**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**
**CENTRO BIOCIÊNCIAS**
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

# CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) POR ELETROQUÍMICA E IMUNOGENICIDADE

**RECIFE**
**2021**

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

# CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) POR ELETROQUÍMICA E IMUNOGENICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

**RECIFE**

**2021**

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Oliveira, Benny Ferreira de
Caracterização da lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL) por eletroquímica e imunogenicidade / Benny Ferreira de Oliveira - 2021.
102 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. *Moringa oleifera* 2. Lectina 3. Atividade antimicrobiana
I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (Orientadora) II.Título

572.2 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2021-224

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

# CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) POR ELETROQUÍMICA E IMUNOGENICIDADE

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof[a].Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof[a]. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Raphael Carlos Ferrer de Santana
Centro Universitário Uninassau

Data: 28/05/2021

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que esteve comigo em todos os momentos e às pessoas essenciais que Ele colocou em meu caminho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria e mesmo nos momentos difíceis não perdi a fé.

À minha avó Josefa (*in memorian*) pelos cuidados a mim apresentados na infância, por seus preciosos ensinamentos como a valorização da educação e da fé em Deus.

Às pessoas fundamentais, Erleide (*in memorian*) por compartilhar comigo a educação da minha filha com amor e dedicação e que infelizmente nos deixou neste período tão difícil, nunca te esqueceremos, também agradeço à toda sua família pelo apoio.

Agradeço a minha filha Ana Beatriz pelo companheirismo e pela troca, ensinamos e aprendemos uma com a outra.

À minha orientadora professora Dra. Luana Cassandra, por tudo, todo conhecimento que contribuiram bastante no meu crescimento ciêntifico e como ser humano, pelos conselhos, pela paciência, muito obrigada professora!

Ao professor Dr. Thiago Napoleão e a professora Patricia Paiva, por me receberem no Laboratório de Bioquímica de Proteína, BIOPROT, e por fornecerem todo apoio necessário para minha pesquisa, com simpatia e profissionalismo.

Aos meus pais José Nilo e Glória Maria por todo carinho, apoio, por acreditarem e torcerem por mim, eu amo muito vocês.

À Profa. Dra. Kátia Cristina e Profa. Dra. Sandra Rodrigues do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por todo apoio, disponibilidade, confiança, fundamentais para realização desta pesquisa.

À Profa. Dra. Rejane Pereira e Dra. Maria Daniela pela parceria no trabalho, por me receber no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia (UFPE), o qual fiz monitoria durante a graduação e que tenho carinho por todos os professores em especial a Prof. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, do Laboratório de Fitopatogênicos no qual fui estagiária, também a todos os colegas Fabiola Gomes, Susane Chiang, Emanule Reis, Elaisa Rocha e Marcela Alves.

Aos meus queridos amigos de graduação, Raphael Ferrer, Andrea Nunes, Jaqueline Xavier, Geraldo Espindola e Quezia Leila, pelos bons momentos que passamos.

Ao Técnico de Laboratório Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva, que me auxiliou desde o começo do trabalho, obrigado por todo apoio e parceria.

A todos do laboratório BIOPROT, pelas trocas de conhecimento e colaborações.

À Dra. Adriana Ferreira Cruz do Núcleo Central de Pesquisa Experimental-UFPE, por todo apoio.

Enfim agradeço muitíssimo à instituição Universidade Federal de Pernambuco UFPE, por toda minha formação.

Agradeço ao Fundo de Amparo e Apoio à Pesquisa FACEPE, pelo apoio financeiro que permitiu a viabilização do meu projeto.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”.

***Eleanor Roosevelt***

**RESUMO**

A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) foi purificada em quantidades de miligramas por cromatografia de afinidade através do gel de guar, preparado por uma metodologia simples. As características da cMoL foram confirmadas por teste de estabilidade da lectina frente a variações de potencial de hidrogênio e na temperatura, usando uma sonda fluorescente (bis-ANS) [(bis(8-anilinonaftaleno-1-sulfonato)]. A lectina foi avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias, também foi inoculada em coelhos para desenvolvimento de um anticorpo policlonal. O anticorpo foi testado por imunodifusão quanto à capacidade de interagir com preparações da semente: extrato, a fração precipitada e cMoL, além de outras lectinas WSMoL e ConA. Também foi aplicado em um imunossensor, utilizando a Metal-Organic Frameworks, como suporte eletroquímico para imobilizar IgG anti-cMoL/cMoL, essa interação foi avaliada na presença do inibidor galactose. A cMoL também foi caracterizada por potenciometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, foi aplicada como biossensor para o controle residual do corante índigo carmim. Por fim, foi avaliada a atividade antimicrobiana de cMoL contra isolados clínicos *Cryptococcus neoformans*. A lectina dessorvida por galactose com atividade de hemaglutinação específica de 1.280 mostrou eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com subunidades principais de pesos moleculares de 26,5 e 19 KDa e ponto isoelétrico 9,8. Foram observados picos de fluorescência relacionados com a exposição de grupos hidrofóbicos de cMoL, porém essas alterações estruturais não inibiram a atividade hemaglutinante de cMoL. A lectina inibiu o crescimento de *C. neoformans e Candida tropicalis*, com 64 e 62,5 microgramas/mililitros de lectina, respectivamente. A atividade fungicida foi observada em *C. albicans*, *C. tropicalis* (4 miligramas/mililitros) e *C. neoformans* (256 microgramas/mililitros). O anticorpo foi capaz de interagir com as preparações e com WSMoL; nenhuma reação foi observada com ConA. Esses resultados foram revelados após a terceira inoculação, no qual foi observada uma linha de precipitação através de imunodifusão. As variações no potencial do imunossensor indicaram diferentes etapas de produção do IgG anti-cMoL. Quando inibida com o carboidrato, cMoL não interagiu com o anticorpo, podendo indicar que a ligação ocorre pelo domínio de reconhecimento ao carboidrato. A cMoL apresentou variações de potencial elétrico que indicaram suas cargas elétricas características, com um aumento no potencial após adição da galactose no meio eletrolítico. A MEV revelou as características estruturais de cada componente da montagem do eletrodo. O biossensor utilizando cMoL como elemento para o controle residual do corante, mostrou variações de corrente elétrica nas amostras do corante antes e após o tratamento eletroquímico. A cMoL inibiu o crescimento dos isolados *C. neoformans*, CMI

64-128 microgramas/mililitros. Em conclusão, a cMoL purificada por meio de um protocolo de afinidade com gel de guar simples, mostrou propriedades bacteriostáticas, fungistáticas e fungicidas. A lectina foi imunogênica, IgG anti-cMoL aplicado ao imunosenssor foi eficaz na avaliação das interações biológicas e indicaram que as ligações ocorreram através do domínio de reconhecimento ao carboidrato. A lectina foi caracterizada por métodos eletroquímicos e mostrou eficácia como biossensor na identificação residual do corante índigo carmim.

**Palavras chave:** acácia-branca; lectinas de plantas; anticorpos; métodos eletroquímicos; biossensores; atividade antimicrobiana.

**ABSTRACT**

The coagulant lectin from *M. oleifera* seeds (cMoL) was purified in milligram amounts by affinity chromatography through the guar gel, prepared by a simple methodology. The characteristics of cMoL were confirmed by testing the stability of the lectin against changes in hydrogen potential and temperature, using a fluorescent probe (bis-ANS) [(bis(8-anilinonaphthalene-1-sulfonate)]. Antimicrobial activity against fungi and bacteria, was also inoculated in rabbits to develop a polyclonal antibody. The antibody was tested by immunodiffusion for its ability to interact with seed preparations: extract, the precipitated fraction and cMoL, besides other lectins WSMoL and ConA. It was also applied in an immunosensor, using Metal-Organic Frameworks as electrochemical support to immobilize IgG anti-cMoL/cMoL, this interaction was evaluated in the presence of the galactose inhibitor. cMoL was also characterized by potentiometry and scanning electron microscopy (SEM), in addition, it was applied as a biosensor for the residual control of the indigo carmine dye. of the antimicrobial activity of cMoL against clinical isolates *Cryptococcus neoformans.* The galactose-desorbed lectin with specific hemagglutination activity of 1,280 showed two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with major subunits with molecular weights of 26.5 and 19 KDa and isoelectric point 9.8. Fluorescence peaks related to the exposure of hydrophobic groups of cMoL were observed, but these structural changes did not inhibit the hemagglutinating activity of cMoL. The lectin inhibited the growth of *C. neoformans* and *Candida tropicalis*, with 64 and 62.5 micrograms/milliliters of lectin, respectively. The fungicidal activity was observed in *C. albicans*, *C. tropicalis* (4 milligrams/milliliters) and *C. neoformans* (256 micrograms/milliliters). The antibody was able to interact with the preparations and with WSMoL; no reaction was observed with ConA. These results were revealed after the third inoculation, in which a precipitation line through immunodiffusion was observed. Variations in immunosensor potential indicated different stages of production of anti-cMoL IgG. When inhibited with carbohydrate, cMoL did not interact with the antibody, which may indicate that binding occurs through the carbohydrate recognition domain. cMoL showed variations in electrical potential that indicated its characteristic electrical charges, with an increase in potential after addition of galactose in the electrolytic medium. The SEM revealed the structural characteristics of each component of the electrode assembly. The biosensor using cMoL as an element for the residual control of the dye, showed variations in electrical current in the dye samples before and after the electrochemical treatment. cMoL inhibited the growth of *C. neoformans* isolates, CMI 64-128 micrograms/milliliters. In conclusion, cMoL purified by means of a simple guar gel affinity protocol showed bacteriostatic, fungistatic and fungicidal

properties. The lectin was immunogenic, IgG anti-cMoL applied to the immunosensor was effective in evaluating biological interactions and indicated that the links occurred through the carbohydrate recognition domain. The lectin was characterized by electrochemical methods and showed efficacy as a biosensor in the residual identification of the indigo carmine dye.

**Keywords:** white wattle; plant lectins; antibodies; electrochemical methods; biosensors; antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS


FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1- Representação esquemática de aglutinação de eritrócitos por lectinas e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos 21

Figura 2 - Esquema representativo da classificação estrutural de lectinas 23

Figura 3 - Árvore *Moringa oleifera* e as diferentes partes da planta 25

Figura 4 - Arquiteturas moleculares de poliedros metal orgânicos discretos (MOPs) e estruturas tridimensionais (MOFs). 27

Figura 5 - Esquema representando a célula elétroquímica, eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e solução eletrolítica 28

Figura 6 - Estrutura geral de um anticorpo. Imunoglobulinas IgM, IgG, IgA, IgD e IgE 31

ARTIGO 1: PURIFICAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE *Moringa oleifera* (cMoL) POR GEL DE GUAR OBTIDO POR UM MÉTODO SIMPLES, AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOGÊNICA E APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSOR.

