com o inóculo inicial, foi registrada como a CMF ou CMB. Avaliação de apoptose.

As células de *Candida albicans* tratadas com PeLL (½ CMI, CMI e CMF) por 24 horas foram lavadas com PBS e ressuspensas com uma solução tampão (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM). Posteriormente foram adicionados 1:500 de Anexina V-FITC e 20 µg/mL de iodeto de propídeo. A ocorrência de apoptose e a necrose foram quantificadas no citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) com um limite de SSC de 200. Foram coletados 30.000 eventos por amostra.

2.7. Análise estatística

Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram calculadas através do Teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto (EB) das folhas de *Portulaca elatior* apresentou uma concentração proteica de 4,55 mg/mL e AH específica de 0,439. A baixa AH do extrato pode estar associada a uma baixa concentração de lectinas no EB ou ainda à presença de inibidores endógenos da(s) lectina(s). Resultados semelhantes foram observados para o extrato da raiz de *P. elatior* que possui uma baixa AH específica de 1,55, fato que foi comprovado estar relacionado à presença no extrato de trealose, um dissacarídeo inibidor da AH da lectina da raiz, PeRoL (SILVA *et al.*, 2019).

O extrato foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio, no entanto, nem as frações precipitadas nem sobrenadantes apresentaram AH. Sendo assim, o extrato foi submetido à cromatografia em coluna de quitina. O perfil cromatográfico (Figura 1) apresentou 2 picos, o primeiro correspondente às proteínas não-adsorvidas e que não apresentou AH, e um segundo pico de proteínas adsorvidas que, após diálise, apresentou uma AH de 64 e AH específica de 744,2, correspondendo a um fator de purificação de 1695,2 confirmando a eficácia do método de purificação escolhido.

Diversas lectinas já foram isoladas em coluna com matriz de quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, como: MuBL e MuHL extraídas da casca e cerne de *Myracrodruon urundeuva* e WSMoL, isolada de sementes de *Moringa oleifera* (SÁ et al., 2009; COELHO et al., 2009). Com relação a lectinas de folhas, SteLL e MuLL, isoladas de *Schinus terebinthifolius* e *M. urundeuva*, respectivamente, também foram purificadas por meio de cromatografia em coluna de quitina (NAPOLEÃO et al., 2011; GOMES et al., 2013).

PeLL apresentou uma única banda polipeptídica na eletroforese em condições nativas para proteínas ácidas (Figura 1, inset a), enquanto nenhuma banda foi detectada na eletroforese para proteínas básicas. Esses resultados demonstram a homogeneidade da preparação e confirmam o isolamento da lectina. Quando submetida a eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), PeLL apresentou uma banda polipeptídica de aproximadamente 20 kDa (Figura 1, inset b).

Lectinas são capazes de reconhecer e se ligar de forma reversível e específica a mono-, oligo- ou polissacarídeos, bem como a glicoconjugados. A Tabela 1 demonstra que a AH de PeLL foi inibida por manose, galactose e principalmente por albumina sérica bovina. Glicose e N-acetilglicosamina não inibiram a AH. A inibição da AH ocorre quando a afinidade da lectina com os carboidratos ou glicoproteínas livres em solução é maior que sua afinidade pelos carboidratos da superfície dos eritrócitos. Diversas lectinas isoladas no reino vegetal possuem afinidade tanto por manose quanto por galactose, como a jacalina (isolada de *Artocarpus integrifolia*) e a frutalina (lectina isolada de *Artocarpus incisa*) (MOREIRA E PERRONE, 1998; DAMASCENO, 2015). Na literatura, inúmeras atividades biológicas são descritas para lectinas ligadoras de manose, tais como atividade anti-viral, antimicrobiana, mitogênica e efeito antitumoral (JACQUES et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Na área farmacêutica, as lectinas mais bem estudadas e utilizadas como ferramenta no direcionamento de fármacos, por meio do encapsulamento dessas drogas em lipossomas conjugados, são as lectinas ligadoras de manose e glicoproteínas (PRADELLA et al., 2018). Uma das lectinas mais bem estudadas e usada como modelo nessa área é a Con A: lipossomas conjugados a essa lectina foram eficazes, por exemplo, na entrega de Triclosan (bactericida) no tratamento de infecções do trato respiratório pois a presença da lectina no lipossoma favorece a adesão celular (SANTOS, 2005; ZHOU, et al., 2005).

Por se tratarem de proteínas, as lectinas são influenciadas pelas condições do

meio em que se encontram e cada uma possui uma faixa ótima de pH e temperatura para desempenhar suas funções. O estudo da influência desses fatores físico-químicos é importante para determinar as condições ideais para manutenção da integridade da estrutura nativa (SILVA, et al., 2019).

PeLL demonstrou ser uma proteína com AH termorresistente, já que sua AH foi mantida após incubada em todas as temperaturas avaliadas (30 a 100 °C) (Figura 2A). No ensaio de incubação a 100 °C por 6 horas (Figura 2B), foi observado que a AH de PeLL permaneceu estável durante as três primeiras horas, foi ligeiramente estimulada após 4 horas e decaiu após 5 horas de aquecimento. Porém, a amostra permaneceu ativa durante todo o período. PeLL se mostrou mais termoestável que algumas lectinas relatadas na literatura, como GaBL, que apresentou uma queda após aquecida a 70 °C e ATL extraída de *Apios tuber* que perdeu sua atividade quando aquecida a temperaturas acima de 60 °C (KENMOCHI, et al., 2015; COSTA et al., 2018). A literatura relata outras lectinas termoestáveis, como cMoL purificada de *Moringa oleifera* (SANTOS, et al., 2009), CasuL isolada de folhas de *Calliandra surinamensis* (PROCÓPIO et al., 2017) e PeRoL (SILVA, et al., 2019).

