



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JADY ALVES DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO LECTÍNICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FRAÇÕES PROTEICAS
DAS FOLHAS DE *Combretum leprosum* Mart.**

MOSSORÓ

2021

JADY ALVES DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO LECTÍNICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FRAÇÕES PROTEICAS
DAS FOLHAS DE *Combretum leprosum* Mart.**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Michele Dalvina Correia da Silva, Profa. Dra.

MOSSORÓ

2021

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D812c Duarte, Jady Alves.
CARACTERIZAÇÃO LECTÍNICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FRAÇÕES PROTEICAS DAS
FOLHAS DE *Combretum leprosum* Mart. / Jady Alves
Duarte. - 2021.
47 f. : il.

Orientadora: Michele Dalvina Correia da Silva.
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2021.

1. Planta. 2. *Combretum leprosum*. 3. lectina.
4. antimicrobiano. I. Correia da Silva, Michele
Dalvina, orient. II. de Queiroz Ambrósio, Márcia
Michelle, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JADY ALVES DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO LECTÍNICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FRAÇÕES PROTEICAS
DAS FOLHAS DE *Combretum leprosum* Mart.**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Michele Dalvina Correia da Silva, Profa. Dra. (UFERSA)
Orientadora

Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Luciano Lira de Oliveira, Bel. (Instituto Educacional Sementes)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, dona Terezinha e seu Rodrigues, por terem me criado, me amado e me ensinado o significado de dedicação, carinho e empatia.

À minha tia Marisa, por ter sempre me protegido e possibilitado que eu pudesse alcançar meus sonhos, mesmo que nem sempre concorde com eles.

Às minhas tias, Claudia e Glassineide, por terem me dado afago, esperança e luz, quando eu não conseguia enxergar os caminhos para trilhar.

À minha tia Terezinha, que tão precocemente veio a falecer, e continua no meu coração. À meus familiares amados, Milca, Bianca, Henrique, João Vitor, Tio Assis, Gabrielly, Tio Marcos, Tia Ruth e Tio Lúcio, agradeço todo o amor, o carinho, o companheirismo e por serem uma família tão maravilhosa.

À minha mãe, Claudiana, por sempre tentar me resgatar e buscar o reencontro, nunca saberei dizer o quanto voltar para perto da senhora significou para mim.

Ao meu namorado, Herculanno, por ter me apoiado e acreditado em mim, e aos meus amigos, Rostand, Brito, Gisleudo, Gabriel, Isaac, Yuri, Marta Lúcia, Irismar, e Bruna, que mantiveram meu sorriso e enxugaram minhas lágrimas.

À professora Dra. Michele Dalvina, pelas possibilidades que me dispôs, pelos conhecimentos que me ofereceu e pelo exemplo que é, como mulher e pesquisadora.

Aos colegas do LABCEMOL, pelos ensinamentos e companheirismo, e à Carlos Silveira, por todo o conhecimento e suporte nos meus primeiros passos dentro da vida acadêmica.

À banca, professora Márcia Michelle e Luciano Lira, agradeço pela disponibilidade e participação nesse momento.

E à UFERSA por toda estrutura, e pela vivência acadêmica, que foi incrível do começo até um fim que espero que nunca chegue.

"Minha essência é inconsciente de si própria e
é por isso que cegamente me obedeço."

Clarice Lispector

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos exemplos mais visíveis da evolução biológica contemporânea, resultado das pressões seletivas promovidas pela diversidade e concentração de antibióticos utilizados. O uso desenfreado de antibióticos levou à geração de uma série de cepas bacterianas resistentes aos mais fortes exemplos de antibióticos, e isso já se tornou uma grande preocupação para a sociedade médica. Para a agricultura, a presença nas lavouras de fungos fitopatógenos resistentes aos fungicidas está relacionada a grandes perdas econômicas com a destruição de plantações. Desse modo, a detecção e bioprospecção de novas moléculas com ação antimicrobiana se tornou uma área de pesquisa atual e necessária para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de microrganismos patógenos resistentes aos antibióticos já presentes no mercado. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), também conhecida como mufumbo ou carne-de-vaca, é uma espécie vegetal de grande importância etnofarmacológica; seus tecidos são utilizados na medicina popular para tratar diversas enfermidades. Além dos efeitos biológicos de metabólitos secundários da planta já bem caracterizados, a presença de lectinas bioativas em folhas de *C. leprosum* foi previamente descrita. Devido suas propriedades de ligação reversível e específica a carboidratos, essas proteínas promovem ações biológicas variadas sobre células. O objetivo desse estudo foi caracterizar a atividade lectínica e investigar o potencial antimicrobiano de frações proteicas obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*. As folhas de *C. leprosum* foram submetidas a trituração, extração em NaCl 0,15 M, fracionamento proteico (por saturação com sulfato de amônio a 30 %, 30 - 60 % e 60 - 90 %) e diálise exaustiva das frações proteicas. As amostras obtidas, extrato bruto (EB) e frações proteicas (F1D, F2D e F3D, obtidas a partir das saturações salinas e, em seguida, dialisadas) foram avaliadas quanto à concentração proteica (pelo método de Lowry et al., 1951), presença de lectinas bioativas (por ensaios de atividade hemaglutinante, AH), ensaios de inibição da AH (utilizando carboidratos) e estabilidade da atividade lectínica em condições variáveis de temperatura e pH. Frações proteicas foram aplicadas em colunas cromatográficas de afinidade, troca iônica e exclusão molecular. As frações cromatográficas coletadas, correspondentes a picos (detectados por leitura de absorbância a 280 nm) foram avaliadas quanto à concentração proteica e AH. O potencial antimicrobiano de preparações foi avaliado sobre o crescimento micelial dos fungos *Fusarium falciforme* e *Macrophomina phaseolina* bem como sobre cinco espécies de bactérias para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). As preparações apresentaram alta concentração proteica. Elevada atividade lectínica também foi detectada em todas as preparações, não sendo revelada especificidade lectínica a nenhum dos carboidratos testados. As frações proteicas apresentaram atividade lectínica até 100 °C (com redução a partir de 50 °C). A AH variou em diferentes valores de pH (com redução em pH ácido e neutro). Processos cromatográficos de F1D e F2D em quitina resultaram em picos de material adsorvido e eluído com AH. As preparações não inibiram o crescimento de *Fusarium falciforme* e *Macrophomina phaseolina*. No entanto, EB, F2D e F3D apresentaram atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Planta, *Combretum leprosum*, lectina, antimicrobiano.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is one of the most visible examples of contemporary biological evolution, a result of the selective pressures promoted by the diversity and concentration of antibiotics used. The rampant use of antibiotics has led to the generation of a series of bacterial strains resistant to the strongest examples of antibiotics, and this has already become a major concern for the medical society. For agriculture, the presence in crops of phytopathogenic fungi resistant to fungicides is related to great economic losses with the destruction of plantations. Thus, the detection and bioprospecting of new molecules with antimicrobial action has become a current and necessary research area for the development of new control strategies for pathogenic microorganisms resistant to antibiotics already on the market. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), also known as mufumbo or beef, is a plant species of great ethnopharmacological importance; its tissues are used in folk medicine to treat various ailments. In addition to the biological effects of well-characterized secondary plant metabolites, the presence of bioactive lectins in *C. leprosum* leaves has been previously described. Due to their reversible and specific carbohydrate binding properties, these proteins promote varied biological actions on cells. The aim of this study was to characterize the lectin activity and investigate the antimicrobial potential of protein fractions obtained from *C. leprosum* leaves. The leaves of *C. leprosum* were subjected to grinding, extraction in 0.15 M NaCl, protein fractionation (by saturation with ammonium sulfate at 30%, 30 - 60% and 60 - 90%) and exhaustive dialysis of the protein fractions. The samples obtained, crude extract (EB) and protein fractions (F1D, F2D and F3D, obtained from saline saturation and then dialyzed) were evaluated for protein concentration (by the method of Lowry et al., 1951), presence of bioactive lectins (by hemagglutinating activity assays, HA), HA inhibition assays (using carbohydrates) and stability of lectin activity under variable conditions of temperature and pH. Protein fractions were applied to affinity, ion exchange and molecular exclusion chromatographic columns. The collected chromatographic fractions, corresponding to peaks (detected by absorbance reading at 280 nm) were evaluated for protein concentration and HA. The antimicrobial potential of preparations was evaluated on the mycelial growth of *Fusarium falciforme* and *Macrophomina phaseolina* as well as on five species of bacteria for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). High protein concentration preparations. Elevated lectin activity was also detected in all preparations, with no lectin specificity being revealed to any of the carbohydrates tested. Protein fractions showed lectin activity up to 100 °C (with reduction from 50 °C). The HA varied at different pH values (with reduction in acidic and neutral pH). Chromatographic processes of F1D and F2D in chitin resulted in peaks of material adsorbed and eluted with HA. The preparations did not inhibit the growth of *Fusarium falciforme* and *Macrophomina phaseolina*. However, EB, F2D and F3D showed bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Plant, *Combretum leprosum*, lectin, antimicrobial.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Influência da temperatura na atividade hemaglutinante específica de frações proteicas obtidas a partir de folhas de <i>C. leprosum</i>	35
Gráfico 2	–	Influência do pH na atividade hemaglutinante específica de frações proteicas obtidas a partir de folhas de <i>C. leprosum</i>	36
Gráfico 3	–	Cromatograma da fração 30 % dialisada, obtida a partir do extrato bruto de folhas de <i>C. leprosum</i> (F1D) em coluna de quitina	37
Gráfico 4	–	Cromatograma da fração 30 - 60 % dialisada, obtida a partir do extrato bruto de folhas de <i>C. leprosum</i> (F2D) em coluna de quitina	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Título de atividade hemaglutinante (AH^{-1}), estimativa proteica e AH específica (AHE) das preparações obtidas a partir de folhas de <i>C. leprosum</i> 34
Tabela 2	– Atividade antibacteriana de preparações obtidas a partir de folhas de <i>C. leprosum</i>39
Tabela 3	– Atividade antifúngica de preparações obtidas a partir de folhas de <i>C. leprosum</i> 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PeRoL	Lectina das raízes de <i>Portulaca elatior</i>
AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
<i>ApulSL</i>	Lectina de sementes de <i>Apuleia leiocarpa</i>
<i>BmoRoL</i>	Lectina das raízes secundárias de <i>Bauhinia monandra</i>
<i>Helja</i>	lectina das sementes de girassol
EB	Extrato bruto
F1	Fração proteica obtida com saturação do EB a 0 - 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
F2	Fração proteica obtida com saturação do EB a 30 - 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
F3	Fração proteica obtida com saturação do EB a 60 - 90% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
F1D	F1 dialisada.
F2D	F2 dialisada.
F3D	F3 dialisada.
p/v	peso/volume
ARG	Genes de resistência a antibióticos
PBP	Proteínas ligantes a penicilina
ME	Membrana externa
PLS	Lipopolissacarídeos
CBEL	Lectina ligante a celulose
OMPS	Proteínas da membrana externa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	Erro! Indicador não definido.
2.1 Microrganismos com resistência à controles químicos	Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Fungos	Erro! Indicador não definido.
2.1.2 Bactérias	Erro! Indicador não definido.
2.2 Plantas como fonte de biomoléculas: Propriedades biológicas	Erro! Indicador não definido.
2.3 Lectinas	Erro! Indicador não definido.
2.3.1. Lectinas de origem vegetal.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.2 Potencial antimicrobiano de lectinas vegetais.....	Erro! Indicador não definido.
2.4 Familia combretaceae	Erro! Indicador não definido.
2.4.1 Gênero <i>Combretum</i>	Erro! Indicador não definido.
2.4.2 <i>Combretum leprosum</i>	Erro! Indicador não definido.
3. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
3.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
4.1 Material biológico	Erro! Indicador não definido.
4.2 Preparo dos extratos e precipitados proteicos	Erro! Indicador não definido.
4.3 Diálise	Erro! Indicador não definido.
4.4 Quantificação proteica.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Ensaios de atividade hemaglutinante (AH) e determinação da AH específica (AHE).....	Erro! Indicador não definido.
4.6 Ensaios de inibição da AH	Erro! Indicador não definido.
4.7 Influência da temperatura e pH na AH.....	Erro! Indicador não definido.
4.8 Caracterização por métodos cromatográficos	Erro! Indicador não definido.
4.9 Caracterização através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	Erro! Indicador não definido.
4.10 Reativação e ajuste de concentração das cepas	Erro! Indicador não definido.
4.11 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).....	Erro! Indicador não definido.
4.12 Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM).....	Erro! Indicador não definido.
4.13 Avaliação da atividade antifúngica	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31Erro! Indicador não definido.
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

Uma crescente preocupação para a comunidade médica é o surgimento de bactérias super-resistentes, decorrentes da transmissão de genes de resistência a antibióticos (ARG - antibiotic resistance genes) que ameaçam a eficácia de modernas respostas de antimicrobianos a patógenos e representam grande risco para a saúde (PEHRSSON e al., 2016). Quando as bactérias adquirem ARG, decorre a multirresistência aos atuais antibióticos, tornando-os obsoletos (QIAN X, 2016).