Figura 1 - Eletrodo de trabalho modificado, Pt/MOF/cMoL 43

Figura 2 - Célula eletroquímica, contendo o eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho modificado, pt/mof/cMoL, ambos ligados a um medidor potenciométrico 44

Figura 3 - Purificação da lectina coagulante *Moringa oleifera* (cMoL) isolada utilizando o gel de guar preparado por Appukutan et al (1977). 57

Figura 4 - Análise das mudanças conformacionais em cmol após aquecimento e incubação em diferentes valores de pH 58

Figura 5 - Imunodifusão e potencial eletroquímico 59

ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE CORANTES PRESENTES EM EFLUENTES DE INDÚSTRIA TÊXTIL DEGRADADOS POR UMA NOVA METODOLOGIA, UMA ABORDAGEM ELETROQUÍMICA

| | | |
|---|---|---|
| Figura 1 - | Sistema eletroquímico mostrando mecanismo de eletrocoagulação. | 68 |
| Figura 2 - | Potencial eletroquímico de eletrodos | 72 |
| Figura 3 - | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelando estruturas: cristais da MOF de $[Cu_3(BTC)2.(H_2O)3]n$ | 73 |
| Figura 4 - | Solução de corante exibindo o processo de coagulação após o tratamento eletroquímico | 74 |
| Figure 5 - | Voltamograma cíclico com amostras antes do tratamento, após o tratamento na pilha de alumínio e também, após o tratamento por eletrólise | 74 |
| ARTIGO 3 - | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTE DE *Moringa oleifera* (cMoL) CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* | |
| Figura 1 - | Representação esquemática de cMoL interagindo com o patógeno *Cryptococcus neoformans*, cMoL inibida pela galactose se ligou à cepa patogênica | 84 |

## LISTA DE TABELAS


| | | |
|---|---|---|
| ARTIGO 1- | PURIFICAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE *Moringa oleifera* (cMoL) POR GEL DE GUAR OBTIDO POR UM MÉTODO SIMPLES, AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOGÊNICA E APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSOR | |
| | Resumo da purificação cMoL | |
| Tabela 1 - | Avaliação da atividade antimicrobiana do cMoL contra bactérias, | 56 |
| Tabela 2 - | fungos filamentosos e leveduras | 56 |
| ARTIGO 2 - | CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE CORANTES PRESENTES EM EFLUENTES DE INDÚSTRIA TÊXTIL DEGRADADOS POR UMA NOVA METODOLOGIA, UMA ABORDAGEM ELETROQUÍMICA | |
| Tabela 1 - | Medição do pH das amostras | 70 |
| ARTIGO 3 - | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTE DE *Moringa oleifera* (cMoL) CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* | |
| | Perfil de inibição de CIM 50 exibindo a concentração mínima inibitória (CMI) e concentraçãofungicida mínima (CMF) de isolados de *C. neoformans* frente a lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) | |
| Tabela 1- | Perfil de inibição de CIM 50 exibindo a concentra inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de isolados de *C. neoformans* frente a lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL). | 84 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **AH** | Atividade Hemaglutinante |
| **AHE** | Atividade Hemaglutinante Específica |
| **CMI** | Concentração Mínima Inibitória |
| **CMF** | Concentração Mínima Fungicida |
| **CMB** | Concentração Mínima Bactericida |
| **cMoL** | Lectina Coagulante de *Moringa oleifera* |
| **ConA** | Concavalina A |
| **DRC** | Domínio de reconhecimento ao carboidrato |
| **EB** | Extrato Bruto |
| **Ig** | Imunoglobulina |
| **M** | Concentração Molar |
| **MOFs** | Metal organic frameworks |
| **MOPs** | Poliedros metal orgânicos |
| **WSMoL** | Lectina de *Moringa oleifera* solúvel em água |
| **SDS** | Sulfato Sódico De Dodecila |
| **SDS-PAGE** | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo Sulfato Sódico de Dodecila |

**SUMÁRIO**


**1 INTRODUÇÃO.....18**

**1.1 OBJETIVOS.....20**

1.1.1 Objetivo geral.....20

1.1.2 Objetivos específicos.....20

**2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....21**

2.1 LECTINAS.....21

2.1.1 Aspectos gerais.....21

2.1.2 Classificação e estrutura das lectinas.....22

2.1.3 Aplicações biológicas das lectinas.....23

2.2 *Moringa oleifera*.....24

2.2.1 Caracteristicas gerais.....24

2.2.2 Lectinas das sementes de *M. oleifera*.....25

2.3 METAL-ORGANIC FRAMEWORKS MOFS.....26

2.4 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS.....27

2.4.1 Célula Eletroquímica.....27

2.4.2 Potenciometria.....29

2.4.3 Voltametria cíclica.....29

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura.....30

2.5 BIOSSENSORES.....30

2.6 ANTICORPOS.....31

2.6.1 Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra lectinas de plantas.....32

**3 ARTIGO 1 -PROTOCOLO SIMPLES PARA PURIFICAR A (CMOL) LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA* COM ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOGÊNICA 34**

**4 ARTIGO 2- CARACTERIZAÇÃO DA (CMOL) LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA* E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE CORANTES PRESENTES EM EFLUENTES DE INDÚSTRIA TÊXTIL DEGRADADOS POR UMA NOVA METODOLOGIA, UMA ABORDAGEM ELETROQUÍMICA 61**

**5 ARTIGO 3-ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA (CMOL) LECTINA COAGULANTE DE SEMENTE DE *MORINGA OLEIFERA* CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* 79**

**6 CONCLUSÕES.....88**

**REFERÊNCIAS.....88**

**ANEXO – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*……..96**

## 1 INTRODUÇÃO

*Moringa oleifera* é conhecida como "árvore milagrosa" devido suas múltiplas aplicações e capacidade de adaptação (ZAINAB et al., 2020), é uma espécie vegetal adaptada á condições climáticas diversas, umidade elevada ou estiagens e também solos com deficiência nutricional, a planta é rica em nutrientes e biomassa (SULTANA et al., 2020; NĚMEC et al., 2020), o extrato de suas sementes possuem ação antimicrobiana e antioxidante (HOWYZEH et al., 2018) e os fitoquímicos mostraram efeito contra o diabetes, é bastante utilizada no tratamento de água, devido á lectinas e compostos coagulantes presente em suas sementes (SANTOS et al., 2009; NTIBREY et al., 2020; ADESINA et al., 2021), as lectinas e os compostos da sementes de *M. oleifera* também têm demonstrado diversas atividades biológicas (ASADUZZAMAN et al., 2018; SANTOS et al 2020; MEDEIROS et al., 2020; XIONG et al., 2021).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, desde microrganismos, vertebrados, invertebrados e plantas (VASTA et al 2021), estão inseridas em um grupo diverso de proteínas ou glicoproteínas, que não obtiveram sua origem a partir de um sistema imunológico, possuem a habilidade de formar ligações específicas e com elevada afinidade aos carboidratos, ligando-se as estes através do Domínio de Reconhecimento aos Carboidratos (DCR) (COELHO et al., 2017). Sua capacidade de formar ligações específicas reversíveis a monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, glicoconjugados celulares além de açúcares livres, as tornam relevantes e únicas no reconhecimento de moléculas ou de alterações no padrão de glicosilação da membrana celular (SILVA et al., 2016; COELHO et al., 2017; GAUTAM et al., 2020), são capazes de reconhecer especificamente os açúcares expostos na membrana celular ou na composição da parede celular de microrganismos, e formar mecanismos de aglutinação (SILVA et al., 2018). Atualmente, estudos demonstram aplicações de lectinas em diversas áreas como por exemplo, na imunoterapia (GUPTA et al., 2020), no controle de parasitas (MEDEIROS et al., 2020), no diagnóstico e terapia contra o câncer (GAUTAM et al., 2020; TAMILARASAN et al., 2021) e atividade antimicrobiana (CORIOLANO et al., 2019).

A caracterização estrutural de lectinas tem sido feita por métodos eficazes, porém a aquisição das análises podem exigir diversas etapas, o uso de diversos reagentes e equipamentos complexos (CHEN et al 2019; PARTHIBAN et al 2020), neste sentido, os biossensores eletroquímicos tem de destacado por serem econômicos, uma vez que utilizam quantidades mínimas de amostras, podem ser livres de reagentes e de rótulos, são sistemas analíticos que produzem respostas rápidas e detectam as amostras com elevada sensibilidade (LI et al., 2011;

Silva et al., 2016; TAKALOO et al., 2021), são instrumentos analíticos que integram materiais biológicos ativos adsorvidos em uma superfície de transdução, quantificando ou qualificando as amostras, indicando transformações químicas ou bioquímicas na superfície do sensor (BETTAZI et al., 2017). Biossensores para lectinas são capazes de detectar açúcares simples, glicoconjugados, células e microrganismos (ABREU et al., 2017) portanto, já foram utilizados na diferenciação de alterações nos padrões de glicosilação exibidos por células tumorais (SILVA et al., 2016), no diagnóstico da dengue (ANDRADE et al., 2011) e seleção de patógenos de importância médica (OLIVEIRA, 2011; SÁ et al., 2020).

Para uma bioanálise eletroquímica de sucesso é necessário que o processo de imobilização da proteína não implique em perda de sua atividade biológica, devido a desnaturação, o que quase sempre ocorre quando a biomolécula é diretamente adsorvida em uma superfície metálica (ABREU et al., 2017), desta maneira, a incorporação destas proteínas em uma matriz polimérica podem evitar que isto ocorra, pois neste método não existem ligações químicas que promovam alterações na sua função biológica (OLIVEIRA et al., 2013; TRAN et al 2021). Uma classe especial de polímeros, as MOFs (Metal-Organic Frameworks), são conhecidas como gaiolas moleculares, elas podem ser utilizadas como suporte, para imobilização de biomoléculas, devido á suas excelentes propriedades como por exemplo, extensa área de superfície e elevada porosidade e podem melhorar significativamente o desempenho analítico de um biosensor (AHMAD et al., 2015; ZHANG et al 2021).