O aumento exponencial da temperatura desencadeia vibrações que agem diretamente sobre as ligações não covalentes da proteína, podendo provocar o afastamento de átomos ou uma aproximação dos mesmos. Diante desses eventos a conformação nativa da estrutura é alterada. A termorresistência de proteínas está associada com a relevância que interações como pontes de hidrogênio possuem na manutenção da conformação ideal para exercer a atividade biológica, bem como no tipo de organizações super-secundárias e terciárias presentes. Lectinas que possuem folhas- β em maiores proporções que α -hélice compondo sua estrutura secundária geralmente apresentam maior estabilidade estrutural frente ao aumento de temperatura (BOSE et al., 2016).

A adição de íons H^+ em soluções contendo proteínas favorece a protonação de grupos ionizáveis das cadeias laterais de aminoácidos polares carregados, o que pode provocar alterações favoráveis ou não ao desempenho das suas atividades biológicas (COSTA et al., 2018). No teste de influência do pH na AH de PeLL, a lectina demonstrou ser mais ativa em faixa de pH ácido, se mantendo estável nos valores de pH de 3 e 5 e com um aumento em pH 4; por outro lado, a AH foi reduzida em pH 8 e 12 e não foi detectada em pH 7, 9, 10 e 11 (Figura 2C).

A lectina PeRoL, assim como PeLL, é uma proteína que demonstrou melhor atividade quando em pH ácido. As lectinas no entanto apresentam comportamentos variados quando incubadas em diferentes faixas de pH, como evidenciado para ATL (AH estável em faixa de pH ácido e alcalino 5-13), lectina extraídas de *Arisaema tortuosum* (AH ótima em faixa ácida, pH 2) e lectina extraída de *Pisum sativum* que apresenta AH estável em uma ampla faixa de pH (2-13) (DHUNA, et al., 2005; KENMOCHI, et al., 2015; SILVA et al., 2019).

Algumas lectinas têm sua AH influenciada por íons, possuindo em sua composição sítios de ligação a cátions bivalentes. Os resultados do ensaio de AH na presença de íons bivalentes (Figura 2D) demonstraram que PeLL teve sua AH parcialmente inibida pela presença de todos os cátions testados (Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+}) sendo parcialmente inibida.

PeLL apresentou atividade antimicrobiana contra todos os isolados de bactérias fitopatogênicas e espécies de *Candida* testados, apresentando valores de CMI variando de 0,185 a 1,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e CMB/CMF de 0,74 a 2,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 2). A lectina foi bactericida para todos os isolados de *Pectobacterium* e fungicida somente para *C. parapsilosis*. A atividade antimicrobiana de lectinas está relacionada com a ligação a glicoconjugados e polissacarídeos de parede e da membrana celular, inibindo o desenvolvimento do micro-organismos através da interferência na homeostase celular, germinação de esporos e crescimento em geral, podendo culminar em sua morte (PAIVA et al., 2013). A avparcialiação por citometria de fluxo revelou que PeLL induziu apoptose das células de *Candida albicans* em concentrações variando de $\frac{1}{2}$ CMI a $2 \times$ CMI (Figura 3).

Não há relatos de estudos do efeito de lectinas vegetais sobre espécies de *Pectobacterium spp.* até então, sendo PeLL uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de novos controles alternativos para esses microrganismos. Lectinas como PgTeL (isolada da sarcotesta de *Punica granatum*) também possui atividade anti-*Candida*, tendo seu potencial relacionado, por exemplo, a indução de estresse oxidativo, colapso do metabolismo energético e alterações ultraestruturais das células do microrganismo (SILVA et al., 2018). Além de PgTeL, a lectina CasuL demonstrou potencial antimicrobiano frente a *Candida krusei*, causando alterações morfológicas e danos celulares a esses microrganismos (PROCÓPIO, et al., 2017).

ApuL, extraída da inflorescência de *Alpinia purpurata*, foi eficaz na inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, causando alterações morfológicas mesmo em concentrações sub-inibitórias (FERREIRA et al., 2018). PeLL demonstrou maior eficácia anti-*Candida* que PeRoL, a lectina isolada da raiz de *P. elatior*, que apresenta um CMI 11 vezes maior (16,5 mg/mL) que o de PeLL (SILVA et al., 2019).

4. Conclusão

Uma nova lectina termestável e com atividade antimicrobiana foi isolada a partir do extrato de folhas de *P. elatior*.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (407192/2018-2) e concessão de bolsas de pesquisa (PMGP e THN), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro (APQ-0108-2.08) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001). SPS agradece à FACEPE pela concessão de bolsa de Mestrado (IBPG-0387-2.08/17).

Referências

- BOSE, P. P et al. A glucose/mannose binding lectin from Litchi chinesis seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**. v.6, p.242-252, 2016.
- COELHO, J.S; et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**. vol. 77, p. 934–938, 2009.
- COSTA, R. B. **Purificação, caracterização e avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de *Genipa americana***. 2018. p99 (Tese) Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Alagoa. Maceió, 2018.