Assim como as bactérias resistentes são uma preocupação para a comunidade médica, as pragas fúngicas com resistência aos fungicidas representam uma problemática constante para a agricultura, provocando perdas de plantios por infestação de fungos fitopatógenos (TAJ-ALDEEN et al, 2017). O desenvolvimento da resistência microbiana é um processo natural; entretanto, a falta de medidas eficientes de prevenção e controle de infecções, além do uso excessivo e inadequado de antimicrobianos estão entre as causas relacionadas ao desenvolvimento acelerado da resistência e à disseminação de microrganismos resistentes aos agentes de controle (CAPOZZI; MAURICI; PANÀ, 2019). As pesquisas focadas em encontrar novas estratégias bioterapêuticas e de controle de patógenos para ajudar a solucionar as problemáticas envolvendo bactérias e fungos patogênicos podem ser consideradas prioritárias para a área de pesquisa médica e para a biotecnologia aplicada à agricultura. Desse modo, são investigadas novas fontes de biomoléculas ativas, principalmente de origem vegetal, que possam oferecer compostos moleculares com atividade biológica de controle sobre patógenos resistentes (QIAN X et al, 2016).

A utilização de biomoléculas de origem vegetal como ferramentas biotecnológicas de amplo interesse farmacológico e industrial tem se revelado de grande importância para o desenvolvimento tecnológico atual. Nesse aspecto, realizar pesquisas com o objetivo de purificar e caracterizar biomoléculas ativas oriundas de plantas é promissor, tanto pela alta variedade de metabólitos (primários e secundários) quanto pela maior facilidade de acesso ao material de obtenção (LAM; NG, 2011).

Entre as diversas moléculas que possuem atividades biológicas de interesse destacam-se as lectinas, proteínas ou glicoproteínas expressas por animais, plantas, fungos, vírus e bactérias. Elas contêm um ou mais domínios para reconhecimento de carboidratos que permitem a elas se ligarem reversivelmente e sem modificações a glicanos, isto é, não exibem atividade catalítica contra as moléculas de carboidratos. Como elas se ligam de maneira reversível e específica aos carboidratos, sejam açúcares simples ou carboidratos complexos,

as lectinas são capazes de precipitar polissacarídeos e glicoproteínas ou aglutinar células (NASCIMENTO et al., 2012).

Os tecidos vegetais possuem o título de sistema modelo para a obtenção de lectinas. Deste modo, uma grande variedade de lectinas de origem vegetal já foi purificada e caracterizada, demonstrando atividades biológicas de interesse, também atuando como promissores agentes para estratégias de controle de patógenos (LAM; NG, 2011).

Dentro da família vegetal Combretaceae, o gênero *Combretum*, seguido do gênero *Terminalia*, é o mais explorado na medicina popular (LORENZI, 2002). Diversas espécies desse gênero e seus diferentes tecidos (folhas, cascas e sementes) demonstraram potencial biológico em infusões e chás, sendo amplamente utilizados na etnofarmacologia, e consequentemente, alvos de interesse para estudo e pesquisa sobre sua composição de bioativos (FACUNDO et al, 2005).

A espécie *Combretum leprosum*, pertencente à família Combretaceae, é uma das espécies que possuem relevância etnofarmacológica, detendo potenciais anti-inflamatório, antiulcerogênico e antinociceptivo já descritos na literatura (FACUNDO et al., 2005; NUNES et al., 2009). Também foi observada atividade antimicrobiana em extratos metanólicos e, além disso, a presença de lectinas em seus tecidos já foi detectada (PEREIRA, 2013a).

Os estudos envolvendo a avaliação das atividades biológicas de *C. leprosum* têm demonstrado potenciais semelhantes àqueles observados em outras espécies do gênero. Trabalhos envolvendo *Combretum leprosum* têm evidenciado propriedades antimicrobianas, citotóxicas e anti-proliferativas de extratos dos tecidos e de moléculas já isoladas da planta (FACUNDO et al., 2005). As propriedades biológicas e constituição lectínica de *C. leprosum* previamente descritas, despertaram o interesse de investigar e caracterizar lectinas em folhas de *C. leprosum* bem como de explorar o potencial biológico de preparações obtidas contra microrganismos patogênicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Microrganismos com resistência à controles químicos

A resistência de organismos a produtos químicos utilizados para o controle de pragas tem sido um problema em diversas áreas, como na saúde, devido a existência de microrganismos patogênicos, e na agricultura, com o aumento na frequência de infestações por fitopatógenos e insetos praga (GHINI; KIMATI, 2002).

A utilização de produtos químicos como método de controle de microrganismos fitopatógenos causadores de doenças de plantas é uma das principais ferramentas adotadas pelo agronegócio. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos tornaram esse método extremamente disseminado. Entretanto, o uso inadequado promoveu a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados por fungicidas que anteriormente apresentavam eficácia. Atualmente, a resistência microbiana é um dos mais importantes problemas do controle químico de doenças de plantas, causando perdas consideráveis na agricultura (GHINI; KIMATI, 2002).

2.1.1. Fungos

Entre os fungos mais destrutivos contra plantas estão os gêneros *Fusarium* e *Macrophomina*. As espécies do gênero *Fusarium* causam considerável perda econômica na agricultura e podem atuar como patógenos humanos, fenômeno conhecido como patogenicidade de trans-reino (DE HOOG et al., 2019). Quase todas as espécies de *Fusarium* estão entre os fungos que possuem características estruturais e funcionais inerentes para resistir a antifúngicos. A resistência primária é encontrada naturalmente entre algumas espécies de *Fusarium* sem exposição prévia à droga. A resistência secundária aos azólicos se desenvolve entre as cepas anteriormente suscetíveis após a exposição ao agente antifúngico. Apesar dos azóis utilizados na agricultura serem diferentes, todos têm como alvo o mesmo sítio ativo, o lanosterol-14 α -desmetilase, e a resistência é geralmente dependente de alterações na expressão de CYP51, o gene que codifica esterol 14 α -desmetilase. CYP51 em *Fusarium* tem três parálogos (CYP51A, -B e -C), com CYP51C sendo encontrado apenas no gênero (AL-HATMI et al., 2016).

A resistência de *Fusarium* se tornou mais evidente nas últimas duas décadas, quando houve uso inadequado de azóis, substâncias químicas utilizadas na medicina para tratamento de infecções fúngicas e na agricultura como fungicidas, as quais podem proporcionar a seleção e a multiplicação de fungos resistentes a esses compostos (TAKAHASHI; MELHEM,

2014; AL-HATMI et al., 2016). Os mecanismos de resistência desenvolvidos pelo gênero *Fusarium* podem ser avaliados pelo tipo de alteração molecular desenvolvida, como as alterações alvo, que implicam em mutações pontuais e superexpressão de genes alvos dos agentes de controle, ou as alterações não-alvo que se desenvolvem por meio de sistemas de efluxo das drogas e de formação de biofilme (BUSI ZHAO; DAN HELIWANG, 2021).

Assim como as espécies do gênero *Fusarium*, a *Macrophomina phaseolina* também atua como um agente comum de fitopatogenicidade, caracterizando-se como um patógeno generalista necrotrófico. Essa espécie causa doenças como a podridão do caule e da raiz, podridão do carvão e podridão de mudas. Tal agente pode vir a infectar mais de 500 espécies hospedeiras, causando perdas substanciais aos cultivos (ISLAM et al., 2012; PANDEY et al., 2020).

A importância do estudo de agentes de controle para *Macrophomina* é demonstrada pelas perdas causadas por esse patógeno, por exemplo na cultura da soja. A dificuldade de controle ocorre pela resistência intrínseca do fungo, que pode ficar viável no solo por mais de 4 anos na forma de escleródios (PANDEY et al., 2020). A patogenicidade de *Macrophomina* ocorre por meio da adesão do fungo no tecido superficial da planta. ISLAM et al. (2012) detectaram 8 formas de uma lectina ligante a celulose (CBEL) no genoma de *M. phaseolina*, que atua no processo de adesão inicial para a infecção, assim como transglutaminases capazes de estimular uma resposta imune da planta.

2.1.2. Bactérias

Bactérias resistentes, ou superbactérias, são os microrganismos que sofrem alterações genéticas como mutações cromossômicas, transferência de plasmídeos ou por elementos de transposição que as tornam resistentes a determinados antibióticos, visto que fármacos possuem diferentes mecanismos de ação (OLIVEIRA; AIRES, 2016).

O desenvolvimento de resistência pode variar de acordo com o tipo bacteriano. As bactérias Gram-negativas se diferenciam das Gram-positivas por possuírem uma membrana externa (ME), uma característica protetora e única. A ME possui fosfolipídios que estão ligados ao folheto interno da membrana e lipopolissacarídeo (LPS) ligado ao folheto externo que é conhecido por causar choque endotóxico. Além disso, a ME contém proteínas chamadas proteínas da membrana externa (OMPs), como as porinas e outras que permitem a passagem de pequenas moléculas como aminoácidos e pequenos sacarídeos (GUPTA; DATTA, 2019).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é o principal motivo da resistência a uma ampla gama de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, quinilons, colistinas e outros antibióticos. Qualquer alteração na membrana externa por bactérias Gram-negativas, como alteração das propriedades hidrofóbicas ou mutações nas porinas e outros fatores, pode criar resistência. Essa camada importante, ausente nas bactérias Gram-positivas, é o que torna as bactérias Gram-negativas mais resistentes aos antibióticos do que as Gram-positivas (MILLER, 2016).

O mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas pode ocorrer por meio de duas estratégias principais: por degradação enzimática do antibiótico pela produção de β -lactamases, ou pela diminuição da afinidade e suscetibilidade de seu alvo, a proteína de ligação à penicilina (PBP), por qualquer aquisição de DNA exógeno ou por alterações nos genes PBP nativos (LOZANO; TORRES, 2017).