O objetivo desta tese foi caracterizar a lectina coagulante de semente de *M. oleifera* cMoL por métodos eletroquímicos e imunogenicidade e avaliar suas aplicações biológicas. O primeiro artigo aborda a purificação da lectina por um novo protocolo para obtenção do gel de guar compondo uma matriz de afinidade, também revela a caracterização parcial da lectina e aplicações como, atividade antimicrobiana e imunogenicidade, além disso um imunosensor foi projetado, utilizando a MOF de [$Cu_3$ (BTC) $_2$ (H2O) $_3$] como suporte eletroquímico para imobilizar cMoL e IgG anti-cMoL, com o intuito de caracterizar as interações biológicas. O segundo artigo esta relacionado com a caracterização eletroquímica de cMoL, e sua aplicação como biossensor atuando no controle de resíduos de um corante sintético, degradado por uma nova metodologia. O artigo três avalia a atividade antimicrobiana de cMoL frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Purificar cMoL através de um método simples para produzir o gel de guar e caracterizar a lectina por métodos eletroforéticos e eletroquímicos, avaliar sua imunogenicidade, atividade antimicrobiana e aplicação em um biossensor eletroquímico.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Purificar cMoL utilizando cromatografia de afinidade em gel de guar, produzido por um protocolo simples;
- Caracterizar cMoL por eletroforese SDS- PAGE, sob condições nativas para proteínas ácidas ou básicas e bidimensional;
- Realizar análise da estrutural de cMoL, frente a agentes desnaturantes variações de pH e temperatura;
- Avaliar atividade antimicrobiana de cMoL;
- Desenvolver antissoro de coelho contra cMoL;
- Caracterizar IgG anti-cMol através de imunodifusão;
- Caracterizar cMoL e IgG anti-cMoL por métodos eletroquímicos: Potenciometria, Voltametria e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Utilizar um sistema eletroquímico composto por recipientes de alumínio, formando pilhas de alumínio, para tratamento de amostras aquosas contendo corantes do tipo índigo - carmim que simula o efluente têxtil;
- Obter voltamogramas cíclicos (CV) utilizando biossensor com cMoL imobilizada na superfície MOF/eletrodo de platina com diferentes concentrações de corante e investigar o potencial de oxi-redução aglutinação desses poluentes;

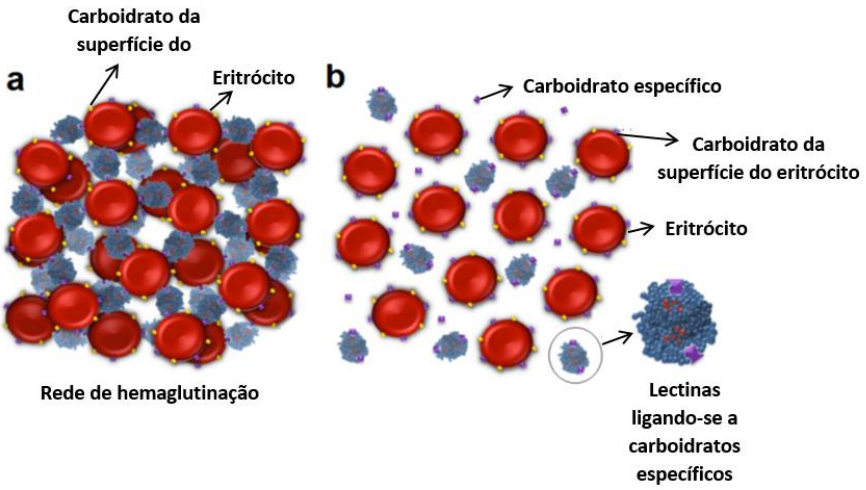
# 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA76

## 2.1 LECTINAS

### 2.1.1 Aspectos gerais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, que não foram originadas de um sistema imune, são capazes de formar ligações seletivas aos carboidratos e glicoconjugados livres ou aderidos na superfície celular (COELHO et al., 2017; ENAM et al., 2021). Elas podem decifrar porções glicanos dos glicoconjugados celulares, de elevada diversidade estrutural, com variações na posição anomérica (α ou β) e de pontos de ligação entre as hexoses, podendo gerar respostas biológicas variadas (LUDWIG et al., 2019). As lectinas podem ser encontradas nos diversos reinos biológicos de vertebrados, invertebrados, microrganismos e plantas, no qual são abundantes em sementes de leguminosas (COELHO et al., 2017; GAUTAM et al., 2019), elas podem ser agrupadas de acordo com o organismo ou microrganismo de origem como por exemplo: lectinas de algas, de plantas, animais e bactérias (DAMME et al., 1998; VAN DAMME, 2007; MISHRA et al., 2019; NIVETHA et al., 2021). A detecção de lectinas é observada pelo ensaio de hemaglutinação (AH) (Figura 1a), que consiste em ligações simultâneas entre as lectinas e os carboidratos da superfície dos eritrócitos formando uma rede de conexão que pode ser inibida na presença de um carboidrato específico (Figura 1b) (SANTOS et al., 2013).

Figura 1 - Representação esquemática de aglutinação de eritrócitos por lectinas e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.



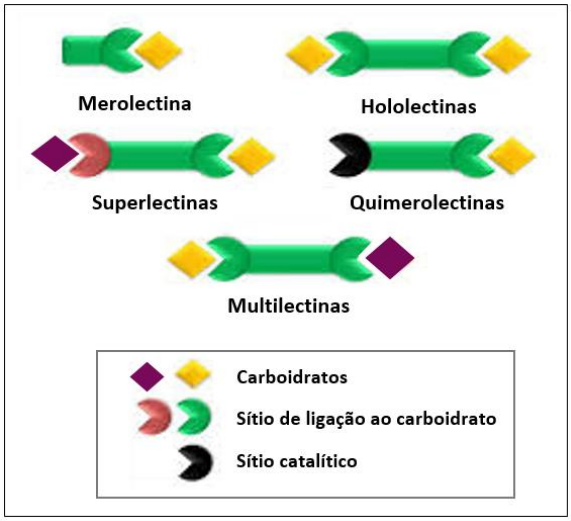

Fonte**:** Santos et al. (2013).

As interações lectina/carboidrato acontecem em um local específico, o domínio de reconhecimento ao carboidrato, no qual as ligações envolvidas são do tipo pontes de hidrogênio (GAJDOS et al., 2021), van der Walls e interações hidrofóbicas, essas ligações não envolvem reações catalíticas, são reversíveis e possuem elevada especificidade (COELHO et al., 2017).

### 2.1.2 Classificação e estrutura das lectinas

Lectinas podem ser classificadas de acordo com seus padrões estruturais (VIEIRA et al., 2014) e estão divididas de forma abrangente em cinco categorias Fig. 2, Merolectinas possuem um único domínio de ligação aos carboidratos, portanto não precipitam glicoconjugados ou aglutinam células, possuem apenas uma valência. Hololectinas possuem ao menos dois carboidratos iguais e domínios de ligação correspondentes, são bivalentes ou polivalentes, podem aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Superlectinas também podem ser descritas como um grupo especial de quimerolectinas, que se diferenciam das hololectinas, pois possuem dois domínios de ligação aos carboidratos distintos e que detectam diferentes formas estruturais de carboidratos. Quimerolectinas são proteínas quiméricas, pois possuem domínios distintos, de ligação ao carboidrato e outro domínio com ação enzimática, exercendo sua função de maneira isolada em relação ao domínio do carboidrato, elas podem ser consideradas merolectinas ou hololectinas com base na quantidade de domínios de ligação aos carboidratos apresentados (MISHRA et al., 2019). O termo multilectinas se refere á classificação de lectinas com dois ou mais domínios de ligação ao carboidrato idênticos, mas que podem formar ligação com açúcares diferentes (LACERDA, 2015). É o caso da jacalina (lectina de sementes *Artocarpus integrifólia*) e da frutalina (lectina de sementes de Artocarpus incisa) que ligam tanto D-galactose como D-manose (BUNN-MORENO et al., 1981; MOREIRA et al., 1998).

Figura 2 - Esquema representativo da classificação estrutural das lectinas.




**Fonte:** Adaptado de Vieira et al 2014

### 2.1.3 Aplicações biológicas das lectinas

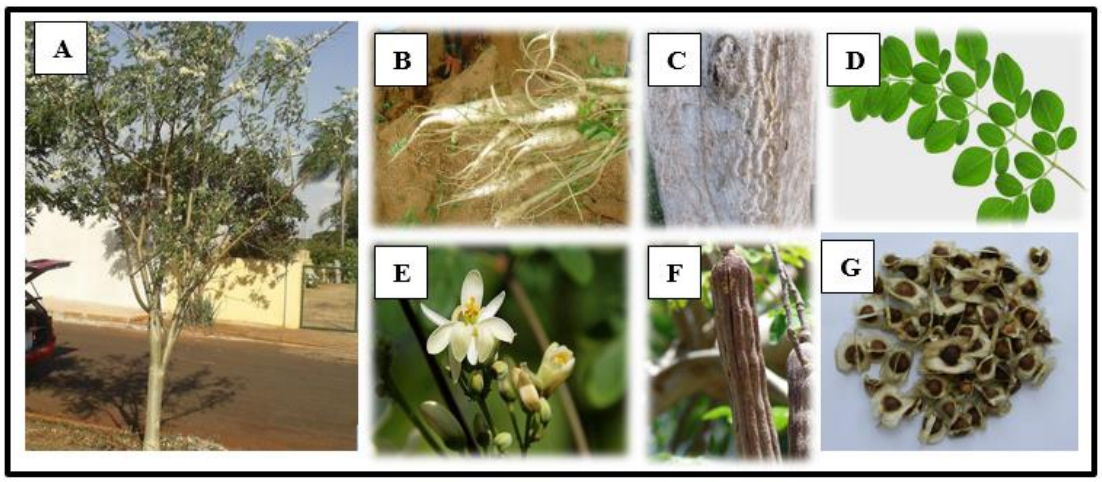
As lectinas são ferramentas biológicas importantes de uso em aplicações biológicas e biomédicas (COELHO et al., 2017), sua habilidade de reconhecimento de glicanos, carboidratos livres ou aderidos á superficie de células e moléculas glicoconjugadas, permitem que essas proteínas detectem padrões anormais de carboidratos exibidos por células tumorais (SILVA et al., 2016), no qual elas podem ser utilizadas como terapia e no diagnóstico (GAUTAM et al., 2019), além disso lectinas são moléculas versáteis que têm mostrado diversas aplicações (CAVADA et al., 2021), elas têm sido utilizadas em cromatografias de afinidade para o monitoramento em processo da concentração de proteínas glicosiladas ( STANTIČ et al., 2021) na detecção e seleção de microrganismos causadores de infecções (CESEWSKI et al., 2020), atuando e auxiliando no combate de vírus patogênicos e letais (RATHNASAMY et al., 2021; El-MARADNY et al., 2021), ainda podem ter atividade antibacteriana (CORIOLANO et al., 2019), inseticida (PAIVA et al., 2011; CHEN et al., 2021) também podem ser aplicadas aos biossensores (SÁ et al., 2020), ou como marcadores histoquímicos (TOMIYASU et al., 2018), ainda podem atuar na indução da multiplicação celular (CARVALHO et al 2018), na ativação do sistema imune (CLEMENT et al 2010; RATHNASAMY et al 2021; BUTLE et al., 2021) , e também podem auxilar na reconstrução de tecidos ósseos (OLIVEIRA et al., 2018).