- DAMASCENO, S. R. **Efeito antinecrótico das lectinas ConA E ConBr na lesão de células acinares pancreáticas induzida por sais biliares, álcool e ácido palmitoleico: Envolvimento do dompínio lectínico.** p111. 2015. (Dissertação) Programa de pós graduação em farmacologia da Faculdade de Medicina do departamento de Fisiologia. Universidade Federal do Ceará. Ceará. 2015.
- DAVIS, C.N.; SMITH, E. Kinetics of papain - catalyzed hidrolisis of a-N-Benzoyl-L-arginine Ethyl Ester. **Methods of biochemical analysis.** v. 2, p. 215 - 18, 1955.
- DHUNA, V. *et al.* Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines. **Journal of biochemistry and molecular biology,** v. 38, n. 5, p. 526, 2005.
- GOMES, F. S.; *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leat. **Journal of applied microbiology.** v.114, p627-679. 2013.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. 1955. **Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents.** In: *Methods in Enzymology* (S. Colowick & N. Kaplan, eds.). Academic Press, v. 1, p. 67-90, 1955.
- JACQUES, A.V. *et al.*, Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry international,** v. 62, n. 6, p. 836-842, 2013.
- KENMOCHI, E. *et al.* Isolation and Biochemical Characterization of Apios Tuber Lectin. v20, n.1, p988-1001. **Molecules.** 2015
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature,** v.227, p.680-685, 1970.
- LOWRY, O. H., *et al.* *Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.* **Journal of Biological Chemistry.** v. 193, p. 265-276, 1951.
- MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characteriazation of a lectin from phaseolus vulgaris.v.59, p783-787. **Plant Physiology.** 1997
- Paiva, P. M. G. & Coelho, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied of Biochemistry and Biotechnology* v.36, p.113-118, 1992.
- PAIVA, P.M.G. *et al.* Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.** Badajoz: Formatex Research Center, 2013.

- PRADELLA, F. M. et al. Níveis circulantes da lectina ligadora de manose (MBL) na degeneração macular relacionada à idade. v.81, n.2, p 120-124, **Araquivos brasileiros de Oftalmologia**. 2018
- 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**. v.98, p.419-429. 2017.
- REISFELD, R.A.; Lewis, V.J. , Willians, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, p. 281 - , 1962.
- RODRIGUEZ, J. P. G. **Abordagens alternativas para a obtenção de novos metabólitos secundários produzidos a partir de linhagens fúngicas**. 2018 p58. (Tese) Doutorado em Ciências. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.
- SÁ, R.A et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wppd science and technology**. v.43, p.85-95. 2009.
- SANTOS, A. F.S. et al. Preparação de lectinas de *Moringa oleifera* com atividade coagulante. v.2, n.2, p. 38-39. **Caderno de Cultura e Ciência**. 2007.
- SANTOS, M. L.R. **Lipossomas convencionais e sítios específicos (lectina-conjugada) contendo antineoplásicos**. 2005. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
- SILVA, C. M. et al Extraction of the lectin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) and the effect of divalent cations on the hemagglutinating activity. v30, n1, p1-5. **Food science and technology**. 2010.
- SILVA, O. D. F. et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in veterinary science**, v. 96, n. 2, p. 276-282, 2014.
- SILVA, P.M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. v.123, p.600-608. **International Journal of biological macromolecules**. 2018.
- SILVA. J. D. F. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.126, e.1, p291-297. 2019

SILVA, J. D. F. et al. Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.126, e.1, p291-297. 2019

ZHOU, J. *et al.* Lectin-gated, mesoporous, photofunctionalized glyconanoparticles for glutathione-responsive drug delivery. v.51, p. 9833-9836. **Royal Society of Chemistry**. 2005.

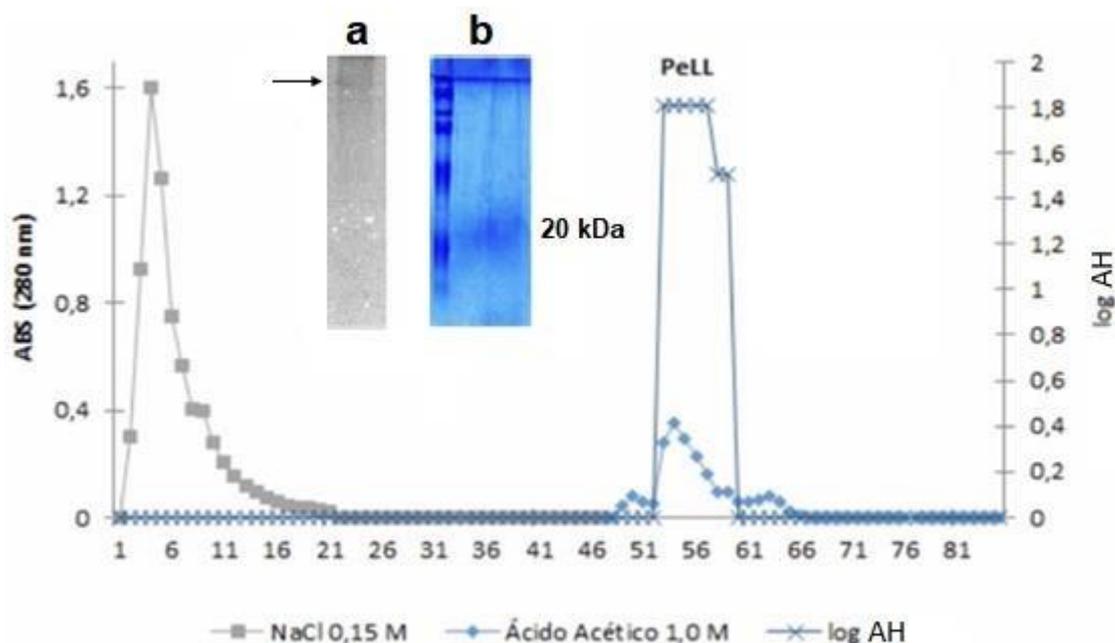


Figura 1 – Purificação da lectina de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL) (A) Cromatografia do extrato de folhas em coluna de quitina. A etapa de lavagem foi realizada com NaCl 0,15 M e a eluição de PeLL com ácido acético 1 M. Frações contendo 2.0 mL foram coletadas a cada 6 minutos e lidas em espectrofotômetro a uma absorvância de 280 nm. As amostras que continham picos acima de 0,100 foram reunidas. *Insets*: (a) Eletroforese em condições nativas para proteínas ácidas (10%). (b) SDS PAGE.