Entre as espécies resistentes, *Staphylococcus aureus* é considerado um organismo de ocorrência comum. 90 % dos isolados clínicos de *S. aureus* apresentam resistência ou pré-resistência contra penicilina. Um dos mecanismos de resistência ocorre pela presença e ação das betalactamases, expressas pelo microrganismo por meio do gene blaZ (ZHANG et al., 2021). A resistência de *S. aureus* à meticilina (MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*), outro betalactâmico, ocorre devido à síntese de uma proteína de ligação à penicilina modificada denominada BP2a. As Proteínas de ligação à penicilina (PBP – penicillin-binding proteins) de alto peso molecular são alvos dos antibióticos β -lactâmicos e a ligação da meticilina as proteínas leva a liberação de enzimas autolíticas que degradam a parede celular pré-formada, seguida da morte celular bacteriana (LOZANO; TORRES, 2017; ZHANG et al., 2021).

Os isolados clínicos resistentes produzem uma PBP adicional, a PBP2a, também denominada PBP2, com baixa afinidade de ligação a componentes β -lactâmicos, codificada pelo gene mecA. A presença da proteína modificada resulta em uma baixa efetividade do antimicrobiano, criando cepas pré-resistentes. Também foi detectada resistência de *S. aureus* à vancomicina, daptomicina, fluoroquinolonas e tetraciclina (SIZAR; UNAKAL, 2021; ZHANG et al, 2021).

Assim como *S. aureus*, bactérias do gênero *Enterococcus* também podem desenvolver resistência por meio de modificações e superprodução de proteínas ligantes à penicilina (PBP), além do uso de outros mecanismos, como bombas de efluxo, proteção ribossomal e síntese de precursores da parede celular modificados pelos genes vanA e vanB, genes descritos como adquiridos pelos organismos (LOZANO; TORRES, 2017; STĘPIEŃ-PYŚNIAK et al., 2021).

É um grande desafio descobrir substâncias antimicrobianas eficientes para o desenvolvimento de novos produtos. Alguns materiais como nanopartículas de prata têm apresentado atividade antimicrobiana razoável; no entanto, possuem certo nível de toxicidade para células, o que limita suas extensas aplicações. Nessa perspectiva, a descoberta de materiais biológicos sem toxicidade celular, porém com características ativas contra microrganismos é um campo importante para o desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos (LEVY; MARSHALL, 2004).

2.2. Plantas como fontes de biomoléculas: propriedades biológicas

A utilização de plantas com função terapêutica vem ocorrendo desde os primórdios da civilização humana. Com o advento da tecnologia aliada ao conhecimento tradicional associado, tem sido possível a purificação das biomoléculas que desencadeiam respostas biológicas de interesse, ou seja, o princípio ativo (DE AQUINO et al., 2007).

O uso de biomoléculas de origem vegetal como ferramentas biotecnológicas de amplo interesse farmacológico tem se revelado de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos. Isso ocorre, sobretudo, devido ao vasto potencial de tais moléculas, no que diz respeito a possibilidades de aplicações (LAM; NG, 2011).

A pesquisa de base que se compromete em isolar e caracterizar tais moléculas ativas têm promovido a obtenção de uma diversidade de preparações e purificados de interesse farmacológico. Por exemplo, foram observadas altas concentrações de compostos fenólicos (por meio de HPLC) em *Artemisia annua*, os quais apresentaram atividade antioxidante e atividade inibitória contra o crescimento de células cancerígenas (RYU et al, 2011). *Vaccinium corymbosum* L. possui metabólitos obtidos por extração etanólica e aquosa com atividade antiinflamatória e não citotóxica (SAMAD et al, 2014). Extratos etanólicos das cascas de *Anacardium occidentale* apresentaram diversos compostos fenólicos como xantonas, triterpenos, flavonas, ácidos anacárdico e gálico, demonstrando atividade nos testes antimicrobianos contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e bactérias gram-positivas e gram-negativas (DA SILVA et al. 2016). BISWAS et al. (2021) obtiveram nanopartículas de ferro a partir dos tecidos foliares de *Mikania mikrantha* com alta atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter spanius* e *Chromobacterium pseudoviolaceum*. Trabalhos de caracterização determinaram que as nanopartículas eram constituídas de associações de terpenoides, flavonoides, fenilpropanoides, ácidos fenólicos e proteínas presentes no extrato foliar (BISWAS et al, 2021).

Além da aplicabilidade farmacológica, preparações obtidas de tecidos vegetais também podem ser utilizadas como uma alternativa de controle biológico contra fitopatógenos, sendo uma solução que engloba duas vantagens: um controle efetivo para pragas já resistentes a agentes de controle químicos e a substituição desses agentes sintéticos por soluções biológicas não agressivas ao solo e, possivelmente, também não agressivas a organismos benéficos para o ambiente de cultivo (MEENA et al, 2021).

Extratos orgânicos (em acetona, hexano, metanol e DCM) de tecidos foliares de diferentes espécies nativas da África do Sul (*Bucida buceras*, *Breonadia salicina*, *Harpephyllum caffrum*, *Olinia ventosa*, *Vangueria infausta* e *Xylothea kraussiana*) foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano contra fitopatógenos; o extrato de *B. buceras* teve a melhor atividade antifúngica contra quatro fungos, *P. expansum*, *P. janthinellum*, *T. harzianum* e *F. Oxysporum* (MAHLO et al., 2010). Extratos alcoólicos das folhas de *Thevetia peruviana* apresentaram 100 % de atividade inibitória contra *Alternaria solani*, fungo fitopatógeno que causa perdas econômicas significativas na cultura da batata. A doença é controlada principalmente por métodos tradicionais, por meio da aplicação de fungicidas químicos (MEENA et al, 2021). Pesquisas adicionais sobre o desenvolvimento de formulações à base de biomoléculas oriundas de tecidos vegetais possibilitam novas abordagens de controle favoráveis ao meio ambiente e viáveis para o gerenciamento de doenças em cultivos vegetais.

Entre as várias classes de moléculas vegetais com potencial biológico de interesse para o isolamento está presente o grupo das lectinas, definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que possuem um sítio não catalítico que se ligam reversivelmente e seletivamente a açúcares (mono ou oligossacarídeos) ou também a glicoconjugados (GOLDSTEIN, 1980).

2.3. Lectinas

Inicialmente vistas como proteínas tóxicas, as lectinas tornaram-se ferramentas bastante exploradas em estudos clínicos, estruturais, genéticos, fisiológicos e moleculares. As lectinas são moléculas amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em todas as classes e famílias de organismos vivos, desde microrganismos até animais vertebrados, invertebrados e plantas (SHARON; LIS, 1989).

Essa ubiquidade das lectinas demonstra a importância biológica dessa classe de proteínas, refletindo sua participação efetiva em atividades fisiológicas diversas, intra e intercelularmente. Tal participação se dá, sobretudo, pela característica de ligação das lectinas

com carboidratos, sendo os açúcares importantes mediadores de respostas celulares (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Estruturalmente, as lectinas são um grupo muito diverso de proteínas ou glicoproteínas que possuem sítios não catalíticos de ligação a açúcares; essa variedade estrutural sugere que lectinas desempenham papel importante em reações de reconhecimento (NASCIMENTO, 2010).

Muitas lectinas são purificadas de diferentes organismos. Porém, também podem ser produzidas a partir de métodos recombinantes, tal como o protocolo desenvolvido para obtenção de uma lectina das folhas do alho que, após otimização do processo tecnológico, resultou na obtenção eficiente da biomolécula (até 20 mg/L de meio de cultura) (UPADHYAY, et al., 2010).

Os organismos modelo para a obtenção de lectinas são as plantas, principalmente as leguminosas. Essa preferência se dá não apenas pela facilidade de purificação comparado ao processo de purificação de lectinas de outros organismos, mas também pelo alto rendimento em miligramas e pela grande variedade de lectinas com especificidade determinada para carboidratos (SHARON; LIS, 1990).

A primeira classificação das lectinas se deu por sua afinidade a carboidratos; entretanto, essa classificação era baseada apenas nos monossacarídeos reconhecidos com maior afinidade pelas lectinas. Pesquisas voltadas ao entendimento das estruturas moleculares demonstraram que lectinas altamente similares não apresentavam a mesma especificidade a carboidratos; desse modo, a classificação acima só seria útil para fins experimentais e não totalmente eficaz para classificar corretamente lectinas.

2.3.1. Lectinas de origem vegetal

Desde a antiguidade, certas plantas são conhecidas popularmente por serem tóxicas para o ser humano. Inicialmente, acreditava-se que a toxicidade era oriunda de toxinas bacterianas; entretanto, em 1884, foi comprovado por Walden e Waddell que a parte tóxica dos grãos de *Abrus precatorius* (Leguminosae) estava presente em uma fração precipitada por meio de uma extração alcoólica. Posteriormente, em 1886, também foi relatada a toxicidade da mamona (*Ricinus communis*) e, em 1888, foi isolado o princípio ativo que detinha a toxicidade, denominado ricina, também sendo notável sua característica de aglutinar células sanguíneas (STILLMARK, 1888; EHRLICH, 1891). Ambos os constituintes obtidos a partir das duas espécies descritas tratavam-se de lectinas.

As lectinas vegetais foram as primeiras a serem estudadas devido à acessibilidade de coleta dos tecidos de plantas e alta concentração proteica, sendo encontradas em diferentes órgãos vegetais (SHARON; LIS, 2004). Lectinas têm sido relatadas e purificadas de diversas fontes como folhas, frutos, raízes, bulbos, cascas, caules e, principalmente, sementes. Nas sementes, as lectinas podem constituir até 10 % do conteúdo total de proteínas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Diversas lectinas de origem vegetal já foram purificadas e suas propriedades biotecnológicas são vastas, podendo ter, por exemplo, atividade inseticida, antiviral, antimicrobiana entre outras (WANG et al., 2006; PROCÓPIO et al., 2017; ALVES et al., 2019).

2.3.2. Potencial antimicrobiano de lectinas vegetais

Lectinas já se mostraram importantes ferramentas para a microbiologia e controle de patógenos. Isso se deve a sua principal propriedade de associação a açúcares, moléculas as quais podem estar associadas a processos de adesão, ligação e reconhecimento das células microbianas (TEIXEIRA et al., 2007).

As propriedades citotóxicas das lectinas podem desencadear atividades antitumoral, antiviral e antimicrobiana (PROCÓPIO et al., 2017). Existem diversas lectinas purificadas e com especificidade a diferentes carboidratos que demonstraram atividade deletéria em relação a células microbianas, tanto fúngicas quanto bacterianas (FERREIRA et al., 2018).

Lectinas podem mediar a identificação de microrganismos por meio do reconhecimento de glicanos complexos presentes na superfície celular dos organismos alvos. Desse modo, a inativação microbiana ocorre pela interação da lectina com componentes presentes na parede celular dos organismos, como ácidos teicoico e teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (SELITRENNIKOFF, 2001; ZHANG; GALLO, 2016). Lectinas de origem vegetal podem apresentar efeitos diversos contra microrganismos; acredita-se que tais proteínas são de grande importância para a proteção das plantas contra microrganismos fitopatógenos (BOURNE et al., 1994).