## 2.2 *Moringa oleifera*

### 2.2.1 Caracteristicas gerais

*M. oleifera,* também conhecida pelo nome popular “lírio branco”, “quiabo de quina” ou “moringa” (MCCONNACHIE et al., 1999; PARROTTA, 2001; SILVA et al., 2018) é uma espécie vegetal arbórea (Figura 3A) pertencente a um único gênero da família das Moringaceae, sendo a mais conhecida entre as treze espécies (DUTTA et al., 2017), essa planta, nativa da Índia, teve seu cultivo ampliado em países de regiões tropicais, possue crescimento rápido e adaptação a climas extremos e escassez de nutrientes (SANTOS et al., 2012), É uma espécie vegetal duradoura, pertencente ao grupo das angiospermas com sementes formadas por embrião com dois cotilédones (MAIZUWO et al., 2017), pode florescer logo no primeiro ano, a propagação pode ocorrer por meio de sementes ou estaquia, cresce 1,5 cm ao dia em regiões com solo ou ambiente não favoráveis e de 1 a 2 m por ano quando está em ambiente adequado (SILVA et al., 2018) e seu tamanho pode variar entre 5 e 12 m (SANTOS et al., 2012). De um modo geral, esta planta possui características morfológicas do tipo: raízes axiais ou pivotante (Fig. 3B), contendo reservas de nutrientes e que se desenvolvem em profundidades, um fino caule acompanhado de uma copa aberta assemelhando-se a uma sombrinha (Fig. 3A e 3C). E, em relação ao tipo de folhas, estas são compostas, bipinadas e podem perder as mesmas em período de seca, além disso possuem um tamanho aproximado de 20 cm e coloração verde clara (Fig. 3D), as flores são brancas perfumadas e dispostas em inflorescências (Fig. 3E), o fruto, uma capsula tri-globular, possui cor verde quando imaturo, tornando-se seco e de coloração marrom quando maduro podendo abrigar de 15 a 20 sementes (Fig. 3F). Por fim, as sementes possuem estrutura globular, coloração escura na sua porção externa, encoberta por uma estrutura tri-alada e possui tamanho aproximado de 1,0 cm de diâmetro (Fig. 3G) (SILVA et al., 2018).

Figura 3 - A árvore *Moringa oleifera* e as diferentes partes da planta.




**Legenda: -** Aspectos de *M. oleifera*: A, árvore; B, raizes; C, caule; D, folhas; E, flores; F, frutos; G, sementes.
Fonte: https://www.google.com/search.

Além disso, seus tecidos já apresentaram diversas aplicações, sendo a planta conhecida como "árvore milagrosa", é bastante interessante do ponto de vista biotecnológico, auxiliando no tratamento de resíduos indústriais (DUTTA et al., 2017; ADESINA et al., 2021) e possui capacidade de solucionar diversos problemas em comunidades, como o tratamento da água para o consumo em populações carentes, e também devido ao seu elevado valor nutricional, tem servido como suplemento adicional alimentar, em países em desenvolvimento (FERNANDES et al 2021) (SANTOS et al., 2015; RAMAN et al., 2017; RAJESWARI et al., 2021;).

### 2.2.2 Lectinas das sementes de *M. oleifera*

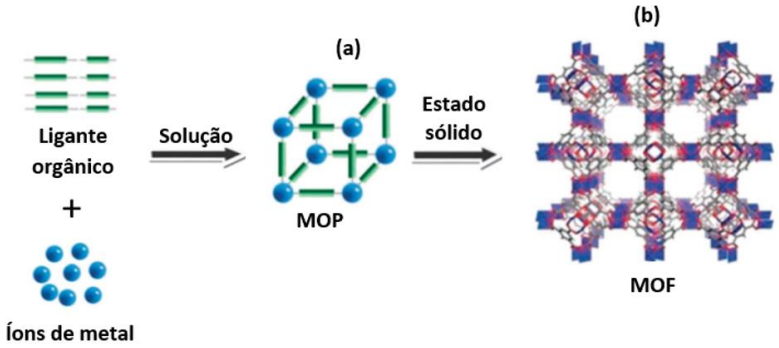
Nas sementes de *M. oleifera* podemos encontrar lectinas com diversas aplicações biológicas, entre elas a WSMoL, uma lectina solúvel em água, com carga elétrica aniônica, foi descrita primeiramente por Santos e colaboradores (2005), mostrou atividade hemaglutinante principal por eritócitos de coelho, foi isolada por cromatografia em quitina e a sequência N-terminal foi determinada (QAVQLTHQQQGQVGPQQVR), outra lectina, MoL foi purificada por Katre e colaboradores (2008) tratando-se de uma proteína de natureza catiônica formada estruturalmente por polipeptídios com subunidades de 7,1 kDa na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol e duas bandas de 13,1 e 27,1 kDa na ausência do mesmo, foi isolada usando um trocador iônico do tipo DEAE-Celulose e CM-Sephadex. A lectina de semente de *Moringa oleifera* (MOSL) foi purificada por Asaduzzamam et al (2018), usando coluna de quitina, apresentou um peso molecular de 17 ± 1 kDa e foi capaz de inibir o crescimento de células cancerigenas. A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL), é uma proteína com

cargas positivas, não glicosilada, que resiste a temperaturas elevadas e ampla faixa de pH, 4,0-9,0, a lectina mostrou atividade de clarificação da água turva por mecanismos de coagulação, de forma semelhante ao tratamento químico com o sulfato de alumínio, utilizado para obter água potável. Além disso a lectina tem mostrado diversas aplicações: induziu a necrose e apoptose em células do melanoma, sem causar danos significativos em células normais (LUZ et al., 2017), mostrou atividade inseticida em *Anagasta kuehniella*, interagindo com os carboidratos do trato digestivo desta praga agrícola, impedindo seu desenvolvimento e nutrição (OLIVEIRA et al., 2011), além disso a lectina inibiu a motilidade de larvas infectantes e vermes adultos machos e fêmeas em um parasita hematófago (MEDEIROS et al., 2020), e mostrou um efeito anticoagulante em um teste in vitro (LUZ et al., 2013).

## 2.3 METAL-ORGANIC FRAMEWORKS (MOFS)

Os materiais metal-orgânicos (MOMs), apresentam motivos estruturais constituído por íons ou aglomerados metálicos coordenados por pontes de ligantes orgânicos polidentados, combinam componentes químicos diversos e permitem a montagem de estruturas com diferentes dimensões geométricas, como polígonos, sistemas formados por gaiolas poliédricas discretas ou polímeros em coordenação (AHMAD et al., 2015). Um grupo que compõe estas estruturas, as Metal-Organic Frameworks (MOFs) (Fig. 4b), são redes de coordenação de polímeros cristalinos constituídos por centros metálicos e ligantes orgânicos formando estruturas repetidas, tridimensionais, altamente porosas, a partir de nós e espaçamentos de blocos secundários (MOPs) (Fig. 4a) , os diâmetros dos poros medem cerca de 3 a 20 Å e área interna 7000 $m^2$ $g^{-1}$ e limite superficial teórico 14 600 $m^2$ $g^{-1}$ mais que a metade dessas estruturas são constituídas por volumes vazios, até 90% e além disso possuem baixa densidade de (0,21 a 1,00 g $cm^{-3}$).[3] As MOFs, também conhecidas como gaiolas moleculares, têm sido utilizadas em áreas indústriais, biomédicas e bioquímicas, devido suas características como, ampla área de superfície interna, estabilidade térmica e química, bem como a presença de poros ajustáveis (AHMAD et al., 2015), esses padrões conferem a esses materiais uma grande habilidade de adsorção e elevada taxa de transferência de massa, tornando-os reconhecidamente um suporte excelente (MA et al., 2018) com ampla aplicação em biossensores (ZHANG et al 2021) .

Figura 4 – Arquiteturas moleculares de poliedros metal orgânicos discretos (MOPs) e estruturas tridimensionais (MOFs).




**Fonte:** Ahmad et al., 2015

## 2.4 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

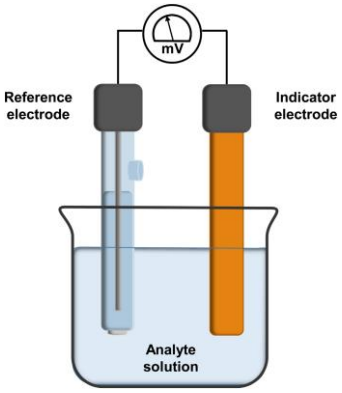
As técnicas eletroquímicas são baseadas nas interações que envolvem eletricidade e química, podendo ser medidas as quantidades elétricas como potencial, carga e sua relação com características físicas, químicas e biológicas do analito (ZHU et al., 2019). Estas técnicas podem ser aplicadas no monitoramento ambiental, industrial e em aplicações biomédicas (OMAÑA-SANZ et al., 2020; SHU et al., 2020; TANG et al., 2020). São métodos práticos, possuem instrumentação diversificada e além disso o avanço de diversas plataformas tem sido observado como, microelétrodos, monocamadas, transdutores e conexões com elementos biológicos. As reações ocorrem nos sistemas de interfaces eletrodo/solução, denominado célula eletroquímica (GIL et al., 2019).