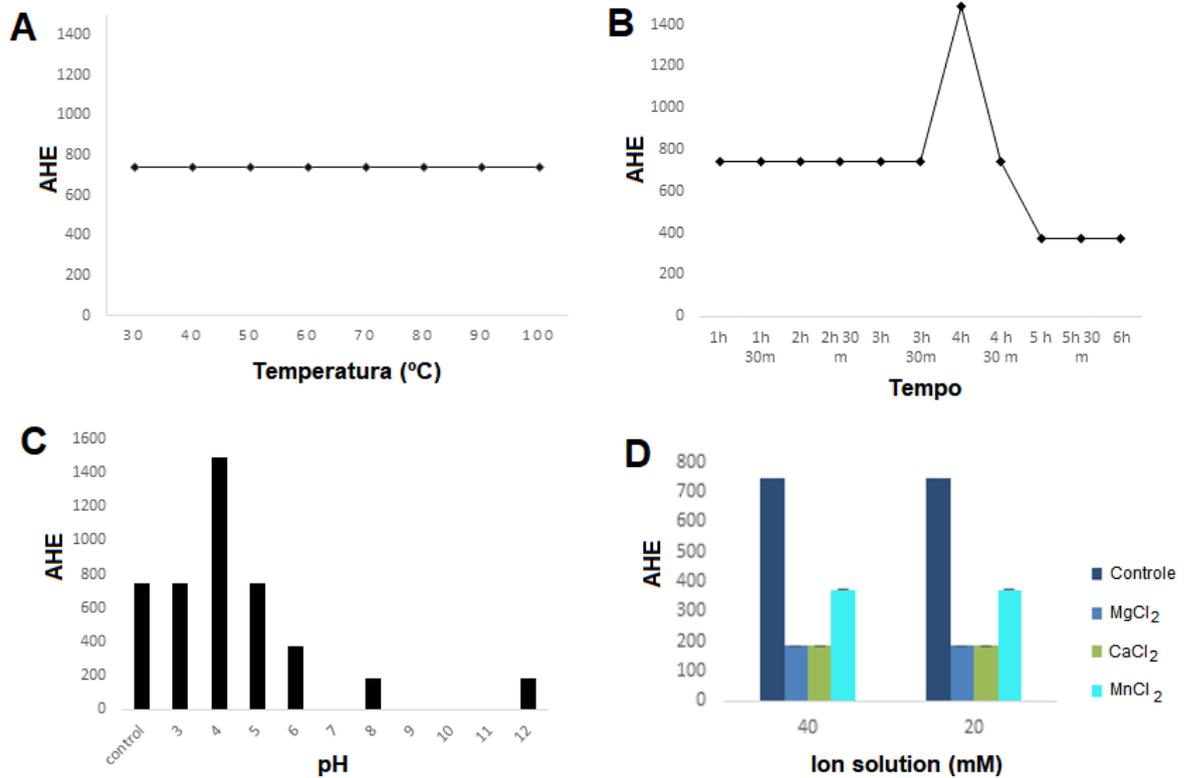


Figura 2 – Caracterização da atividade hemaglutinante (AH) de PeLL em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de cátions. (A) PeLL foi incubada por 30 min em temperaturas que variaram de 30 a 100 °C antes de ser avaliada quanto a sua AH. (B) Amostras de PeLL foram incubadas por até 6 h a 100 °C. (C) PeLL foi incubada com diferentes valores de pH (3-12) previamente à determinação da sua AH. (D) PeLL foi incubada com MgCl₂, MnCl₂ e CaCl₂ e teve sua AH avaliada. AHE: AH específica. Nos ensaios controle a AH da lectina em NaCl 0,15 M foi determinada.