Entre lectinas com atividade microbiana, pode-se citar a lectina de sementes de *Apuleia leiocarpa* (*ApulSL*). Tal proteína demonstrou efeitos bacteriostáticos nas bactérias gram-positivas *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* e nas bactérias gram-negativas *Xanthomonas perforans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*. (CARVALHO et al., 2015). A lectina ligante a galactose, isolada das raízes secundárias de

Bauhinia monandra (BmoRoL) mostrou atividade antifúngica em espécies fitopatogênicas de *Fusarium*, com maior efeito contra *Fusarium solani* (SOUZA et al., 2011). Helja é uma lectina específica para manose obtida do girassol por meio de cromatografia de bioafinidade (manose-agarose), a qual possui a propriedade de aglutinar células de *S. cerevisiae* e inibir o crescimento de *Candida tropicalis* (REGENTE et al, 2014).

Outros exemplos de lectinas antimicrobianas são MuHL, lectina com especificidade a glicose, purificada do cerne da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), com amplo espectro de ação bactericida e atividade antifúngica; a PpyLL é outra lectina (*Phthirusa pyrifolia leaf lectin*) com especificidade a frutose, com atividade antimicrobiana mais eficaz contra bactérias gram-positivas (SÁ et al., 2009; COSTA et al., 2010). As lectinas tipo C, de origem animal, atuam como receptores de reconhecimento de padrões que se ligam aos glicanos presentes no envelope viral e ativam respostas imunes dos hospedeiros, induzindo fagocitose, apresentação de antígenos e ativação de células T (MONTEIRO; LEPENIES, 2017).

A inibição do crescimento de espécies de fungos *in vitro* tem sido relatada para algumas lectinas de leguminosas, como a lectina Nielsen, purificada a partir de extratos aquosos dos tecidos de *Archidendron jiringa* (CHARUNGCHITRAK, 2011). O mecanismo pelo qual as lectinas interrompem o crescimento de fungos ainda não está completamente elucidado; no entanto, é compreensível que as lectinas que exibem um certo grau de afinidade com quitina inibam o crescimento da parede celular fúngica, interrompendo o crescimento fúngico (CHARUNGCHITRAK, 2011). É perceptível que lectinas exibem atividade antibacteriana e antifúngica contra patógenos de interesse, através da interação com peptidoglicanos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPSs), ácidos teicóico na parede celular bacteriana e fúngica (IORDACHE et al., 2015).

2.4. Família combretaceae

Combretaceae é uma família botânica pertencente a ordem Myrtales, que possui cerca de 13 gêneros e 500 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais, com maior diversidade de espécies na África e Ásia (TAN et al., 2002; STACE, 2004). Ocorrem no Brasil 6 gêneros e aproximadamente 60 espécies. Os dois gêneros mais frequentes em terras brasileiras são *Combretum* e *Terminalia*, nativos para o Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008).

A utilização das plantas da família Combretaceae é mais comum na área da medicina popular em que são conhecidas por promoverem atividades farmacológicas de interesse. Entre as plantas utilizadas estão *Terminalia fagifolia* Mart., com suas propriedades antiulcerogênica

e antioxidante, e *Terminalia actinophylla* que apresenta ações anti-inflamatória, sedativa e antidiarreica (PÁDUA et al., 2013; NUNES et al., 2014).

De acordo com BABA-MOUSSA et al. (1999), plantas da família Combretaceae utilizadas tradicionalmente na medicina popular também apresentam atividade antimicrobiana de interesse, sendo essas plantas pertencentes aos gêneros *Combretum*, *Terminalia* e *Pteleopsis*.

2.4.1. Gênero *Combretum*

O gênero *Combretum* compreende 370 espécies de plantas lenhosas largamente distribuídas nas regiões tropicais do continente americano, asiático e africano, o gênero *Combretum* apresenta cerca de 10 % de suas espécies citadas na literatura com uso etnofarmacológico (BREYTENBACH; MALAN, 1989).

Na literatura, já foram descritas análises fitoquímicas realizadas com diferentes espécies do gênero *Combretum*, as quais possuem vários princípios bioativos; alguns dos compostos observados são cicloartano, damarano e oleananos triterpenoides, flavonoides, dibenzils aromáticos, estilbenos, fenantrenos, lignanas e aminoácidos (CHOWDHURY; ISLAM, 2004; FYHRQUIST, 2007).

Entre as propriedades farmacológicas do gênero *Combretum*, MOGASHOA et al (2019) observaram diversos componentes de diferentes extratos da folha de *Combretum molle* com propriedades antibacteriana e antifúngica sobre fitopatógenos e patógenos humanos. MCGAW et al. (2001) observaram atividade biológica em extratos de 20 espécies do gênero *Combretum*; entre elas, *Combretum apiculatum*, *Combretum lavono* e *C. molle* com atividade anti-inflamatória, *Combretum hereroense* com ação anti-helmíntica, *Combretum paniculatum* com ação anti-schistosoma e *C. apiculatum*, *C. hereroense* e *Combretum mossambicense* com atividade antibacteriana contra cepas específicas. Extratos de *Combretum erythrophyllum* demonstraram amplo espectro de ação sobre bactérias (MARTINI, 2004).

Entre as espécies do gênero, *Combretum leprosum* Mart., também conhecida como mufumbo, mofumbo ou carne de vaca, é encontrada no Brasil nas áreas tropicais (LORENZI, 2002).

LIMA et al (2011) observaram atividade leishmanicida no extrato etanólico do fruto de *C. leprosum*; o efeito inibitório foi dose dependente, com inibição total do crescimento do parasita a 100 mg/mL, sendo o triterpeno um potente inibidor. FACUNDO et al. (2005) conduziram estudos com o extrato etanólico de raízes de *C. leprosum*, os quais permitiram o isolamento, identificação e caracterização por cristalografia de raios-X de um triterpeno

inédito na literatura, denominado de 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), além do ácido arjunólico, ácido mólico e flavonoides glicosilados.

Também foi identificado que o extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* continha 80 % de monossacarídeos, seguido de triterpenos (10 %), oligossacarídeos menores (5 %) e ácidos graxos (3 %) (FACUNDO et al., 2005). O extrato das raízes de *C. leprosum* e o ácido arjunólico isolado, administrados por via oral, apresentaram atividade anti-inflamatória (FACUNDO et al., 2005).

Apesar dos estudos sobre a constituição de metabólitos secundários de *C. leprosum*, pouco se conhece sobre sua constituição proteica, havendo apenas uma descrição a respeito da detecção de lectina(s) em seus tecidos (PEREIRA, 2013a). Também ainda não existem relatos sobre a bioatividade de extratos aquosos de *C. leprosum*. A constituição lectínica bem como as propriedades biológicas de *C. leprosum* e de outras espécies do gênero previamente descritas despertaram o interesse de investigar e caracterizar lectinas em folhas de *C. leprosum* bem como de explorar o potencial biológico de preparações obtidas contra microrganismos patogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as folhas de *Combretum leprosum* Mart. quanto à constituição lectínica e avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de preparações proteicas obtidas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter preparações a partir das folhas de *C. leprosum* e caracterizá-las quanto ao teor proteico e à atividade lectínica com diferentes eritrócitos, em condições ideais, sob a presença de carboidratos e sob influência de variação de pH e temperatura.
- Caracterizar preparações lectínicas bioativas quanto à propriedade de interação com suportes cromatográficos e perfil eletroforético.
- Avaliar o potencial antibacteriano das preparações proteicas nas bactérias de interesse médico *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans*.
- Avaliar o potencial antifúngico das preparações proteicas nos fitopatógenos *Fusarium falciforme* e *Macrophomina phaseolina*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Tecidos foliares de *C. leprosum* foram coletados em Russas, estado do Ceará, e submetidos à identificação taxonômica baseada na comparação com as coleções pertencentes ao acervo do Herbário Dárdano de Andrade-Lima, do Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA. Os microrganismos utilizados foram obtidos em laboratórios parceiros: Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia no setor de Fitossanidade da UFERSA e Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da UFERSA.

4.2. Preparo do extrato e dos precipitados proteicos

As folhas de *C. leprosum* foram coletadas, higienizadas, desidratadas, trituradas e o material foi peneirado para obtenção de um pó homogêneo. O pó fino obtido foi submetido a extração proteica em NaCl 0,15 M (sob agitação constante), por 16 h a 20 °C, seguida de filtração e centrifugação (a 8000 rpm, por 20 min a 4 °C) para obtenção do extrato bruto (EB). O EB foi submetido a fracionamento proteico com sulfato de amônio (sob agitação constante, por 4 h a 20 °C), utilizando percentuais crescentes de saturação (0 - 30 %, 30 - 60 % e 60 - 90 %); após cada fracionamento, o material foi submetido à centrifugação (a 8000 rpm, por 20 min a 4 °C) para obtenção das frações proteicas precipitadas denominadas F1, F2 e F3, respectivamente.

4.3. Diálise

As frações proteicas obtidas foram submetidas ao protocolo de diálise para a retirada do sulfato de amônio, que poderia agir como um interferente para as avaliações posteriores. F1, F2 e F3 foram dialisadas contra NaCl 0,15 M por 3, 5 e 7 h, respectivamente, com troca da solução a cada 1 h até as últimas duas horas do período. Após dialisadas, as preparações foram denominadas F1D, F2D e F3D, respectivamente.

4.4. Quantificação proteica

As preparações (EB, F1D, F2D e F3D) foram submetidas à quantificação proteica segundo o método de Lowry et al. (1951), sendo utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina.

4.5. Ensaios de atividade hemaglutinante (AH) e determinação da ah específica (AHE)

A detecção e caracterização de atividade lectínica foi feita por meio de ensaios de atividade hemaglutinante (AH) utilizando suspensões de eritrócitos de coelho e do sistema ABO (2,5 %, v/v, em NaCl 0,15 M) previamente tratados com glutaraldeído. As preparações (50 µL) foram submetidas a diluição seriada em NaCl 0,15 M (50 µL), a partir do segundo poço em placa de microtitulação, seguida da adição de eritrócitos (50 µL); o primeiro poço de cada ensaio foi utilizado como controle negativo, recebendo apenas NaCl 0,15M e eritrócitos. Após repouso (por 45 min), o título de AH (AH^{-1}) foi determinado como o inverso da maior diluição que apresentou total aglutinação (CORREIA; COELHO, 1995). A AH específica (AHE) das preparações foi calculada pela razão entre o título de AH e a concentração proteica (AH^{-1} / proteína em mg/mL).

4.6. Ensaios de inibição da AH

Para determinar especificidade lectínica, foram realizados ensaios de AH das preparações na presença dos carboidratos D-(+)-glicose, D-(+)-galactose, D-(+)-manose e D-(+)-trealose dihidratada. Em placa de microtitulação, foram adicionados 50 µL de solução do carboidrato específico, em diferentes concentrações para cada ensaio (25 mM, 50 mM, 100 mM e 200 mM), em todos os poços (exceto o segundo poço que recebeu a solução com o dobro da concentração desejada para ensaio, pois nesse poço ocorreu a adição da amostra em estudo, havendo diluição do carboidrato para a concentração em estudo no ensaio). A preparação em estudo (EB, F1D, F2D e F3D) foi adicionada ao segundo poço, a partir do qual foi diluída de forma seriada e, após 15 min de repouso (tempo necessário para ocorrer possível ligação de lectinas ao carboidrato em teste), foram adicionados em todos os poços 50 µL de uma suspensão eritrócitos do sistema ABO (2,5 %, v/v, em NaCl 0,15 M) previamente tratados com glutaraldeído. Após nova incubação em repouso (por 45 min), o título de AH foi determinado conforme previamente descrito e comparado com o título da AH na ausência do carboidrato, para verificar se houve inibição total, parcial ou ausência de inibição da AH.