### 2.4.1 Célula Eletroquímica

Uma célula eletroquímica é composta por eletrodos de trabalho e de referência acoplados a um multímero (Figura 5), esse sistema pode converter de modo recíproco um sinal químico em elétrico, através de medidas de potencial gerados por um par redox (PIMENTEL, 2009). A célula eletroquímica pode ser do tipo eletrolítica, quando adquire a eletricidade a partir de uma fonte externa gerando uma reação (DASSAA et al., 2020), ou pode ser do tipo galvânica, no qual produz a energia elétrica a partir de uma reação química (KIM et al., 2019), esta técnica pode ser aplicada em estudos de compostos de naturezas diversas, como por exemplo: líquidos

orgânicos (TANG et al., 2020), compostos orgânicos (ZHOU et al., 2021) e macromoléculas biológicas (SUN et al., 2019).

Figura 5 - Esquema representando a célula elétroquímica eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e solução eletrolítica.




**Fonte:** Gil et al., 2019

A superfície do eletrodo é a junção da condução iônica e a condução elétrica (WANG, 2019), e cada componente do par redox constitui uma semi célula, que tem como referência padrão o hidrogênio, escolhido por não haver potenciais redox com valores definitivos. Este eletrodo é constituído pelo gás hidrogênio a 1 atm em solução de equilíbrio pH 0, a partir dele transferências eletrônicas podem ser conferidas em semi células individualmente (JARDIM, 2014), pois ele possui um potencial constante independente das propriedades da solução (WANG, 2019).

Por não ser considerada uma meia célula padrão prática, o eletrodo de hidrogênio foi covenientemente substituído nas reações por outros eletrodos de referências, entre os mais utilizados: o eletrodo calomelano e Ag/AgCl, eles são ajustados a partir do padrão hidrogênio, são compostos por metal em contato com solução de cloreto com imersão de um sal insolúvel, o sistema de óxido redução entra em contato com a solução experimentalmente através de uma ponte salina (JARDIM, 2014).

A outra metade da semi célula, o eletrodo de trabalho, é responsável pelas medições das respostas das substâncias ou componentes químicos analisados (WANG, 2019), correspondem na maioria das vezes a uma tira metálica de platina fundida em um bastão de vidro, porém, o uso de outros metais como o ouro, também são utilizados. Estes metais entram em contato com a solução do ensaio de forma direta e juntamente com a meia célula de referência constituem um sistema redox (JARDIM, 2014). O movimento de elétrons nos processos de óxido redução de uma proteína, estando ela imobilizada ou adsorvida é correspondente a variáveis como,

estrutura conformacional da biomolécula e características físico-química da região de interfaces (JADILMA PIMENTEL, 2009).

### 2.4.2 Potenciometria

A potenciometria é um método de análise baseado no uso de eletrodos. Podem ser aplicados na medição de pH, eletrodos de vidro, e no uso de eletrodos seletivos de íons. O potencial do eletrodo é utilizado para possibilitar uma reação em que ocorre a transferência de elétrons GIL et al., 2019). Sensores potenciométricos transformam um sinal de bioreconhecimento em potencial elétrico, sendo este proporcional ao percentual de concentração dos compostos ativos, produzidos ou consumidos na reação (CLARKE et al., 2020). A reação de transferência de eletrons ocorre devido a força do movimento de cargas, quando um potencial é gerado no eletrodo de medição, esse potencial resulta da desigualdade distributiva de íons em análise no sistema de interfaces, que podem ser comparados ao valor invariável do eletrodo de referência e da inatividade do íon na solução interna, desse modo, o potencial do eletrodo de trabalho é proporcional a concentração ou atividade do analito na solução (BRUNER et al., 1991; WANG, 2019; SCHERLIS et al., 2005; ZHU et al., 2019). A análise do potencial de uma proteína como enzimas, anticorpos e lectinas permite o mapeamento da distribuição de cargas de sua superfície (JADILMA, 2009). Um sistema potenciométrico foi capaz de detectar modificações estruturais de uma lectina na presença de íons, mesmo em amostras complexas (SANTANA et al., 2012), o conhecimento do processo de óxido redução em lectinas, corresponde a primeira etapa para a compreensão de sua atividade biológica (SOUZA et al., 2001).

### 2.4.3 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é comumente aplicada na aquisição de indicativos de qualidade dos processos redox em eletroquímica (LI et al., 2020). Esta técnica é indicada como a primeira etapa para estudos das propriedades elétricas do analito na solução e constitui uma poderosa ferramenta, por sua habilidade de fornecer rapidamente informações relevantes sobre transformações de energia como, a termodinâmica nos processos de óxido redução, cinética de reações complexas envolvendo transferência de elétrons, reações que envolvem liberação de energia química e mecanismos de adsorção. Através deste método é possível localizar rapidamente o potencial redox de moléculas carregadas (WANG, 2019), através da

caracterização da passagem dos elétrons, por uma leitura detalhada do potencial do eletrodo de trabalho aplicando um formato de onda triangular, no qual é feita a medição da corrente obtida (SOUZA et al., 2017).

As características do analito são obtidas, através da determinação da amplitude da corrente elétrica resultante da relação do eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, quando uma tensão elétrica é aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (PACHECO et al., 2013), de acordo com os dados que se deseja obter nas analises, pode haver um ou mais ciclos durante o processo. A corrente resultante é medida pelo potenciostato e o gráfico do voltamograma é originado da corrente versus potencial (WANG, 2019).

### 2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a visualização de imagens de elevado valor informativo sobre a estrutura da amostra e microarranjo de atividades elétricas e químicas (WANG, 2019), utiliza a ponta de um ultramicroelétrodo, movimentado por um controlador piezoelétrico, para análises superficiais de substratos imersos em solução contendo elementos com carga elétrica ativa. Nesse processo, são medidas as correntes faradaicas, obtidas a partir da capacidade de propagação de energia e a característica química do substrato como também, do valor aproximado entre a ponta do ultramicroelétrodo e o substrato. A distribuição de tamanho, forma e morfologia da superfície de uma lectina conjugada foi caracterizada por MEV (MAHMOOD et al., 2020). Essa técnica tem sido útil na visualização de alterações morfológicas em parasitas, causadas por lectinas (MEDEIROS et al., 2020).

## 2.5 BIOSSENSORES

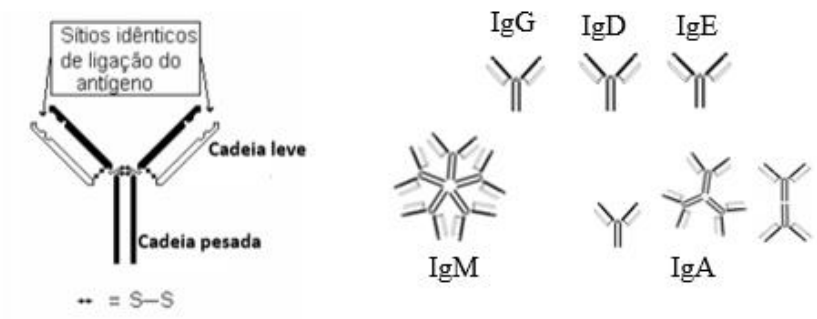
Os biosensores oferecem uma diversidade de instrumentação, rapidez, alta sensibilidade, além de serem econômicos, são capazes de identificar moléculas alvo em substâncias heterogêneas, utilizando pouca quantidade de amostra (BETTAZZE et al., 2017; RAWAT et al., 2017). O funcionamento desses sistemas ocorre pela imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo, que quando em contato com seus ligantes convertem o sinal biológico em uma corrente elétrica mensurável (SILVA et al., 2018). Dentre algumas reações que podemos analisar com estes sistemas estão: as interações proteínas/carboidratos, anticorpos/antígenos, enzimas/substratos (MEHROTRA et al., 2016).

Esses sistemas tém sido promissores no diagnóstico de microrganismos de importâncial global (ABID et al., 2021), de contaminates da água (RENGARAJ et al., 2018; FRUHMANN et al., 2018), no monitoramento de alimentos processados (PUNDIR et al., 2019), também tem sido amplamente útil no reconhecimento de células cancerígenas (FALKOWSKI et al., 2020), utilizando lectinas como molécula de bioreconhecimento, devido sua capacidade em diferenciar padrões específicos de carboidratos em células tumorais, por exemplo (SILVA et al., 2016). Esse sistema também pode ser utilizado na caracterização da distribuição de cargas superfíciais de lectinas, bem como os parâmetros de ligação aos carboidratos (SOUZA et al., 2001; SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2017).

## 2.6 ANTICORPOS

Os anticorpos possuem suma importância no reconhecimento de moléculas biológicas, fazem parte do sistema de defesa dos organismos contra partículas estranhas (antígenos) podendo decta-las e neutraliza-las (XIAOJIE et al 2021). Eles são originados do sistema imune adaptativo pela ativação de células de defesa (linfócitos B), possuem a capacidade de ligar-se de maneira reversível e com ampla afinidade a epitopos da molécula alvo (YONG et al., 1995), estas proteínas estão classificadas no grupo das imunoglobulinas (Ig), que em mamíferos podem ser: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE (HANLY et al 1995). As Igs são constituídas por polipeptídios, com unidades estruturais básicas formadas por duas cadeias leves e duas pesadas unidas entre si por pontes dissulfeto (BENJAMINI et al., 1988) e cada cadeia possui uma região constante Fc, no qual são transmitidas as funções biológicas e regiões V, variáveis com funções de aglutinação e especificidade de ligações ao antígeno Fig 6. Os anticorpos podem ser do tipo monoclonais, clones de um linfócito B apenas ou policlonais quando originados por clones de diversos linfócitos B (Leenaars et al., 2005).

Figura 6: Estrutura geral de um anticorpo composta por cadeias polipeptídicas, região constante Fc (cadeia pesada) e região variável V (cadeia leve). Imunoglobulinas IgM, IgG, IgA, IgD e IgE.




Fonte: Adaptado de LENZ, 2004

### 2.6.1 Desenvolvimento de anticorpos policlonais

A produção de anticorpos policlonais é realizada pela imunização de animais de laboratório, sendo necessário a criação de protocolos eficientes e que promovam um título elevado de anticorpos com grande especificidade (LEENAARS et al., 1999). Essas biomoléculas são bastante utilizadas em pesquisas nas diversas áreas, são ferramentas importantes em testes diagnósticos (STOCK et al., 2015), no controle de qualidade na indústria de processamento de alimentos (DELAHAUT et al., 2017) e também na imunização contra doenças virais (STEIN et al., 2017), em estudos de imunohistoquímica (BARTAQUINI et al., 2020). Os anticorpos desenvolvidos por lectinas de plantas podem desempenhar um papel importante no reconhecimento de homologias (ASHFORD et al., 1982), como biosensores eletroquímicos na caracterização dos locais de ligação aos carboidratos (SOUZA et al., 2019). Um antissoro desenvolvido contra uma lectina de leguminosa, foi capaz de detectar a lectina nos tecidos do vegetal, principalmente nas folhas jovens (KHURTSIDZE et al., 2017).