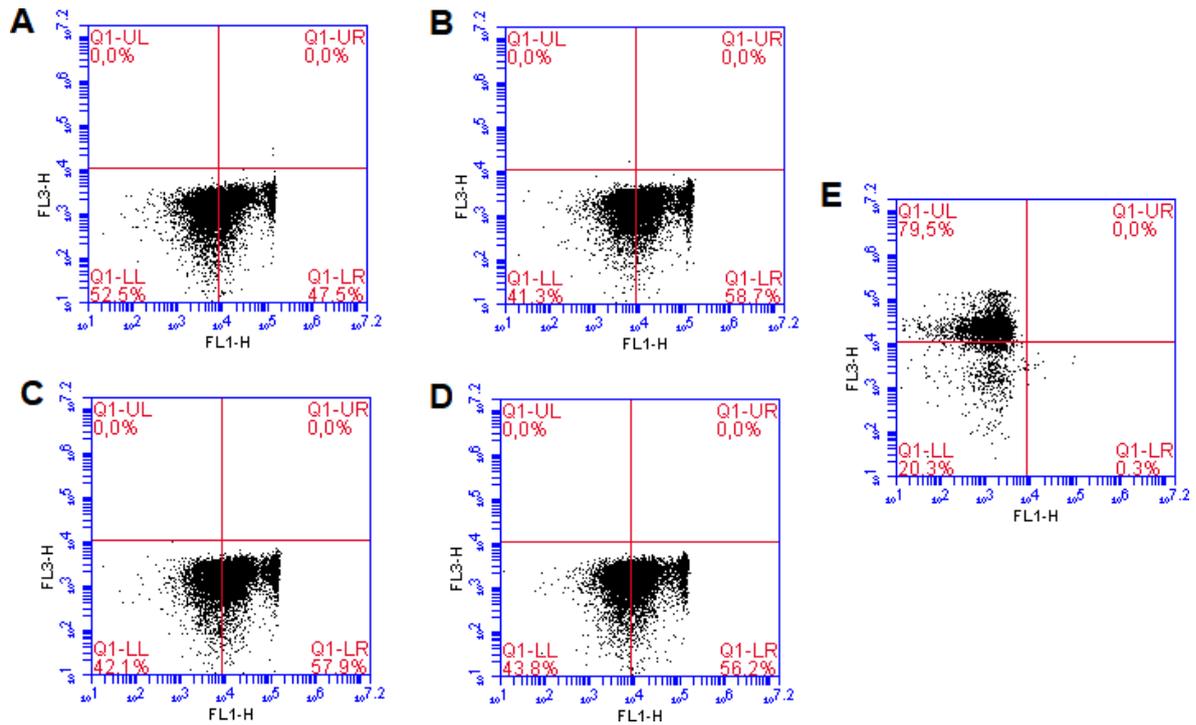


Figura 3 – Avaliação da ocorrência de apoptose e necrose em células de *Candida* tratadas com a lectina de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL). Os seguintes tratamentos foram avaliados: controle negativo (A), PeLL a $\frac{1}{2}$ CMI (B), PeLL na CMI (C), PeLL a $2 \times$ CMI (D) e controle positivo álcool isopropílico (E). Nos dot plots, células em apoptose podem ser vistas no quadrante Q1-LR e células em necrose no quadrante Q1-UL. Células viáveis aparecem no quadrante Q1-LL. No quadrante Q1-UR encontram-se células em necrose ou apoptose tardia.

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante (AH) de PeLL na presença de carboidratos (200 mM) e glicoproteínas (1 mg/mL).

Carboidrato/Glicoproteína	AHE
Albumina	540
Manose	1.081
Galactose	1.081
Glicose	2.162
N-acetil-glucosamima	2.162

AH de PeLL na ausência dos carboidratos e glicoproteínas: 2.162. AH foi determinada em eritrócitos de coelho. AHE: AH específica.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de PeLL.

Bactérias	CMI	CMB
<i>Pectobacterium carotovorum brasiliensis</i>	0,185	0,74
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>	0,185	0,74
<i>Pectobacterium</i> sp. (rúcula)	0,185	0,74
<i>Pectobacterium</i> sp. (alface)	0,185	0,74
Fungos	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i>	1,48	ND
<i>Candida krusei</i>	1,48	ND
<i>Candida tropicalis</i>	1,48	ND
<i>Candida parapsilosis</i>	0,74	2,96

ND: não detectado. Os valores estão expressos em µg/mL

4 CONCLUSÃO

Uma nova lectina (PeLL) termoestável com atividade antimicrobiana foi purificada das folhas de *Portulaca elatior*. PeLL é uma proteína de 20 kDa ligadora de manose, galactose e albumina, com maior AH em faixa de pH ácido e altamente resistente ao aquecimento. Essa lectina se mostrou eficaz contra espécies de *Candida* e *Pectobacterium*.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M. *et al.* Extraction of polyphenol, flavonoid from *Emblica officinalis*, citrus limon, *Cucumis sativus* and evaluation of their antioxidant activity. *Oriental Journal of Chemistry*. London. v.28, n.2, p.993-998. 2012.

ALONSO, D. B.M. **Terapia farmacológica antifúngica en estomatología**. 57 f. 2018. (Trabalho de conclusão de curso) Universidad inca garcilaso de la vega, Facultad de estomatología. 2018.

ARAUJO, D.F.D; *et al.* The concentration of minerals and physicochemical contaminants in conventional and organic vegetables. **Food Control**. v 44, p.242-248. 2014.

ARMSTRONG, J. *et al.* A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**. v. 22, n. 3, p. 120-127. 2014.

AUGUSTO, J. F; *et al.* Giant amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermoestable trypsin. **Food Chemistry**, v.133, n.4, p.1596-1602, 2012.

BARNABÉ, L. E. G. *et al.* **Avaliação do efeito antimicrobiano de plantas medicinais sobre enterococcus faecalis envolvidos em infecções endodônticas secundárias**. In: III Congresso Interdisciplinar de Odontologia da Paraíba. 3, Anais. Paraíba, 2018. Disponível em:<http://archhealthinvestigation.emnuvens.com.br/ArcHI/article/view/3933/pdf>. Acesso em 02 de jul. 2018.

BELO M.M.S.P. Uso de agrotóxicos na produção de soja do estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista brasileira de saúde ocupacional**. v37, e.125, p78-88. 2012.

BERTO, C. *et al.* Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. **Revista uningá**, v. 55, n. 3, p. 52-71. 2018.

BEZERRA, A. P. **Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra candida albicans**. 41 f, (Trabalho de conclusão de curso), Centro de Ciências da saúde. Universidade Federal da Paraíba. 2015.

BEZERRA, R. C. **Purificação, caracterização e avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de *Genipa americana* (Jenipapo)**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Escola de enfermagem e Farmácia, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

BRANDÃO, L. D. S. **Prevalência e susceptibilidade antifúngica de *Candida spp* implicadas na candidíase vulvovaginal em gestantes**. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2017.

Brasil: Cadeia produtiva de hortaliças gira, por ano, R\$ 55 bilhões. **ABSCEN**. Rion de Janeiro, 2016. Disponível em <<http://www.organicnet.com.br/2016/10/brasil-cadeia->

produtiva-de hortaliçascgira-por-ano-r-55-bilhoes/>. Acesso em 10 de jul. 2019.

BRITO, J. S. *et al.* Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 94, p. 865-872, 2017.

BRONDINI, V. F. *et al.* Exposição a agroquímicos e a relação com doenças crônicas: revisão narrativa. **Ciências da Saúde**, Santa Maria. v. 19, n. 2, p. 201-206. 2018.

CAMPOS, J. K. L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. *Biochimie open*, v. 2, p. 62-68, 2016.

CARGNIN, M.C.S; *et al.* Fumicultura: uso de equipamento de proteção individual e intoxicação por agrotóxico. **Revista de pesquisa cuidado é fundamental**. v.9, n.2, p.466-47, 2017.

CARNEIRO, L. M.; XAVIER, F. B. Infecção vaginal causada por *Candida sp*: revisão da literatura. **Revista uningá**. v. 7, n. 1, p.2318-0579. 2017.