4.7. Influência da temperatura e do pH na AH

Foram realizados ensaios de AH de preparações (F1D, F2D e F3D) previamente submetidas à incubação sob diferentes temperaturas ou à incubação em soluções com diferentes valores de pH. Para verificar a influência da temperatura na AH, as preparações foram incubadas em banho maria (por 30 min), em temperaturas variando entre 40 e 100 °C (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C). O efeito do pH sobre a AH foi avaliado por incubação (por

30 min) das preparações em soluções tampão com valores de pH variando entre 5,5 e 9 (citrato-fosfato pH 5,5, 6 e 6,5; salina tamponada com fosfato, PBS, pH 7 e 7,5; Tris-HCl pH 8, 8,5 e 9), todos a 0,01 M, preparados em NaCl 0,15 M. Após incubação, as preparações foram submetidas a ensaios de AH e à determinação da AHE, conforme previamente descrito.

4.8. Caracterização por métodos cromatográficos

Foram realizadas cromatografias com as amostras quantificadas e caracterizadas parcialmente pelos ensaios anteriormente descritos, utilizando matriz de troca iônica (quitina), de exclusão molecular (Sephadex G-75) e de afinidade (guaran). As colunas empacotadas com as matrizes previamente preparadas foram equilibradas com NaCl 0,15M. Em cada processo cromatográfico, a preparação em estudo foi aplicada no suporte sob fluxo contínuo; após a saída de todo o não adsorvido, o material adsorvido foi eluído com NaCl 1 M e, em seguida, com ácido acético 1 M. Todas as frações cromatográficas foram coletadas (6 mL / 2 min) e monitoradas quando à absorbância a 280 nm (UV) e ensaio de AH. Os picos obtidos de material adsorvido e eluído foram dialisados por 7 h (para a retirada do ácido ou do sal) e avaliados quanto à AH e concentração proteica.

4.9. Caracterização através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi realizada técnica eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) para proteínas desnaturadas, sem tratamento por β -mercaptoetanol. As preparações submetidas à eletroforese foram aquelas resultantes dos processos cromatográficos (picos de material adsorvido e eluído). As corridas eletroforéticas foram realizadas sob voltagem constante (150 V) a 70 mA, em temperatura ambiente. Para a detecção de bandas proteicas nos géis, foi utilizada a coloração com azul de Coomassie seguida de descoloração por lavagens sucessivas em ácido acético a 10 % (LAEMMLI, 1970).

4.10. Reativação e ajuste de concentração das cepas

As culturas de estoque estavam sob refrigeração e com baixo nível metabólico. A reativação das cepas foi realizada em meio de cultura nutritivo (caldo BHI; *Brain Heart Infusion*) para a normalização do metabolismo microbiano.

24 h antes do desenvolvimento experimental para avaliação da concentração inibitória mínima, as cepas (*Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175) foram passadas, com o auxílio de um swab estéril, para tubos estéreis

contendo o caldo BHI; em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica sob condições ideais (a 37 °C por 24 h). O crescimento microbiano foi visualizado pela turvação do meio após a incubação.

Após a incubação, a padronização da concentração celular foi executada utilizando a escala nefelométrica de McFarland. Com o auxílio de uma escala comercial, a turbidez dos meios de reativação foi ajustada de forma a apresentarem o mesmo padrão de turvação que a escala comercial. O padrão para esse ensaio foi a escala de MacFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL). Após o ajuste da turbidez, as células foram inoculadas em até 1 h.

4.11. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento bacteriano

Para a avaliação do potencial bacteriostático das amostras, foram observadas a concentração inibitória mínima (CIM), isto é, a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Todas as amostras com concentração proteica definida foram esterilizadas por filtração em filtros PVDF de seringa (0,20 µm). Em seguida, foram adicionados 100 µL de amostra ao primeiro poço, 100 µL de solução de NaCl 0,15 M do segundo ao oitavo poço e 100 µL da amostra ao segundo poço, a partir do qual foi realizado método de microdiluição seriada. Após a adição das amostras e do NaCl 0,15M, foram adicionados 100 µL de meio caldo Mueller-Hinton (CMH) e adicionados 20 µL do inóculo já ajustado em todos os poços. Colunas distintas foram selecionadas para servirem como os controles de esterilidade. Os ensaios foram incubados em repouso por 24 h a 37 °C. Após a incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina a 500 µg/mL (um indicador de viabilidade celular) em todos os poços, incluindo os controles de esterilidade e de crescimento, e realizada uma nova incubação (por 2 h a 37 °C). Em seguida, a mudança de coloração do meio foi observada visualmente. A metabolização da resazurina ocorre por oxirredução na presença de enzimas como NADPH-desidrogenase e NADH-desidrogenase, ocasionando a mudança da cor azul (resazurina) para rosa (resofurina). Logo, quando células no ensaio são capazes de mudar a coloração do meio para rosa devido à metabolização da resazurina, a resofurina resultante é indicativo de células viáveis. A menor concentração do tratamento que impediu a mudança de coloração do meio para rosa foi considerada a CIM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (SANTURIO et al., 2007).

4.12. Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para avaliar a potencial concentração bactericida mínima (CBM) das preparações em estudo, que consiste na mínima concentração capaz de inativar o crescimento de 99,99 % das células bacterianas, os poços do ensaio de CIM em que houve inibição do crescimento (atividade bacteriostática) foram plaqueados com o auxílio de um *swab* estéril em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio ágar Mueller Hinton. Em seguida, as placas foram submetidas à incubação por 24 h a 37 °C. Após a incubação, o crescimento das colônias foi observado visualmente e a CBM foi considerada a menor concentração das amostras contendo inóculo que promoveu 99,99 % de redução do crescimento das colônias em comparação com o controle de crescimento positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (SANTURIO et al., 2007).

4.13. Avaliação da atividade antifúngica

O potencial antifúngico das preparações (EB, F1D, F2D e F3D) foi avaliado *in vitro* contra os fitopatógenos *Fusarium falciforme* (CML 3946) e *Macrophomina phaseolina* (CMM 1531).

As preparações proteicas (100 µL) previamente microfiltradas em filtros PVDF de seringa (0,20 µm) foram aplicadas na superfície das placas de Petri (120 x 90 mm) contendo meio BDA (batata dextrose ágar) e, em seguida, um disco micelial do fungo em estudo (5 mm de diâmetro) foi plaqueado no centro de cada placa. As placas foram incubadas por 72 h a 28 °C, com medição diária do diâmetro de crescimento. Os tratamentos foram constituídos por controle positivo de crescimento fúngico (ausência de amostra), controle negativo (presença de NaCl 0,15 M) e crescimento fúngico na presença de amostras (EB, F1D, F2D ou F3D). Os ensaios foram realizados em triplicata. A inibição do crescimento fúngico foi calculada de acordo com a expressão matemática descrita por OLIVEIRA et al (2020).

$$IC (\%) = (DC - DT) \div DC \times 100$$

Onde IC (%) corresponde à porcentagem de inibição do crescimento fúngico promovido pelo tratamento em relação ao crescimento na ausência do tratamento (controle positivo para crescimento); DC corresponde à média do diâmetro de crescimento no controle positivo para crescimento; DT corresponde à média do diâmetro de crescimento na presença de amostra proteica (OLIVEIRA, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de extração em NaCl 0,15 M rendeu 300 mL de extrato bruto (EB). O fracionamento salino do EB utilizando três saturações resultou em três frações proteicas que, após diálise, foram nomeadas de F1D, F2D e F3D.

Todas as preparações apresentaram elevados títulos de AH com todos os eritrócitos avaliados, especialmente com eritrócitos do tipo AB, bem como elevado teor proteico e AHE (Tabela 1). Os valores de AHE mais expressivas foram obtidas para F1D com eritrócitos tipo AB (AHE: 1.202,71) e F2D com eritrócitos tipo O (1.301). A determinação dos grupos sanguíneos na classificação dos tipos ABO ocorre em função das glicoproteínas presentes no glicocálix dos eritrócitos; desse modo, títulos mais elevados de AH com um determinado tipo de eritrócito sugere especificidade de ligação de lectinas presentes na amostra com as glicoproteínas que compõem o glicocálix desse tipo celular.

Tabela 2 - Título de atividade hemaglutinante (AH^{-1}), estimativa proteica e AH específica (AHE) das preparações obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*

Amostra	E	AH^{-1}	Concentração proteica (mg/mL)	AHE (AH / mg. mL ⁻¹)
EB	AB	8.192	19	431,1
	O	16.384		862,0
	C	8.196		431,3
F1D	AB	65.536	54,49	1.202,7
	O	32.768		601,0
	C	8.196		150,4
F2D	AB	32.768	50,35	650,8
	O	65.536		1.301
	C	32.768		650,0
F3D	AB	32.768	40	819,2
	O	32.768		819,2
	C	32.768		819,2

EB: extrato bruto em NaCl 0,15 M; F1D: fração proteica (0 - 30 %) dialisada; F2D: fração proteica (30 - 60 %) dialisada; F3D: fração proteica (60 - 90 %) dialisada; AH: atividade hemaglutinante; AHE: atividade hemaglutinante específica; E: Eritrócitos glutarizados.

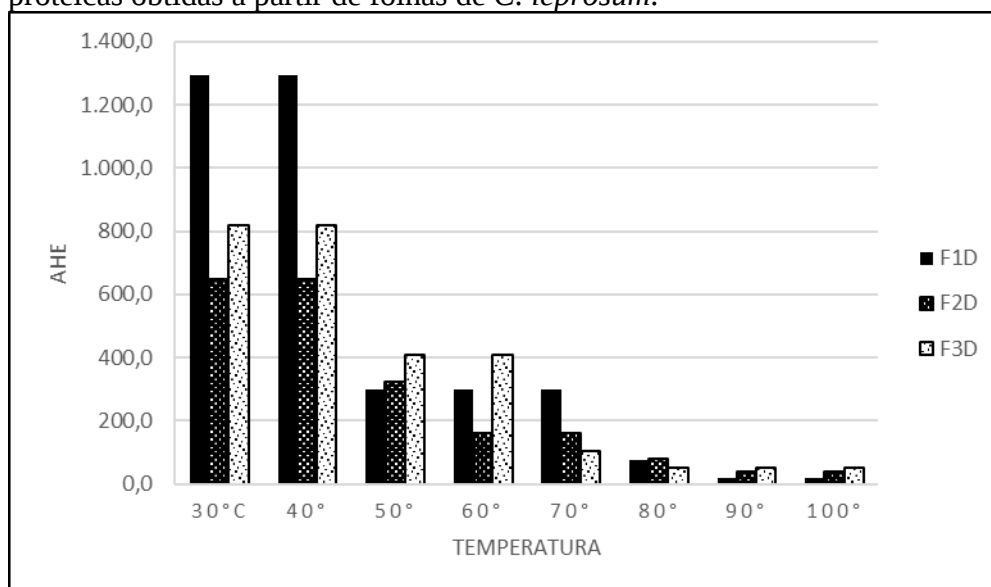
Nos testes de inibição da AH, nenhum dos carboidratos testados foi capaz de inibir a AH das amostras, incluindo os picos cromatográficos, sugerindo que lectinas presentes nas preparações responsáveis pela aglutinação não apresentam especificidade para nenhum dos carboidratos utilizados nesse ensaio. Lectinas podem apresentar especificidade a glicoproteínas, lectinas obtidas a partir das sementes de *Dypsis decaryi* apresentaram especificidade para carboidratos complexos, como albumina, azoalbumina e azocaseína, sem inibição da AH por carboidratos simples (TORRES et al, 2019). As preparações também podem conter inibidores endógenos que impedem a caracterização do perfil de especificidade das moléculas aglutinantes, por competir diretamente com os açúcares utilizados para a inibição (SILVA et al, 2019). Desse modo, novos testes com glicoconjugados devem ser avaliados.