# 3 ARTIGO 1

**PURIFICAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE *MORINGA OLEIFERA* (CMOL) POR GEL DE GUAR OBTIDO POR UM MÉTODO SIMPLES, AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOGÊNICA E APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSOR.**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO**

**Anais da Academia Brasileira de Ciências**

**Purificação da lectina coagulante de *Moringa oleifera* (cMoL) por gel de guar obtido por um método simples, avaliação de suas atividades antimicrobiana e Imunogênica e aplicação em imunossensor.**

Benny Ferreira de Oliveira[a], Carlos Eduardo Sales da Silva[a], Maiara Celine de Moura[a], Pollyanna Michelle da Silva[a], Maria das Graças da Silva Gomes[a], Thâmarah Albuquerque Lima[a], Ana Patrícia Silva de Oliveira[a], Maria Daniela Silva Buonafina[b], Rejane Pereira Neves[b], Wagner Pereira Felix[c], Kátia Cristina Silva de Freitas[d], Sandra Rodrigues de Souza[d], Thiago Henrique Napoleão[a], Patrícia Maria Guedes Paiva[a], Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho[a*]

[a]*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*
[b]*Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*
[c]*Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.*
[d]*Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.*
[e]*Departamento de Educação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.*

* Autor para correspondência: Celular, +55 81 999455897;
Endereço de e-mail: lcbbcoelho@gmail.com

Endereços de e-mail dos autores: bennyfoliveira@gmail.com (B.F. Oliveira), carlossalles10@yahoo.com.br (C.E.S. Silva), maiaraceline@yahoo.com.br (M.C. Moura), pollyanna.michelle@gmail.com (P.M. Silva), gracinha.bete@gmail.com (M.G.S. Gomes), thamarahalbuquerque@yahoo.com.br (T.A. Lima), anapatriciaso@hotmail.com (A.P.S. Oliveira), danielabuonafina@hotmail.com (M.D.S. Buonafina), rejadel@yahoo.com.br (R.P. Neves), wagner.felix@univasf.edu.br (W.P. Felix), katia.sfreitas@ufrpe.br (K.C.S. Freitas), souzz.rodrigues@gmail.com (S.R. Souza), thiagohn86@yahoo.com.br (T.H. Napoleão), ppaiva63@yahoo.com.br (P.M.G. Paiva), lcbbcoelho@gmail.com (L.C.B.B. Coelho)

**Resumo**

A lectina coagulante de *Moringa oleifera* (cMoL) foi previamente isolada de sementes por meio de gel de guar envolvendo habilidades químicas. Neste trabalho foi avaliada a eficácia de um protocolo simples para obter o gel de guar como uma matriz de afinidade para purificar cMoL a confirmação das características da lectina foram feitas por mais de um método de caracterização, bem como estudos de estabilidade, frente a variações de pH e temperatura. Também foram testadas as seguintes atividades biológicas da lectina: (antifúngicas e antibacterianas), resposta imune em coelhos e aplicação em um imunossensor. Lectina dessorvida por galactose com atividade de hemaglutinação específica de 1.280 mostrou eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com subunidades de pesos moleculares de 26,5 e 19 KDa e pI 9,8. A exposição de grupos hidrofóbicos, foram observadas na estrutura de cMoL após o contato com os agentes desnaturantes, porém estas modificações não inibiram a atividade da lectina. Houve uma inibição do crescimento de *Staphylococcus saprophyticcus* e *Cryptococcus neoformans*, com 125 μg/mL e 64 μg/mL de cMoL, respectivamente. Atividade fungicida foi observada em *C. albicans* e *C. tropicalis* (4 mg/mL). O soro imunizado contra cMoL reconheceu a lectina após a terceira inoculação, revelada por linhas de precipitação na imunodifusão e variações no potencial eletroquímico. Em conclusão, o protocolo simples obteve gel de Guar com as características necessárias para interação com cMoL, sendo, portanto capaz de isolar a lectina. A lectina inibiu o crescimento de fungos e bactérias e apresentou atividade fungicida; lectina imunogênica e um sensor eletroquímico foram usados para caracterizar as interações entre cMoL e IgG anti-cMoL e indicaram que essa ligação pode ser inibida pela galactose; imunossensor foi aplicado com sucesso no monitoramento do desenvolvimento do anticorpo, essa abordagem em tempo real fornece novas perspectivas para modelos de estudo envolvendo interações biológicas, aplicações biomédicas.

**Palavras-chave:** *Moringa oleifera*, lectina coagulante, gel de guar, atividade antimicrobiana; soro anti-lectina; sistema eletroquímico

## 1. INTRODUÇÃO

*Moringa oleifera* (família Moringaceae) é uma árvore nativa da Índia com ampla distribuição mundial e boa adaptação a diversas condições climáticas. Seu cultivo tem aumentado em todo o mundo devido ao alto valor nutricional das partes comestíveis e potenciais

aplicações em diversas áreas como medicina alternativa, cosméticos e indústrias alimentícias (SANTOS et al., 2015). A lectina coagulante *M. oleifera* (cMoL) é uma proteína de ligação ao galactosídeo, catiônica, previamente isolada das sementes dessa planta. A cMoL é capaz de reduzir a turbidez da água de forma semelhante ao sulfato de alumínio, a substância mais utilizada no tratamento de água (SANTOS et al., 2009). A lectina é uma proteína composta por 101 aminoácidos e sua capacidade de ligação a carboidratos é ativa em ampla faixa de pH (4,0 a 9,0) e mesmo após aquecimento em altas temperaturas (100°C) (SANTOS et al.,2009; LUZ et al 2013). Além disso, a cMoL mostrou atividade inseticida contra *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA et al., 2011), foi capaz de prolongar o tempo de coagulação do sangue (LUZ et al., 2013), mostrou citotóxicidade para células de melanoma B16-F10 (LUZ et al 2017) e atualmente também mostrou ação antiparasitária (Medeiros et al., 2020).

Por definição as lectinas são proteínas capazes de se ligar a mono, oligo e polissacarídeos de maneira específica e reversível. Elas podem ser encontradas em microrganismos, líquens, vertebrados, invertebrados e plantas, nas quais têm sido isoladas de diferentes tecidos, principalmente sementes (SANTOS et al., 2013). A análise estrutural das lectinas é importante na elucidação de suas aplicações em eventos biológicos (LUZ et al., 2013) como por exemplo, o teste de fluorescência tem sido útil para avaliar até que ponto as mudanças conformacionais provocadas por agentes desnaturantes, comprometem sua atividade biológica (SILVA et al., 2018).

Entre as atividades biológicas e biotecnológicas das lectinas, elas são capazes de interagir com frações de glicosídeos na superfície das células, promovendo uma ação antimicrobiana (COELHO et al., 2017), a inibição do crescimento microbiano está geralmente relacionada à ligação da lectina aos glicoconjugados na superfície celular, alterando a permeabilidade, reduzindo a captação de nutrientes e desencadeando respostas intracelulares (PROCÓPIO et al., 2017). Portanto lectinas se tornaram fontes naturais de pesquisas sobre novas alternativas de tratamento contra bactérias e fungos patogênicos humanos, uma vez que tem sido observado o surgimento de cepas microbianas resistentes a antibióticos (REGENTE et al., 2014; MOURA et al., 2017; PALHARINE et al., 2017).

Outro exemplo de aplicação biotecnológica das lectinas pode ser no desenvolvimento de anticorpos policlonais (Ning et al., 2020). A produção de anticorpos policlonais é relevante no campo biotecnológico por serem heterogêneos, altamente específicos e capazes de reconhecer vários epítopos do antígeno e essa capacidade os torna aplicáveis em diversas áreas

como imunodiagnóstico, na indústria de alimentos e para fins terapêuticos, (LEENAARS et al., 2005). A imunoglobulina anti-lectina de plantas pode ser aplicada para identificar a presença da lectina em outros tecidos do vegetal. (KHURTSIDZE et al., 2017), bem como identificar proteínas com homologia à lectina (ASHFORD et al., 1982; GOODE et al., 2016). O IgG anti-lectina pode ser aplicado em imunossensores (Souza et al., 2019), estes são constituídos por um elemento de detecção (anticorpo) imobilizado na superfície de um transdutor e cuja interação antígeno-anticorpo tem como resposta um sinal mensurável (BETTAZI et al., 2017; DESWAL et al., 2019). Em um sistema eletroquímico a resposta do sensor pode ser aprimorada pela incorporação de nanoestruturas, entre as quais as nanopartículas híbridas (TRAN et al., 2021), como por exemplo MOFs, que são estruturas com extensas áreas superficiais e elevada porosidade e ainda uma excelente capacidade de adsorção, esses polímeros metais orgânicos, têm sido úteis para imobilizar biomoléculas para construção de biossensores eletroquímicos (Zhang et al., 2021).

Neste trabalho foi avaliada a eficiência de um método simples para obter o gel de Guar, matriz de afinidade para purificar cMoL, a lectina foi caracterizada por técnicas eletroforéticas SDS-PAGE, para proteínas nativas e bidimensional. Também foram realizados testes de estabilidade da lectina mediante variações de pH e temperatura. E foi avaliado o potencial antimicrobiano da lectina, e a sua resposta imune em coelhos. Um imunossensor potenciométrico foi utilizado para caracterizar a interação de cMoL IgG anti-cMoL, imobilizados na superfície do eletrodo por um polímero metálico orgânico MOF [Cu3 (BTC) 2. (H2O) 3] n.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Produção de gel de guar

O gel de guar foi produzido de acordo com o método descrito por Appukutan et al. (1977). Dez gramas de goma guar (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em 30 mL de NaOH 3 M e então 3,0 mL de epicloridrina foram adicionados. A mistura foi incubada a 40 ºC por 24 h e posteriormente por 12 h a 70 ºC. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada e armazenado a 4 ºC até o uso.