CARVALHO, K. P. **Casos confirmados de intoxicações exógenas por agrotóxicos: uma análise de registros ocorridos no espírito santo de 2007 a 2016**. (Dissertação) Mestrado em Saúde coletiva, Universidade do Espírito Santo. 2019.

CAVALCANS, M. B.; NASCIMENTO, S. M. S. G. **Áreas protegidas na Caatinga: Um estudo de caso no Parque Estadual de Pedra da Boca**. Dissertação (Curso de especialização em Ciências Ambientais) Paraíba, 2006.

CAVALCANTE, T. T. A. *et al*; A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. v.4, p.1073–1078. 2013.

CEMBRANEL A.S, FRIGO E.P, SAMPAIO S.C, *et al.* Residue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in urban lake. **Engenharia agrícola**. v37,e.6, p.1254-1267.

CHAGAS, A.C.S. *et al*; Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,. v.13, n.1, p.156-160, 2004.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and functions. 5 ed. London. **Cambridge University Press**.1998.

CHARUNGCHITRAK, S; *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.

COELHO A. A. O.; GIULIETTI A. M. O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 24, n. 3, p. 655-670, 2010.

COELHO, L.C. B. B; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v.11, p.295-300, 2000.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2816-2823. 2006.

DA PAZ, E. L. *et al.* Prevalência de *Candida* em equipes das clínicas odontológicas da Faculdade de Odontologia de Pernambuco. *Revista CIENTEC*. v.10, n.1, 1-10. 2018.

DAS, I. *et al.* Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. **International Journal of Infectious Diseases**. Reino Unido, v.15, p.759-763. 2011.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**. London, v.5, n.1, p.161-169. 2014.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Relatório de gestão do exercício de 2017**. Nov de 2017. Disponível em <<https://www.embrapa.br/documents/10180/1549626/Relat%C3%B3rio+de+Gest%C3%A3o+2017/3181da57-30f1-84a9-6292-916ae2170477>> Acessado em: 18 de jul 2019

EVANGELISTAS, L. F. **Efeito hipoglicêmico da lectina de folhas de *bauhinia monandra* kurz. (bmoll) em ratos wistar com diabetes mellitus tipo 2**. 2018. P 41. (Trabalho de conclusão de curso) Centro de ciências biológicas, Universidade Federal Rural do semi-árido, Mossoró, 2018.

FARIA N. M. X., *et al.* Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil. **Neurotoxicology**. v. 45, p. 347-354, 2014.

FEBRAPDP. **Evolução da área cultivada no sistema de plantio direto na palha – Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/IE/2016/tec1-1216.pdf>> Acesso em: 14 jun. 2019.

FERRAREZI, J.H. **Fungos isolados da Antártica com atividade antibacteriana a fitopatógenos**. 2019. p58. (Dissertação) Mestrado em Ciências biológicas, Programa de pós graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, 2019.

FERREIRA, E. F; *et al.* Uso de extratos vegetais no controle in vitro do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 346-352, 2014.

FERREIRA, G. R. S., *et al.* Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**. . v.124, p, 152–162, 2018.

FIGUEIRA, F. R. **Ação antifúngica de um jato de plasma não-termico de hélio/ar**

comprimido sobre biofilmes de *Candida albicans*. Dissertação (Programa de Pós-graduação em biotecnologia) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. 2016.

FILHO, R.C. ***Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle.** 1ed in: Embrapa recursos genético e biotecnologia e biotecnologia. 2008.

FONSECA, M. C. *et al.*, Potencial de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais No Controle de Fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

FRANCISCO, P.R.M. *et al.* Umidade antecedente e índice de vegetação da diferença normalizada no mapeamento da caatinga. **Agropecuária científica no semiárido**. v.13, n.2, p.82-91. 2017

FREIRE, F. C. O. A introdução de fitopatógenos e doenças emergentes na agricultura cearense. **Essentia**, v.16, n.2, p .22–39. 2015.

FREITAS, L. G; *et al.* Controle alternativo de nematoides.XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 33, p. 3436, 2008.

GAVALDÀ, J. *et al.* Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infeccion fúngica invasiva por *Candida spp.* **Enfermedades Ineciosas y Microbiologia Clinina**. v21, n.9, p 498-508. 2003.

GODOY, P. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* Bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.98, n.3. p. 1-5. 2003.

GOMES, F. S.; *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leat. **Journal of applied microbiology**. v.114, p627-679. 2013.

GONÇALVES, M. S. *et al.* **Uso sustentável de pesticidas. Análise comparativa entre a União Europeia e o Brasil.** 170 f (Dissertação) Doutorado em Ciências do Ambiente, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. 2016.

GONDIM, A. C. S. *et al.* The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 175, p. 179-189, 2017.

GONG, J. *et al.* Genetic Differentiation, Diversity, and Drug Susceptibility of *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**. v.9, p 17-27. 2018.

HILLER, E.; ZAVREL, M.; HAUSER, N. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medical Microbiology**. v.301, p.384-380. 2011.

KAHL, V.F.S. *et al.* Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. **Enviromental and molecular mutagenesis**. v.57, n.1, p.74-84. 2016.

KAKEYA, Hiroshi *et al.* National trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia in Japan from 2003 to 2014. **Medical mycology journal**, v. 59, n. 1, p. E19-E22, 2018.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. v.46, p.120-128. 2008.

KAUR, A. *et al.* Monitoring growth, survival and enzyme system of melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) under the influence of affinity purified pea lectin. **Entomological Science**. v.16, p. 91–99. 2013.

KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GÖKSEL, S.; HATEMI, H. H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 84, p. 241-245, 2003.

KHOURI, S. *et al.* Avaliação de infecções por *Candida* em um hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil: distribuição de espécies, colonização, fatores de risco e suscetibilidade antifúngica. **Revista Pan Amazônica de Saúde**. v.7. p. 401-405. 2016.