A estrutura da proteína é influenciada por fatores físico-químicos, como variação do pH e da temperatura. Como não existe uma condição única para todas as proteínas, uma caracterização detalhada da atividade biológica frente a influências externas é recomendada para estabelecer as características intrínsecas de cada proteína (CARRILO, 2016). Os ensaios de AH, com eritrócitos AB, após incubação das preparações em diferentes temperaturas mostraram que a AHE de todas as frações proteicas foi detectada até os 100 °C. Aos 40 °C, a AHE foi mantida e, a partir dos 50 °C, ocorreu redução de AHE (gráfico 1). O teste de estabilidade térmica demonstrou que as amostras proteicas das folhas de *C. leprosum* apresentam AH até 100 °C. DA SILVA e colaboradores (2019) definiram a estabilidade térmica da PeRoL (*Portulacaelatior* root lectin) como resultado da presença de ligações dissulfeto associadas a termoestabilidade proteica, também detectadas nas proteínas presentes nas sementes de *Apuleia leiocarpa*, *Bauhinia forficata* e *Moringa oleifera* (DA SILVA, 2019). Portanto, a presença de AH nas amostras de *C. leprosum* a 100 °C pode indicar a presença de lectinas que possuam ligações dissulfeto na estrutura, promovendo estabilidade. Para investigar essa hipótese, outras técnicas eletroforéticas utilizando tratamentos para desnaturação e redução de proteínas devem ser desenvolvidas.

Nos ensaios de AH com eritrócitos AB, após incubação das preparações em diferentes valores de pH, F1D, F2D e F3D apresentaram redução da AH quando incubadas em pH ácido. F1D manteve a AHE constante quando incubada em pH alcalino. F2D e F3D apresentaram aumento da AHE em pH alcalino, otimizada em pH 8,5 (gráfico 2). O pH pode influenciar diretamente na AH das lectinas por meio da desnaturação e perda de interações com íons essenciais para a atividade biológica. Muitas lectinas descritas necessitam de íons para sua atividade. Assim, lectinas vegetais geralmente possuem os íons Mn^{2+} ou Ca^{2+} , os quais

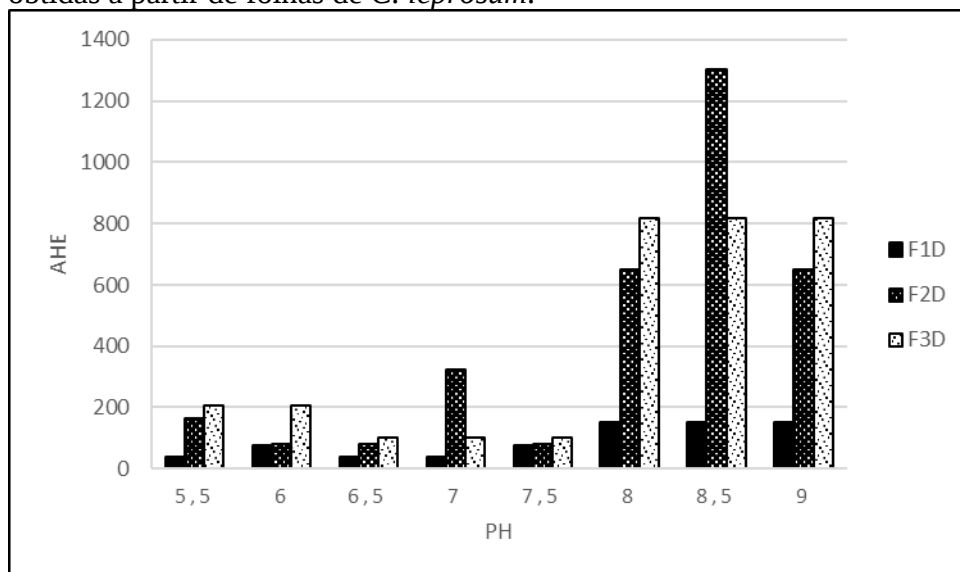
influenciam na sua atividade. Um exemplo é a concanavalina A (Con A) que, quando tratada em meio ácido, perde seus íons metálicos, reduzindo ou perdendo sua atividade de aglutinar eritrócitos. Desse modo, o fator pH é muito importante para a atividade de lectinas (POVINELLI.; FINARDI, 2002). As amostras de *C. leprosum* sofreram reduções drásticas de sua AH em pH ácido, o que pode sugerir a desnaturação parcial e a perda de íons que influenciem na AH de lectinas presentes nas amostras.

Gráfico 1 - Influência da temperatura na atividade hemaglutinante específica de frações proteicas obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*.



F1D: fração proteica (0 - 30 %) dialisada; F2D: fração proteica (30 - 60 %) dialisada; F3D: fração proteica (60 - 90 %) dialisada; temperatura variando entre 30 e 100 °C. AH executada com eritrócitos AB.

Gráfico 2 - Influência do pH na atividade hemaglutinante específica de frações proteicas obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*.



F1D: fração proteica (0 - 30 %) dialisada; F2D: fração proteica (30 - 60 %) dialisada; F3D: fração proteica (60 - 90 %) dialisada; valores de pH variando entre 5,5 e 9.

Processos cromatográficos para possível isolamento lectínico e caracterização foram executados com as preparações F1D e F2D. As amostras foram escolhidas por apresentarem as maiores títulos de AH. Cromatografias de F2D (80 mg) em guaran (10 mL) não resultaram em picos de material adsorvido após a eluição com galactose 300 mM (preparada em NaCl 0,15 M) ou com NaCl 1 M. As frações coletadas do material não-adsorvido não apresentaram AH com eritrócitos glutarizados humanos, tipo AB. Os resultados sugerem que a preparação não possui lectinas com afinidade à galactose e habilidade para ligação ao guaran.

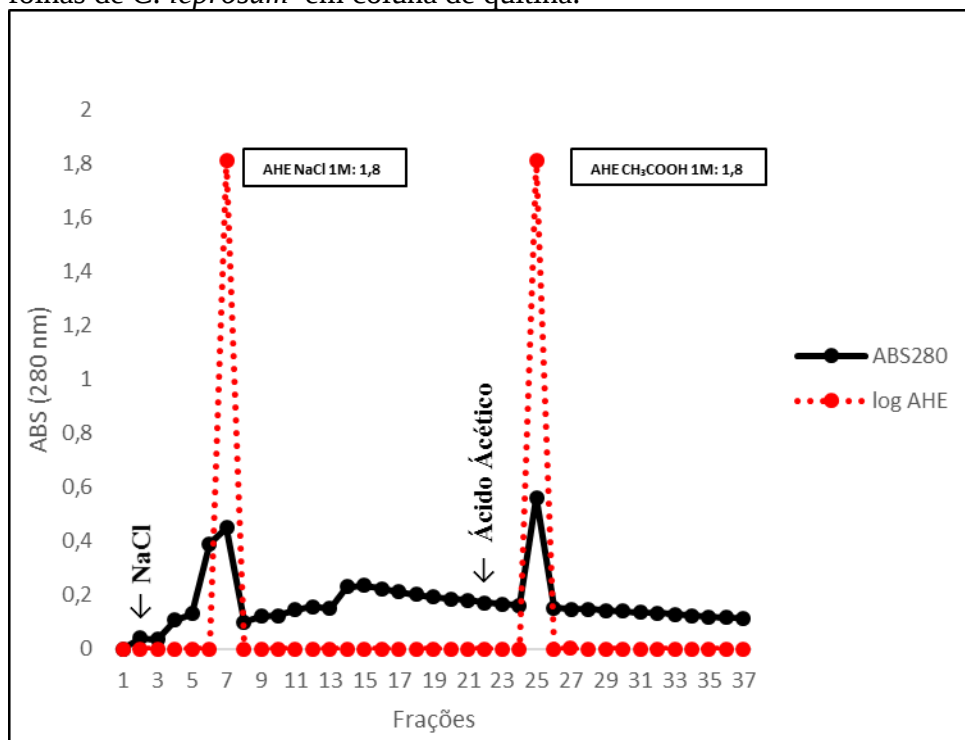
Cromatografias de F2D (80 mg) no suporte de exclusão molecular Sephadex G-75 não resultaram em uma separação de proteínas presentes na amostra por exclusão molecular. Além disso, não houve detecção de AH nas frações de não adsorvido coletadas. O Sephadex G-75 também pode funcionar como matriz de afinidade para lectinas ligantes de glicose e manose. No entanto, o uso de solução de glicose, após a saída do material não adsorvido não resultou em eluição de material adsorvido. Os resultados sugerem que a preparação não possui lectinas com afinidade ao suporte, o que respalda os resultados negativos de inibição com esse carboidrato, e que essa peneira molecular não é adequada para separação de proteínas presentes em F2D.

A matriz de quitina, que funciona como ligante por afinidade e, também, por troca iônica, demonstrou maior eficiência para possível isolamento de moléculas presentes em F1D e F2D. As cromatografias de F1D (80 mg em 1.468 µL) e F2D (80 mg em 1.589 µL) nessa matriz foram observados picos de material adsorvido e eluído. As frações cromatográficas

não-adsorvidas não apresentaram AH com eritrócitos glutarizados humanos, tipo AB; entretanto, os picos de material adsorvido apresentaram AH após diálise. Os dois picos adsorvidos em quitina obtidos de F1D (por eluição com NaCl 1 M e ácido acético 1 M) (gráfico 3) apresentaram AH (AH: 4^{-1}) e AHE de 1,8. O pico adsorvido em quitina obtido de F2D (por eluição com ácido acético 1 M) (gráfico 4) apresentou AH (AH: 64^{-1}) e AHE de 1,8. Não ocorreu inibição da AH dos picos adsorvidos com os carboidratos testados (descritos na metodologia). Os picos cromatográficos apresentaram especificidade para AH apenas com eritrócitos glutarizados humanos, tipo AB, não aglutinando eritrócitos tipo O ou de coelho. As amostras dialisadas e concentradas por liofilização foram submetidas a técnica de eletroforese; não foram detectadas bandas proteicas, possivelmente devido ao teor proteico muito baixo, após diálise.

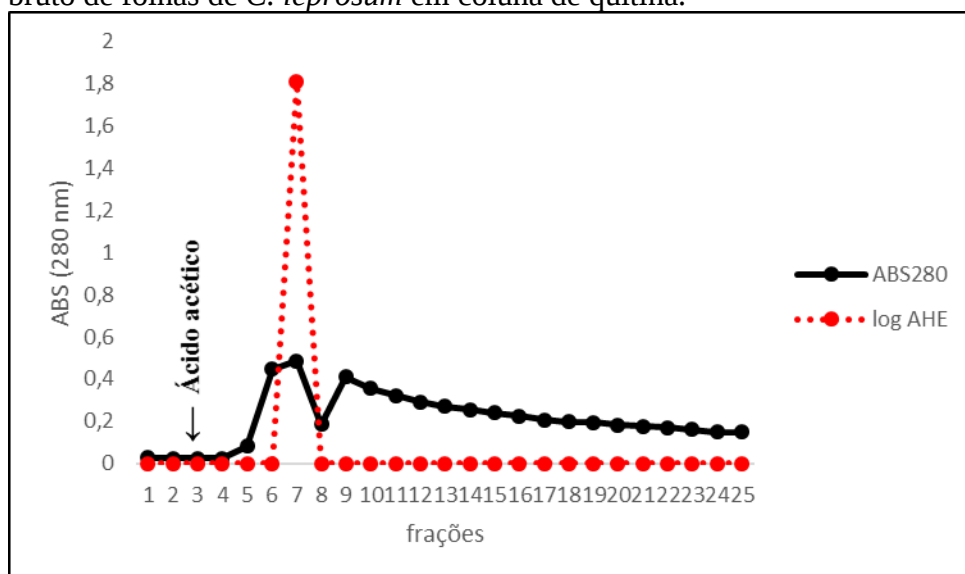
Os resultados sugerem que F1D e F2D possuem lectinas possivelmente ligantes a N-acetil-glicosamina, sem afinidade de ligação a glicose e galactose e com elevada afinidade de ligação a glicoproteínas que compõem o glicocálix dos eritrócitos tipo AB.