### 2.2 Extração de proteína

O extrato obtido da semente de *M. oleifera* em pó e solução salina, foi adicionado com sulfato de amônio a 60% (p/v) de saturação de acordo com Green e Hughes (1995). A fração precipitada (F 0-60%) foi coletada, ressuspensa e dialisada com água destilada (4 h, com duas trocas de líquido); em seguida, adicionada em uma coluna (10 x 1,0 cm) contendo o gel guar preparado como descrito na seção anterior, equilibrado com 0,15 M NaCl. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas relatadas por Santos et al. (2009) para purificar cMoL. Uma taxa de fluxo de 20 mL/h foi mantida e, após uma etapa de lavagem com a solução de equilíbrio, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 1, 0 M de NaCl. Frações de 2, 0 mL foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e atividade hemaglutinante (AH).

### 2.2.1 Concentração de proteína e atividade hemaglutinante

A concentração de proteína foi estimada pelo método de Lowry et al (1951) usando albumina de soro bovino (31, 25–500 µg/mL) como padrão. O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi utilizado para avaliar a capacidade de ligação de carboidratos da lectina, de acordo com Paiva e Coelho (1992), em eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (BING et al 1967). AH específico foi determinado como a razão entre o AH e a concentração de proteína (mg/mL). O ensaio de AH também foi realizado em amostras de lectina previamente incubadas por 15 min a 28°C com fetuína (0,5 mg/mL), caseína e azocaseína (1 mg/mL); também, D (-) - frutose, L (+) - ramnose, (+) arabinose, D (+) - glicose, D (+) - lactose, D (+) - manose e galactose (200 mM) foram usados.

## 2.3 Caracterização da lectina

### 2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições nativas para proteínas ácidas ou básicas foi realizada de acordo com Davis (2006) e Reisfeld et al. (1962), respectivamente. As bandas polipeptídicas foram coradas com 1% (p/v) de Amido Black em 10% (v/v) de ácido acético (proteínas básicas) ou com 0,02% (w / v) de Coomassie Brilliant Blue em 40% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético (proteínas ácidas). O reagente de Schiff (Sigma) avaliou a presença de carboidratos no cMoL, de acordo com Pharmacia Fine Chemicals (1980). A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970) e as bandas polipeptídicas foram coradas com a solução

usada em PAGE para proteínas ácidas. Os padrões de massa molecular (12–225 kDa, GE Healthcare Life Sciences) também foram submetidos à eletroforese no mesmo gel.

### 2.3.2 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional foi realizada usando um sistema IPGPhor III (GE Healthcare Life Sciences, Suécia). cMoL (150 μg) foi solubilizado em uma solução de reidratação [2% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) tampão IPG pH 3-10, 0,002% (w/v) de azul de bromofenol] por 20 min a 28 °C. A amostra foi recolhida passivamente na tira (gradiente linear de pH 3-10; 7 cm) durante a reidratação por 16 h a 25 °C. A focagem isoelétrica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A tira foi então lavada três vezes com uma solução de equilíbrio [50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6,0 M ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/ v) SDS e 0,002% (p/v) bromofenol azul] e transferido para o topo de um gel de SDS-PAGE a 12% (p/v). Os polipeptídeos foram corados com 0,02% (p/v) de Coomassie Blue G-250. O gel foi analisado por meio do software Image Master (GE Healthcare).

### 2.3.3 Análise fluorimétrica

A estabilidade conformacional do cMoL purificado em relação ao aquecimento e variação do valor de pH foi avaliada por análise fluorimétrica usando a sonda extrínseca bis-ANS [(bis (8-anilinonaftaleno-1-sulfonato)]. As medições de fluorescência usaram amostras (1 μM) incubadas com 50 excesso molar dobrado de bis-ANS no escuro. A estabilidade ao calor da lectina foi investigada através da incubação em temperaturas variando de 40 a 100 ºC por 30 min. O efeito do pH foi realizado incubando alíquotas de cMoL em diferentes tampões de pH variando de pH 4,0 a 12,0 por 24 h antes da aquisição dos dados de fluorescência. Os espectros de fluorescência bis-ANS foram registrados em um espectrofluorômetro Jasco FP-6300 (Jasco Corporation, Japão), definindo o comprimento de onda de excitação em 360 nm e a emissão em 400 a 600 nm.

### 2.3.4 Ensaios antimicrobianos

A atividade antibacteriana foi investigada contra gram-positivos (*Bacillus megaterium* ATCC-14945, *Bacillus subtilis* UFPEDA-86, *Enterococcus faecalis* UFPEDA-138, *Micrococcus luteus* ATCC-2225, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, *Staphylococcus*

*saprophytic* (UFPEDA-833) negativo *Escherichia coli* UFPEDA-224, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-9665, *Proteus mirabilis* UFPEDA-767, *Salmonella enteritidis* UFPEDA-414, *Serratia marcescens* ATCC-14756, *Serratia sp.* UFPEDA-398, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853), fornecida pela coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE (WDCM-114). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo ensaio de microtitulação proposto pelo The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Os ensaios utilizaram as culturas diluídas para $2 \times 10^6$ UFC/mL. Em uma linha de microplacas de 96 poços, o cMoL (80 µL; 10 e 1 mg/mL) foi diluído em série duas vezes no primeiro poço servido como um controle de meio estéril (200 µL de MHB) e o segundo poço correspondeu a positivo controle de crescimento, sem lectina. A suspensão do microrganismo (80 µL; $2x10^6$ UCF/mL) foi adicionada ao segundo até ao décimo segundo poços da fila. A densidade óptica em 600 nm (OD600) foi medida em um leitor de microplacas (Biotek Instruments Inc., EUA) e as placas foram incubadas a 37 ºC por 24 h. Após este período, o OD600 foi lido novamente. O aumento da densidade óptica em comparação com o tempo zero foi considerado como crescimento microbiano. A CMI foi definida como a menor concentração de amostra que reduziu a DO600 em pelo menos 50%, em comparação com o controle de crescimento positivo. Cada ensaio foi realizado em triplicado e duas experiências independentes foram feitas. As bactérias foram cultivadas em Agar Mueller Hinton (AMH) a 37°C. A densidade das culturas foi ajustada a um comprimento de onda de 600 nm a 1,5 x 108 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL em NaCl 0,15M estéril. Para determinar as concentrações mínimas de bactericida (CMB), o conteúdo dos poços contendo concentrações de lectina maiores ou iguais à CMI foi espalhado (10 µL) em AMH. As placas foram incubadas por 24 h e o CMB correspondeu à menor concentração de lectina que reduziu a viabilidade do inóculo inicial em 99, 9%.

Os ensaios antifúngicos foram realizados utilizando *Candida albicans* URM5901, *C. krusei* URM6391, *C. tropicalis* URM6551, *C. glabrata* URM6392, *C. parapsilosis* ATCC22019, *Sporothrix schenckii* (URM2848, URM1013 e URM3686), bem como *Aspergillus fumigatus* (URM5698, URM6577 e URM5992), obtidos da coleção de culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O método utilizado para a levedura seguiu as condições descritas no documento do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) e para fungos filamentosos Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). O meio de cultura foi RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino

propanossulfônico (MOPS, 0,165 mol / L, Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O cMoL foi preparado e utilizado na faixa de 10 mg/mL a 1024 μg/mL, diluído em dimetilsulfóxido, DMSO (Dinâmica: Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil). Isolados de fungos filamentosos foram colhidos em meio de ágar batata dextrose (BDA) em tubos e incubados por até sete dias a 35ºC. Sequencialmente, foram adicionados às colônias fúngicas 3 mL de solução salina estéril 0,85%, e a suspensão foi homogeneizada com pipeta. Posteriormente, a mistura resultante foi transferida para tubos de ensaio estéreis, adicionando Tween 20 (10 μL de Tween/5 mL de solução salina) para facilitar a dispersão dos esporos. Após 5 min de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e agitado por 15 s em vórtice. A densidade da suspensão foi ajustada por espectrofotômetro a 530 nm para obter uma densidade óptica de 0,09 a 0,13. As suspensões foram então diluídas (1:50) em RPMI 1640 para dar uma concentração final de cerca de 0,4 x $10^4$ a 5 x $10^4$ CFU/mL. As placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) foram usadas para os testes, nos quais 100 μL de cada diluição de droga a ser avaliada estavam nas linhas 1 a 10. Em seguida, 100 μL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas linhas 11 e 12, que foram utilizados como controle de crescimento e esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 μL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das linhas 1 a 11, e as microplacas foram incubadas a 35 ° C por 48 h para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CMI), definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibindo o crescimento. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CMF), o conteúdo dos poços mostrando 100% de inibição do crescimento foi cultivado no meio Sabouraud Dextrose Ágar, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35 ° C por três dias para determinar a viabilidade do fungo. A CMF foi confirmada pela ausência de crescimento de fungos. Os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata.

### 2.4 Produção de soro anti-cMoL

A Lectina purificada (150 μg) foi dissolvida em 1 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 6,8 contendo NaCl 0,15 M e então emulsionada com 1 ml de adjuvante completo de Freund para a primeira inoculação em dois coelhos brancos machos da Nova Zelândia, seis meses de idade. As injeções subsequentes (1 mL) de adjuvante incompleto de Freund foram realizadas em intervalos de quinze dias. O sangue (10 mL) foi coletado da artéria central da orelha do animal antes da primeira inoculação para obtenção de soro pré-imune (controle). Quinze dias

após cada inoculação, foram coletados 10 ml de sangue e cada mililitro foi coagulado em tubo de vidro com ângulo de 45°C, à temperatura ambiente por 1 h e colocado no mesmo ângulo a 4°C durante a noite. O soro obtido foi centrifugado três vezes (1300 g, 5 min, 25°C) e armazenado a -20°C. O Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONSEA) da UFPE (processo 0022/2020) aprovou os protocolos experimentais.

### 2.4.1 Ensaio de imunodifusão dupla

O ensaio de dupla imunodifusão foi realizado conforme descrito por Ashford et al. (1982). Géis de agarose (1%, p/v, em NaCl 0,15 M) com 3 mm de espessura foram moldados em placas de vidro (2,5cm x 7,5cm). Em cada gel, quatro poços (3mm de diâmetro) foram perfurados, um no centro da placa e três na periferia. Os poços periféricos foram preenchidos com 10 µL da amostra (extrato, fração precipitada ou lectina a 1mg/mL) e o poço central recebeu 10 µL do soro anti-cMoL (1 mg/mL de proteína). As soluções foram difundidas durante 48 h a 4°C em câmara umidificada. Os géis foram lavados com NaCl 0,15 M e água destilada e corados com Azul de Coomassie R-250 0,1% (p/v) em etanol a 45% (v/v) contendo ácido acético a 10% (v/v). O gel foi destilado com ácido acético a 10% (v/v).