KUSSUMI T.A, *et al.* Avaliação de hexaclorociclohexano em águas nas circunvizinhanças de um passivo ambiental. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.70, n.3, p408-411. 2011.

LI, S. Q.; COVINO, N. D.; STEIN, E. G.; TILL, J. H.; HUBBARD, S. R. Structural and biochemical evidence for an autoinhibitory role for tyrosine 984 in the juxtamembrane region of the insulin receptor. **The journal of biological chemistry**. v. 278, p. 26007-26014, 2003.

LIMA, T. A. *et al.* Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest Management Science**. v.73, p.991-998. 2017.

LIN, M. Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-casecontrol study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 49, p.4555-4560. 2005.

LIN, P; BUN, N.G. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10481-10486, 2008.

LO, H. Y. *et al.* Hypoglycemic effects of *Trichosanthes kirilowii* and its protein constituent in diabetic mice: the involvement of insulin receptor pathway. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 53, 2017.

LOPES. C. V.A; ALBUQUERQUE. C. G. S. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**. v.42, n.117, p 518-534, jun 2018.

LUSTOSA, M. A. F. Saberes relacionados ao uso de plantas medicinais e influência na prática didática dos estudantes de Mãe D'Água, Paraíba, Brasil. **Scientia Plena**. v.

13, n.6 p.1-9.. 2017.

MEDEIROS M.N.C, MEDEIROS, M.C, SILVA M.B.A. Intoxicação aguda por agrotóxicos anticolinesterásicos na cidade do Recife. **Epidemiologia Serviço de Saúde**. v23, n4, p.509-518. 2014.

MELO, E. T.; SALES, M. C. L.; OLIVEIRA, J. G. B. Aplicação do índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) para análise da degradação ambiental da microbacia hidrográfica do riacho dos cavalos Crateús-CE. **RAEGA**, v.23, n.1, p.520-533, 2011.

MELO, M. R. *et al.* Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **Revista CIENTEC**. V. 9, n.2, p. 15-24. Recife. 2018.

MENDEZ A. *et al.* Modeling the dynamics of DDT in a remote tropical floodplain: indications of post-ban use. v.23, n.11, p.10317-10334. **Environmental science and pollution research**. 2016.

MENEZES, E. A. *et al.* Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in Ceará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 54, p.1-3. 2012.

MENGISTU, A. *et al.* Evaluation of soybean genotypes for resistance to Charcoal rot. **Plant Management Network**, v. 12, n. 1, p. 6. 2011.

MENGISTU, A. *et al.* Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. **Plant Health Progress**. v.14, n. 1, p. 25. 2013

MENGISTU, A.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; PARIS, R.L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p. 2453-2461, 2007.

MENOZZI, C. A. C. *et al.* Otimização da síntese do fluconazol: um importante fármaco antifúngico da classe dos azóis. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n.2, p.119. 2017.

MORACE, G.; BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. **Minerva Anestesiologica**. v.76, n.11, p.950-956. 2010.

MOURA, K. S. *et al.* Coagulant activity of water-soluble *Moringa oleifera* lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.180, p.1361–1371. 2016.

MOURA, M. C. *et al.* Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

MOURA, R. M. *et al.* *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 656-668, 2013.

MOVAFAGH, A. *et al.* The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. **Archives of Advanced in Bioscience**, v. 4, 2013.

NAGORE, B. B. **Estado actual de las resistencias de Candida a los fármacos antifúngidos y estudio de los mecanismos implicados**. 34f, 2018.(Trabalho de conclusão de curso) Ciências Médicas. Facultad de Medicina y enfermería. 2018.

NAPOLEÃO, T. H. *et al.* Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research*. v. 110, p. 609–616. 2012.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa Oleifera* lectin. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 504-508. 2009.

NETO, J. X. S. *et al.* **Purificação, caracterização bioquímica e atividade contra Candida spp. de uma nova proteína ligante a quitina de sementes de Moringa oleifera Lam.** 109f. Dissertação (Pós-Graduação em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

NÓBREGA, L. P. **Potencial fungitóxico dos óleos essenciais de copaíba e eucalipto sobre fitopatógenos**. 2018. 36 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Sistemas Agroindustriais) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2018.
NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v.6,n.3, p.124-128. 2002.

OLIVEIRA, J. F. C. **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018. 62 p. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

OSTERNE, V. J. S. *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International jornal of biological macromolecules**, v. 94, p. 271-282, 2017.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. **Formatex Research Center**, pp. 396-406. 2010.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In: A. Mendez-Vilas. (Org.). Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 1ed. Badajoz: **Formatex Research Center**, pp. 641-649. 2013

PAN, S. *et al.* Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 133, n. 2, p. 154-164, 2010.

PANIZZO, M. M.; PÉREZ, C. Y MANISCALCHI, M. T. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida sp.* y serotipos de *Candida albicans* de pacientes con vaginitis primaria y resurgente. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**. Caracas, v.20 n.1. 2000.

PIMENTA, R. S. *et al.* Utilização De Leveduras Antárticas Em Estratégias De Controle Biológico De Doenças Pós-Colheita De Frutos Armazenados A Baixas Temperaturas. **Revista capim dourado**. v.1, n.1, 2018.

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**. v.98, p.419-429. 2017

QU, W. *et al.*; Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1585-1591, 2012.

RAMOS, D. B. *et al.* Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. **Chinese Journal of Biology**, 2014.

RAMOS, D. B. *et al.* Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 148-157, 2019.

REGINA, M.; BORBA, R. A. A pesquisa participante no direcionamento de tratamento de fitopatógenos. **Revista eletrônica tecnicocientífica do instituto federal de Santa Catarina**. v.1, n.6, p 52-55. 2018.

ROCHA, C. H. L. *et al.* Virulência de isolados clínicos de *Candida tropicalis*. **Revista de investigação biomédica**. São Luís. v.9, n.2, p.118-128, 2017.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO E. V. S. B. **A vegetação do bioma Caatinga**. p.11-24 In: Vegetação e flora das caatingas. Recife. 2002.