Gráfico 3 - Cromatograma da fração 30 % dialisada (F1D), obtida a partir do extrato bruto de folhas de *C. leprosum* em coluna de quitina.



Coluna de quitina (5 mL) ativada com ácido acético 1 M e equilibrada com NaCl 0,15 M com fluxo de 20 mL/h. Foi aplicado volume da amostra equivalente a 80 mg de proteína. Após coleta do não adsorvido em NaCl 0,15 M, NaCl 1 M e em seguida ácido acético 1 M foram utilizados como eluentes (início das eluições indicado por setas). Frações coletadas (2 mL/6 min) foram monitoradas por leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. ABS 280 nm: absorbância a 280 nm; log AHE: log do título de atividade hemaglutinante específica.

Gráfico 4 - Cromatograma da fração 30 - 60 % dialisada (F2D), obtida a partir do extrato bruto de folhas de *C. leprosum* em coluna de quitina.



Coluna de quitina (5 mL) ativada com ácido acético 1 M e equilibrada com NaCl 0,15 M com fluxo de 20 mL/h. Foi aplicado volume da amostra equivalente a 80 mg de proteína. Após coleta do não adsorvido em NaCl 0,15 M, NaCl 1 M e em seguida ácido acético 1 M foram

utilizados como eluentes (início das eluições indicado por setas). Frações coletadas (2 ML/6 min) foram monitoradas por leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. ABS 280 nm: absorbância a 280 nm; log AHE: log do título de atividade hemaglutinante específica.

Objetivando avaliar as propriedades biológicas das amostras, foram realizados ensaios antibacterianos utilizando EB, F1D, F2D e F3D contra cinco cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse médico. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Os ensaios para determinação de potencial ação antimicrobiana sobre o crescimento de bactérias revelaram que as preparações EB, F2D e F3D possuem CIM contra *S. aureus*, nas concentrações de 2,17mg/mL.; 2,9mg/mL.; 2,2mg/mL, respectivamente. Entretanto, sem apresentar atividade bactericida (tabela 2). Para as outras bactérias avaliadas, não houve detecção de atividade bacteriostática ou bactericida promovida pelas preparações.

Tabela 2 - Atividade antibacteriana de preparações obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*.

Espécie	EB		F1D		F2D		F3D	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (+) ATCC 25923	2,17	ND	ND	ND	2,9	ND	2,2	ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> (+) ATCC 19615	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Streptococcus mutans</i> (+) ATCC 25175	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> (+) ATCC 29212	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (-) ATCC 25922	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

EB: extrato bruto em NaCl 0,15 M; F1D: fração proteica (0 - 30 %) dialisada; F2D: fração proteica (30 - 60 %) dialisada; F3D: fração proteica (60 - 90 %) dialisada; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

A atividade antibacteriana das lectinas é atribuída à sua interação com glicanos encontrados na parede celular bacteriana (por exemplo, ácidos teicóico e teicurônico, peptidoglicano e lipopolissacarídeo). Além disso, as lectinas antibacterianas podem promover o vazamento de proteínas e a formação de poros na parede celular (COELHO et al, 2019). Desse modo, a ausência da atividade antibacteriana nas amostras de *C. leprosum* – exceto pelo efeito bacteriostático sobre *S. aureus* - pode ser associada a não interação de suas moléculas constituintes (entre elas possíveis lectinas) com as glicoproteínas presentes na parede celular desses microrganismos.

Já a atividade antifúngica das lectinas ocorre pela interação com quitina, α -manana e β -glucana presentes nas paredes celulares, o que pode levar à inibição do crescimento, ruptura da parede celular, absorção reduzida de nutrientes e interferência na germinação de esporos (SILVA et al, 2018). Análises quanto ao potencial antifúngico sobre os fitopatógenos selecionados para esse estudo não apresentaram efeito significativo promovido por nenhuma preparação. As preparações promoveram baixos percentuais de inibição do crescimento fúngico. Nos ensaios com *Fusarium falciforme*, os percentuais de inibição promovidos por EB, F1D, F2D e F3D foram 4,6 %, 1,9 %, 2,8 % e 0,7 %, respectivamente; nos ensaios com *Macrophomina phaseolina*, os percentuais de inibição obtidos com essas amostras foram 2,9 %, 2,2 %, 0,7 % e 0,2 %, respectivamente. Os dados de inibição, embora não relevantes, revelaram que biomoléculas presentes nas preparações, especialmente no EB, causaram alguma interferência no crescimento dos fungos. As frações proteicas demonstraram interação com a matriz de quitina nos processos cromatográficos, o que pode vir a ser um respaldo para futuras avaliações sobre outros fungos.

Tabela 3 – Percentual de inibição do crescimento fúngico por preparações obtidas a partir de folhas de *C. leprosum*.

Espécie	EB (%)	F1D (%)	F2D (%)	F3D (%)
<i>Fusarium falciforme</i> CML 3946	4,6	1,9	2,8	0,7
<i>Macrophomina phaseolina</i> CMM 1531	2,9	2,2	0,7	0,2
Controle negativo	0	0	0	0

% - Porcentagem de inibição do crescimento fúngico. EB: extrato bruto em NaCl 0,15 M; F1D: fração proteica (0 - 30 %) dialisada; F2D: fração proteica (30 - 60 %) dialisada; F3D: fração proteica (60 - 90 %) dialisada. Controle negativo: NaCl 0,15 M.

Apesar das folhas de *C. leprosum* possuírem em sua microbiota natural endofíticos e fitopatógenos do gênero *Fusarium*, como *F. oxysporum* e *F. solani* (SANTOS et al, 2012), o EB apresentou a maior porcentagem de inibição (4,9 %) sobre *F. falciforme*, superior as avaliadas contra *Macrophomina phaseolina*, o que pode indicar a presença de mecanismo de defesa contra esses microrganismos. Além disso, esse foi o maior percentual de inibição apresentado entre as amostras; como o EB é a preparação mais rica em diversidade molecular é provável que outros metabólitos não proteicos tenham envolvimento com o efeito.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação da elevada AHE das preparações ricas em proteínas, em especial de F1D, caracteriza as folhas de *C. leprosum* como um recurso viável para purificação de lectina ainda não descrita em literatura. As amostras não tiveram a AH inibida com nenhum dos açúcares simples ensaiados; por isso, testes de inibição com glicoconjugados devem ser considerados para um trabalho futuro. A quitina como suporte cromatográfico foi eficiente para adsorção de moléculas de F1D e F2D, com atividade lectínica após eluição; no entanto, a otimização do protocolo para a revelação proteica por eletroforese é necessária. As preparações (exceto F1D) revelaram ação bacteriostática sobre *S. aureus*, uma importante bactéria patogênica gram-positiva; porém, não foram eficientes em inibir *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium falciforme*, fungos fitopatógenos de grande importância para a agricultura.

REFERÊNCIAS

- AL-HATMI, A.M.S.; MEIS, J.F.; DE HOOG, G.S.S. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. **PLoS Pathog.**; v. 12, n.4, 2016.
- ALVES, R. R.; SOARES, T.; BENTO, E. F.; ROLDAN-FILHO, R. S.; SOUZA, B. S.; LIMA, M. K.; PAIVA, P. M. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2019.
- BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, F.K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African *Combretaceae* used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 335-338, 1999.
- BISWAS, C. A.; VANLALVENI, R.; LALFAKZUALA, S. N.; LALTHAZUALA R.; MIKANIA M. leaf extract mediated biogenic synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: Characterization and its antimicrobial activity study, **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 1366-1373, 2021.
- BOURNE, Y.; AYOUBA, A.; ROUGÉ, P.; CAMBILLAU, C. Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 13, p. 9429-9435, 1994.
- BREYTENBACH, J. C.; MALAN, S.F. Pharmacochemical properties of *Combretum zeyheri*. **S. Afr. J. Sci.**, v. 85, p. 372-374, 1989.
- CAPOZZI, C.; MAURICI, M.; PANÀ, A. Antimicrobico resistenza: è crisi globale, “un lento tsunami” [Antimicrobial resistance: it is a global crisis, "a slow tsunami"]. **Ig Sanita Pubbl.** v. 75, n.6, p. 429-450, 2019.
- CARRILLO, CELIA.; CORDOBA-DIAZ, DDAMIÁN.; CORDOBA-DIAZ, M.; ANUEL, M.; GIRBÉS, TOMÁSTT.T.; JIMÉNEZ, PILAR. Effects of temperature, pH and sugar binding on the structures of lectins Ebulin f and SELfd. **Food Chemistry**, 2016.
- CARVALHO, A. S.; DA SILVA, M. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; MALAFAIA, C. B.; DA SILVA, T. D.; VAZ, A. F. M.; DA SILVA, A. G.; ARRUDA, I. R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **Int J Biol Macromol**, v. 75, p. 402-408, 2015.
- CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chem.**, v. 126, pp. 1025-1032, 2011.
- CHOWDHURY, R.; ISLAM, N. A hydroxylated mansumbinen-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, ed 4, pp. 443–445, 2004
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009.

- COELHO, L.C.B.B.; SILVA, P.M.S.; OLIVEIRA, W.F.; MOURA, M.C.; PONTUAL, E.V.; GOMES, F.S.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins as antimicrobial agents **J. Appl. Microbiol.** 2018.
- COSTA, R. M. P. B.; , VAZ, A. F. M.;, OLIVA, M. L. V.; , COELHO, L. C. B. B.;, CORREIA, M. T. S.; , & CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 526–533, 2010.
- COSTA, ROMERO R.M.P.B.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; SILVA, M.C.C.; DE PAULA, R. A.; MELO, M.S; OLIVA, M.L.V.; PORTO, A.L.F. Can γ -radiation modulate hemagglutinating and anticoagulant activities of PpyLL, a lectin from *Phthirusa pyrifolia*?. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104(), p. 125–136, 2017.
- DA SILVA, J. D. F.; DA SILVA, S. P.; DA SILVA, P. M.; et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 291-297, 2019.
- DA SILVA, R.A.; LIBERIO, S.A.; DO AMARAL, F.M.M.; DO NASCIMENTO, F.R.F.; TORRES, L.M.B., NETO, V.M.; GUERRA R.N.M. Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* l. Flowers in comparison to bark and leaves extracts. **J. Biosci. Med.**; 4:87–89, 2016.
- DE AQUINO, D.; DA SILVA, L. B. R. GOMES. F. V.; ARAÚJO, C. E., Level of knowledge about risks and benefits of the medicinal plants use and fitotherapics at community of Recife – PE. **Journal of nursing**: 1, 2007.
- DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, É. J.; et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 4th ed. Utrecht/Reus: Westerdijk Institute/Universitat Rovira i Virgili; 2019.
- EHRlich, P. Experimentelle untersuchungen über immunität. I. Ueber ricin. Dtsch. **Med. Wochenschr**, v. 17, n. 32, p. 976–979, 1891.
- FACUNDO, V. A.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, ed. 2, pp. 411-415, 1993
- FACUNDO, V. A.; RIOS, K. A.; MEDEIROS, C. M.; MILITÃO, J. S. L. T.; MIRANDA, A. L. P.; EPIFANIO, R. A.; CARVALHO, M. P.; ANDRADE, A. T.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6b, pp. 1309-1312, 2005.
- FERREIRA, G.R.S.; BRITO, J.S.; PROCÓPIO, T.F.; et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microb Pathog.** v. 124, p. 152-162, 2018.
- FYHRQUIST, P. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loebl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae). 183f. Dissertação - **Faculty of Biosciences**, Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2. Ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2002.

- GUPTA, V.; DATTA, P.; Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. **Indian J Med Res.** V.149, n. 2, p. 97-106, 2019.
- IORDACHE, F.; , IONITA, M.; , MITREA, L.I.; , FAFANEATA, C. and Pop, A. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Curr Pharm Biotechnol** 16, 152– 161, 2015.
- ISLAM, M.D.; SHAHIDUL, et al. E COLAB. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 493, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, pp. 680-685, 1970.
- LAM, S. K.; NG, T.B.; Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses. **Nat. Med.** 10, S122–S129, 2004.
- LIMA, É. R.; MOREIRA L. S.; FACUNDO, V. A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, C. B. G. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. **Saber Científico**, v. 3, ed. 1, pp. 53-69, 2011.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 2002.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, pp. 265-275, 1951.
- LOZANO, C; TORRES, C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 35 Suppl 1, p. 2–8, 2017.
- MAHLO, S. M.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. **Crop Protection**, v. 29, n. 12, p. 1529–1533, 1 Dez 2010.
- MARQUEZ, N. et al. e colab. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol**, v. 93, p. 207- 12, 2004.
- MCGAW, L.; RABE, T.; SPARG, S.; JAGER, A.; ELOFF, J.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n.1, p. 45–50, 2001.
- MEENA, B.R.; MEENA, S.; CHITTORA, D.; SHARMA, K. Antifungal efficacy of *Thevetia peruviana* leaf extract against *Alternaria solani* and characterization of novel inhibitory compounds by Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis. **Biochem Biophys Rep.** v. 25, 2021.
- MILLER, S.I. Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. **mBio.** v. 7, n. 5, 2016.
- MOGASHOA, M.; MASOKO, P.; ELOFF, J. Different *Combretum molle* (Combretaceae) leaf extracts contain several different antifungal and antibacterial compounds. **South African Journal of Botany**, 2019.

- MOGASHOA, M.; MASOKO, P.; ELOFF, J. Different *Combretum molle* (Combretaceae) leaf extracts contain several different antifungal and antibacterial compounds. **South African Journal of Botany**, v. 2019126, 2019.
- MONTEIRO, J.T; LEPENIES, B. Myeloid C-type lectin receptors in viral recognition and antiviral immunity. **Viruses** 9, 59, 2017.
- NASCIMENTO, A. S. F. Expressão, purificação e caracterização estrutural da BDH-2 recombinante, uma espermaesina presente no plasma seminal de bode. (*Capra hircus*). Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada. 2010. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - **Universidade Federal do ceará, Fortaleza**, p. 85, 2010.
- NASCIMENTO, K.S.; CUNHA, A.I.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; AZEVEDO, A.M.; Aires-Barros, M.R. An overview of lectins purification strategies. **J. Mol. Recognit.** 25, 527–541, 2012.
- NUNES, P. H. M.; CAVALCANTI, P. M. S.; GALVÃO, S. M. P.; MARTINS, M. C. C.; Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 1, p 58-62, 2009.
- NUNES, P.H.M., MARTINS, M.C.C., OLIVEIRA, R.C.M., CHAVES, M.H., SOUZA, E.A., LEITE, J.R.S.A., VÉRAS, L.M. & ALMEIDA, F.R.C. Gastric Antiulcerogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **BioMed Research International**, p. 1-14, 2014.
- OLIVEIRA, R.; AIRES, T. Resistência aos Antibacterianos. **Gazeta Médica**, Carnaxide, v. 3, n. 2, p. 14-21, 2016.
- OLIVEIRA, T. N. S.; SILVA-FILHO, C. M. S.; MALVEIRA, E. A.; et al. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from *Lippia gracilis* Schauer against phytopathogenic fungi. **J Appl Microbiol.**130(4): 1117-1129, 2021.
- PÁDUA, P.F.; , DIHL, R.R.; , LEHMANN, M.; ABREU, B.R.;, RICHER, M.F.;. & ANDRADE, H.H. Genotoxic, antigenotoxic and phytochemical assessment of *Terminalia actinophylla* ethanolic extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 521-527, 2013.
- PANDEY et al., Morphological and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolated from three legume crops and evaluation of mungbean genotypes for resistance to dry root rot - *ScienceDirect*. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219419303084>>. Acesso em: 7 out 2021.
- PEHRSSON, E. C.; TSUKAYAMA, P.; PATEL, S.; MEJIA-BAUTISTA, M.; SOSA-SOTO, G.; NAVARRETE, K. M., et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. **Nature** v.533, p. 212–216, 2016.
- PEREIRA, C. S. DETECÇÃO DE ATIVIDADE LECTÍNICA, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE FRAÇÕES PROTEICAS DO EXTRATO AQUOSO DE *Combretum leprosum* MART. Monografia Tese (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Semiárido – UFERSA, 2013a.
- PEREIRA, R., D. Purificação, caracterização e atividades biológicas de proteína de folhas de *Indigofera suffruticosa*. Tese (Doutorado em bioquímica e fisiologia) – **Centro de ciências biológicas, universidade federal de Pernambuco**, p. 17, 2013b.

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

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F., as múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire; Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v.24, p.135-156, 2002.

PROCÓPIO, T. F.; ; MOURA, M. C.;; ALURQUERQUE, L. P.;; GOMES, F. S.;; SANTOASANTOS, N. D. L.; ; COELHO, L. C. B. B.;; PONTUAL, E. V.;; PAIVA, P. M. G. and NAPOLEÃO, T. H. Antibacterial Lectins: Action Mechanisms, Defensive Roles and Biotechnological Potential. In: Erika Collins. (Org.). Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities. 1ed.New York: **Nova Science Publishers**, Inc., p. 69-89, 2017.

QIAN, X.; SUN, W.; GU, J.; et al. Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting. **Bioresour Technol**. v. 220, p. 425-432, 2016.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M. M.; TICCHI, A. J.; DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O.; , de LA CANAL, L.; and GOMES, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Curr Microbiol** 69(1), 88-95, 2014.

RINI, M. J. Lectin structure. Annual Review of Biophysics and **Biomolecular Structure**, v. 24, p. 551-557, 1995.

RYU, J.-H.; LEE, S.-J.; KIM, M.-J.; SHIN, J.-H.; KANG, S.-K.; CHO, K.-M.; SUNG, N.-J. Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. **J. Korean Soc. Food Sci. Nutr**, 40, 509–516, 2011.

SÁ, R.; GOMES, F.; NAPOLEÃO, T.; SANTOS, N.; MELO, C.; GUSMÃO, N.; COELHO, L.; PAIVA, P.; BIEBER, L. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Sci Technol**, v. 43, p. 85-95, 2009.

SAMAD, N. B.; , DEBNATH, T.; , YEe, M.; , HASNAT, M. A.; , & LIM, B. O. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 4,4(10), p. 807–815, 2014.

SANTOS, S. N.; FERRARIS, F. K.; SOUZA, A. O.; et al. Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potential anticancer and antifungal activity. **Symbiosis**, v. 58, n. 1, p. 109 – 117, 2012.

SANTURIO, M.J.; SANTURIO, D.F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella de origem avícola. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, 4(14), 3198–3208, 1990.

SILVA, P.M.; MOURA, M.C.; GOMES, F.S.; TRENTIN, D.S.; OLIVEIRA, A.P.S.; MELLO, G.S.V.; MELLO, M.G.R.; PITTA, M.J.B.M. REGO, COELHO, L.C.B.B.; MACEDO, A.J.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei* **International Journal of Biological Macromolecules**, v.108, p. 391-400, 2018.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KENNEDY, J. F. Purification and characterization of a mitogenic lectin from *Penicillium duclauxii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 116, 426–433, 2018.

SIZAR, O.; UNAKAL, C.G. Gram Positive Bacteria. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls, 2021.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, 696-702, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, A. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, p. 417-419, 2008.

STACE, C. A. Combretaceae . Pp. 110-111, fig. 55, pl 15. In: N. Smith; S.A. Mori; A. Henderson; D.W. Stevenson & S.V. Heald (eds.). Flowering Plants of the Neotropics. United Kingdom, **The New York Botanical Garden. Princetion University Press**, Pp. 110-2004111, 2004.

STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. **MD Thesis. University of Dorpat, Dorpat, Estonia**, 1888.

TAJ-ALDEEN, S.J. Reduced Multidrug Susceptibility Profile Is a Common Feature of Opportunistic *Fusarium* Species: *Fusarium* Multi-Drug Resistant Pattern. **J Fungi (Basel)**. V. 3, n. 2, p. 18, 2017.

TAKAHASHI, J. P.; MELHEM, M. S.C. Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica. **Bol Inst Adolfo Lutz**. v.1, p40-41, 2014.

TAN, F.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X.; & WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research**, V.115, p. 475-481, 2002.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SOUZA, J.B.; HAVT, A.; PINTO, V.P.; GONÇALVES, R.B.; FARIAS, W.R.; SAKE-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA,

- B.S. *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 1001-1006, 2007.
- TORRES, M.É.L.M.; BRANDÃO-COSTA, R.M.P.; SANTOS, J. V. O.; CAVALCANTI, I. M. F.; SILVA, M.M.; NASCIMENTO, T.P.; NASCIMENTO, C.O.; PORTO, A.L.F. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 169–176, 2019.
- UPADHYAY, S. K. K.; SAURABH, S.; RAI, P.; SINGH, R.; CHANDRASHEKAR, K.; VERMA, P.C.; SINGH, P. K.; TULI, R. SUMO. Fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties. **J Biotechnol**, v. 146, p. 1–8, 2010.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological role. **Critical Review in Plant Sciences**. v.17, p. 575-692, 1998.
- WALDEN, C.J.H.; WADDELL, L.A. The Non-bacillar Nature of Abrus-Poison: with Observations on its Chemical and Physiological Properties. **Bengal Secretariat Press**, 1884.
- WANG, J. H.; KONG, J. W.; LI, W. et al., A β -galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV-1 activity, *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 142, no. 1-2, pp. 111–117, 2006.
- WANG, J.H.; KONG, J. W.; LI, W.; et al., A β -galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV-1 activity, *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 142, no. 1-2, pp. 111–117, 2006.
- WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R.; ANDERSON, T. R. Effect of Diseases on Soybean Yields in the United States and Ontario (1999 to 2002). **Plant Health Progress**, v. 4, n. 1, p. 24, 1 Jan 2003.
- ZHANG, A.N.; GASTON, J.M.; DAI, C.L.; et al. An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. **Nat Commun**. v. 12, n.1, p. 4765, 2021.
- ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Curr. Biol.** 26(1), R14-R19, 2016.
- ZHAO, B.; HE, D.; WANG, L. Advances in *Fusarium* drug resistance research - **J Glob Antimicrob Resist**. v. 24, p. 215-219, 2021.