RÜDIGER, H. **Structure and Function of Plant Lectins, in Glycosciences: Status and Perspectives** (eds H.-J. Gabius and S. Gabius), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. 1996.

SÁ, R.A *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wppd science and technology**. v.43, p.85-95. 2009.

SALVADOR, C. A. **Feijão - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. São Paulo, nov. de 2017. <Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/_feijao_2017_18.pdf>. Acesso em: 01 de jul. de 2019

SANCHES, M. D. **Infecção experimental por *Candida spp.* e tropismo para o sistema nervoso central**. 2018. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Botucatu, 2018.

SANTANA, G. M. S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. *Bioelectrochemistry*, v. 85, p. 56-60. 2012.

SANTOS, A.F.S; *et al.* Lectins: important tools for biocontrol of *Fusarium* species, in: T.F. RIOS, E.R. ORTEGA (Eds.), *Fusarium: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention*. **Nova Science Publishers**. p.161–175. 2012.

SCORZA, J. R., *et al.* Environmental behavior of sulfentrazone and fipronil in a Brazilian clayey latosol: field experiment and simulation. **Ciência e Agrotecnologia**. v.38, n.5, p. 415-423, 2014.

SELL, A. M; *et al.* Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, n.5, p.701-707. 2003.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.75, p. 213-267. 2011.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v.177, n.53, p.949-959, 1972.

SILVA, L. M. Sistema bragantino: um método inovador e alternativo de cultivo e produção agrícola que engloba rotação e consórcio de culturas com técnicas de plantio direto. **Revista Craibeira de Agroecologia**.v.1, n.1. 2018.

SILVA, M. *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**, v. 1840, n. 7, p. 2262-2271, 2014.

SILVA, P. M. *et al.* The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**. v. 27, p. 695-702. 2016.

SILVA, R. J. A. **Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia)**. f.69. 2018. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

SILVA, S.P. **Purificação, caracterização e avaliação da atividade antifúngica da lectina da raiz de *Portulaca elatior***. 2017, 45p. (Trabalho de conclusão de curso). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Pernambuco. 2017.

SILVA, V. *et al.* Red de diagnóstico en micología médica.vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**. **Santiago**, v.19, n.2. 2002.

SILVA, J. D. F. *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological**

Macromolecules. v.126, e.1, p291-297. 2019.

SOLDINI, S. *et al.* Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates associated with fungaemia and their impact on mortality. v.24, n.7, p.771-777. **Clinical microbiology and infection.** 2018.

SOUZA, V. C.; HARRI, L. **Botânica Sistemática** – APG III. 3ed. 2009

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; SANTOS, A.M.M. **Análise de representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto no bioma Caatinga.** Trabalho apresentado no Seminário Avaliação e Identificação de Ações Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável dos Benefícios da Biodiversidade do Bioma Caatinga, Petrolina. 2000.

TAPIA, C. *et al.* Antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from AIDS patients with oropharyngeal and esophageal candidiasis. Experience with Etest. **Revista Medica de Chile.** v.131, n. 515-519. 2003.

TAVECHIO, E. L. G; GUIDELLI, G; PORTZ, L. Alternatives for the prevention and control of pathogens in fish farming. **Boletim do Instituto de Pesca.** v. 35, n. 2, p. 335 - 341, nov. 2018.

TEIXEIRA J.R.B; *et al.* Intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola em estados do Nordeste brasileiro, 1999-2009. **Epidemiologia Serviços de Saúde.** p23, n3, p497-508. 2014.

TOTH, I.K. *et al.* Soft rot erwiniae from genes to genomes. **Molecular plant pathology,** London, GB, v.4, p.17-30, 2003.

VAKHANIA, M. A.; ALEKSIDZE, N. G. Plant lectins: biochemical characterization and function. **Annals of agrarian science,** v. 11, n. 3, p. 1-8, 2013.

VALLABHANENI, S., *et al.* The global burden of fungal diseases. **infectious diseases clinics.** v.30, n.1, p1-11, 2016.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W. J. Plant Lectins: versatile proteins with importante perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.** v.15, p. 199-227,1998.

VASCONCELOS, A. A.; MENEZES E. A.; CUNHA F. A. Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of *Candida spp.* Isolated from Urine. **Mycopathologia.** v.171, p.125-130. 2011.

VENKATESAN, P.; PERFECT, J. R.; MYERS, S. A. Evaluation and management of fungal infections in immune compromised patients. **Dermatology and Therapy.** v.18, p.44-57. 2005.

VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica.** v.37, n.1, p.18-23, 2011.

VIEIRA, M. O. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR (ITSrDNA) DE FUNGOS RHIZOCTONIA ISOLADOS DE SOLOS BRASILEIROS**. 45f, 2018. (Trabalho de conclusão), Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Goiás. 2018.

VINCHE, A. D. L. **Atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides***. 87 p. (Doutorado em Medicina Tropical) Programa de pós graduação em Medicina Tropical - Universidade Estadual Paulista. 2018.

VIOLLATI, M.R; TEBALDI, N.D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.3, p.268270, 2016.

WALERON, M., *et al.* Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, nov. v.4, n.2, p. 85–93 2018.

XIAO, Jun *et al.* JACALIN-LECTIN LIKE1 regulates the nuclear accumulation of GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN7, influencing the RNA processing of FLOWERING LOCUS C antisense transcripts and flowering time in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 2102-2117, 2015.

ZHANG, H. *et al.* Lectin PCL inhibits the Warburg effect of PC3 cells by combining with EGFR and inhibiting HK2. **Oncology reports**, v. 37, n. 3, p. 1765-1771, 2017.

ZUO, Z. *et al.* Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **Springerplus**, v. 1, n. 1, p. 13, 2012.