## 2.5 Ensaios eletroquímicos

### 2.5.1 Eletrodo de trabalho e referência

O eletrodo de referência Ag/AgCl é composto por um fio de prata (Ag) retirado de um eletrodo de pH danificado que não poderia mais ser usado em laboratórios. Parte desse fio foi recoberta com cloreto de prata (AgCl) e este foi inserido em uma ponta de plástico contendo uma solução condutora saturada de KCl 3mol/L. O eletrodo de trabalho utilizado foi uma placa de platina com área de 0,5 cm2. Antes da montagem foi imerso em solução de ácido nítrico (HNO3), por 2 min, e seco em temperatura ambiente.

Figura 1 - Eletrodo de trabalho modificado, Pt/MOF/cMoL

Fonte: o autor (2019).

### 2.5.2 Síntese da Estrutura Metal-Orgânica - MOF de [Cu3 (BTC) 2. (H2O) 3] n

Na síntese de [Cu3 (BTC) 2 (H2O) 3] n, os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. Ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico (BTC) (98%), N, N-dimetilformamida (DMF) (99,8%), nitrato de sódio (99%), duas placas de cobre (99,9%) e água com alta pureza (MILLIPORE). As placas de cobre foram usadas como eletrodos auxiliares e de trabalho, usados como ânodo de sacrifício e fonte de cobre. Esses eletrodos foram submetidos a pré-tratamento físico (com lixa) e químico, imergindo uma área de 5 $cm^2$ em ácido nítrico a 20% em volume, por 2 min.

O sistema consistia em uma célula eletroquímica de vidro pirex com um compartimento, a rota eletroquímica era amperométrica, mantendo o potencial em 12V utilizando a fonte de alimentação DC modelo PS-1502 DD. A solução utilizada foi uma mistura de ácido 1, 3, 5-benzeno tricarboxílico (0,048 mol L-1), solubilizado em uma mistura de solventes DMF/H2O (1: 1) (Silva et al 2017). Após 17 min de reação, um sólido azul de MOF foi obtido com um rendimento de 73%. Esse sólido foi filtrado, lavado com a mesma mistura de solventes e levado à secura em uma estufa a 120 ºC por 30 min (Silva et al 2018).

### 2.5.3 Avaliações eletroquímicas do desenvolvimento de soro anti-cMoL e interações específicas de soro cMoL e anti-cMoL imobilizado na superfície do eletrodo MOF / platina

Para a obtenção do potencial eletroquímico, o soro anti-cMoL adquirido nas diferentes etapas da inoculação foi imobilizado no eletrodo MOF/platina; os controles foram soro pré-imune e cMoL purificado. Avaliar o soro anti-cMoL/cMoL imobilizado no eletrodo

MOF/platina na presença de D-galactose nas concentrações de 5, 10 e 15 mM em solução de NaCl 0,15 mol/L como meio eletrolítico. A célula eletroquímica foi montada com o eletrodo de platina revestido com soro anti-cMoL/cMoL, adsorvido no MOF [Cu3 (BTC) 2H2O) 2] n (eletrodo de trabalho modificado = Pt/MOF/ anti-cMoL/cMoL soro), e o eletrodo de referência prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) Fig. 2, ambos conectados ao pHmetro (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) com cabo adaptado para leituras potenciométricas.

Figura 2 - Célula eletroquímica, contendo o eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho modificado, Pt/MOF/cMoL, ambos ligados a um medidor potenciométrico.

**Fonte:** o autor (2019).

### 2.5.4 Caracterização de cMoL imobilizado na superfície dos cristais da MOF

Caracterização realizada por meio da obtenção de imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), equipamento disponível no CENAPESQ/UFRPE.

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experiência foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0.05$.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método para produzir o gel de guar, aplicado neste trabalho, seguiu o protocolo proposto por Appukutan et al. (1977) e teve como objetivo simplificar etapas da técnica aplicada

anteriormente, pelo método de Gupta et al. (1979) neste, a reação entre a goma de guar e a epicloridrina ocorreu em meio água: 2-propanol, sob atmosfera de nitrogênio. O método simples de obtenção do gel de guar, eliminou algumas etapas entre as quais a adição do nitrogênio e a substituição de equipamentos complexos, pelo uso da estufa para aquisição da temperatura para a reação. O gel de guar que compôs a matriz de cromatografia de afinidade para purificar cMoL, possibilitou a obtenção de 213 mg de cMoL específico de galactose a partir de 50 g de sementes de *M. oleifera* em pó. A cMoL purificado apresentou características de lectina previamente isolada, como por exemplo é uma proteína de carga positiva, resistente a temperaturas elevadas e pH em ampla faixa e não é uma glicoproteína. cMoL AH (1.024) foi totalmente inibido pela azocaseína, resultado semelhante ao obtido por SANTOS et al., (2009).

A cMoL purificada da fração de proteínas, obtidas após o tratamento do extrato com sulfato de amônio. Fig. 3A mostra o perfil cromatográfico, que mostrou um material não retido sem AH (P1) e um único pico de proteína adsorvida (P2) eluída com NaCl 1,0 M e contendo um AH específico de 2.572. Obteve-se 6, 07 vezes de purificação para P2 (Tabela 1) capaz de aglutinar eritrócitos humanos dos tipos A, AB e O, com AH específico de 162,5, 650,2 e 325, respectivamente. P2 mostrou uma única banda polipeptídica em PAGE para proteínas básicas nativas, indicando a homogeneidade da proteína (Fig. 3B); nenhuma banda foi observada em eletroforese para proteínas ácidas. O SDS-PAGE desnaturado revelou duas bandas polipeptídicas com uma massa molecular aparente de 19 e 26,5 kDa (Fig. 3C); além disso, nenhuma banda foi detectada com o reagente de Shiff.

A eletroforese bidimensional (Fig. 3D) mostrou subunidades de peso molecular de 29,85 e 19,68 kDa, spots principais e 35,18, 23,12 e 17 kDa spots secundários, todos eles mostraram um ponto isoelétrico de 9,8. Um spot com peso molecular aproximado de 29,3 kDa e pI 6,81, também foi observado. As proteínas provavelmente estavam agregadas nas duas bandas principais que foram mostradas em SDS-PAGE. Segundo Junior et al (2013) A eletroforese bidimensional apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas, enquanto pelo método unidimensional como, SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepor. A cMoL previamente purificada e parcialmente caracterizado por Santos et al. (2009) e Luz et al. (2013) foi descrito como uma proteína básica com uma única banda polipeptídica de 26,5 kDa em SDS-PAGE e duas bandas (14,9 e 26,5 kDa) na presença de um agente redutor. Além disso, cMoL revelou um pI teórico de 11,67 e mostrou maior capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos de coelho e humanos do tipo AB. Outra lectina solúvel em água de *M. oleifera* (WSMoL), uma glicoproteína ácida, apresentou atividade principal com células de coelho em pH 4,5, que foi inibida na presença de frutose, suína e tireoglobulina (SANTOS et al 2005);

WSMoL revelou subunidades com 30, 20 e 10 kDa e pI 5,5 (MOURA et al., 2016). WSMoL foi purificado por um protocolo simples usando cromatografia de quitina e identificado como outro coagulante de semente de lectina com atividades antibacterianas (FERREIRA et al 2011). WSMoL e cMoL mostraram atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (COELHO et al 2009) e *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA et al 2011), respectivamente. Katre et al. (2008) descreveu a lectina de *M. oleifera*, MoL, uma glicoproteína altamente estável que aglutina eritrócitos humanos e de coelho com uma massa molecular de 14 kDa e subunidades (7, 1 kDa) ligadas por ligações dissulfeto.

A estabilidade conformacional do cMoL foi avaliada após incubação em diferentes temperaturas e valores de pH. A sonda Bis-ANS foi usada para monitorar mudanças nas bolsas hidrofóbicas da estrutura cMoL. A lectina liga-se ligeiramente ao bis-ANS em seu estado nativo, mas quando aquecida, houve um aumento na intensidade de fluorescência do bis-ANS, com um aumento de 10 vezes na amostra incubada a 100°C (Fig. 4A), sugerindo que o aquecimento leva à exposição de aglomerados hidrofóbicos de cMoL. Luz et al. (2013) relataram que o aquecimento causou alterações na estrutura secundária do cMoL, com aumento no teor estimado de estruturas desordenadas a 100ºC. É possível que as modificações nas estruturas secundárias leve à exposição de aminoácidos hidrofóbicos e consequente agregação de moléculas cMoL, resultando em aumento da fluorescência do bis-ANS. No entanto, as mudanças não refletiram a perda da capacidade de ligar carboidratos; a AH não foi alterada quando a lectina foi aquecida entre 30 e 100°C. A Figura 4B mostra a fluorescência do bis-ANS quando incubado com cMoL em soluções em diferentes valores de pH. Diferenças na intensidade de fluorescência foram observadas, embora não tenha havido alteração no comprimento de onda máximo de emissão. cMoL manteve a AH para as amostras incubadas em pH 4,0, 8,0 e 12,0, confirmando que a lectina é resistente a uma ampla faixa de pH (SANTOS et al., 2009). Algumas lectinas mostram atividade em pH ácido, por exemplo, uma amostra de suco de lectina *Punica granatum* (PgTeL) apresentou maior intensidade de fluorescência do que bis-ANS quando incubada em pH 3,0 e maior atividade AH em pH 3,0-5,0 (SILVA et al., 2009). Outros estudos relataram que a desnaturação da proteína foi realizada para investigar sua estabilidade estrutural, correlacionando a conformação com a atividade biológica (DATTA et al., 2017; KAMEL et al., 2016). Estudos de mudanças conformacionais em lectinas promovidas por fatores ambientais, podem resultar em estratégia para um melhor aproveitamento da proteína (SUN et al., 2020).

cMoL mostrou ação bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, MIC, 50 μg/mL e 12,5 μg/mL, respectivamente (Tabela 2), e *Serratia sp.* e *Staphylococcus saprophyticus*; as cepas de *Bacillus subtilis* foram inibidas na concentração de 4 mg/mL de lectina. A lectina purificada não apresentou efeito bacteriostático contra *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outros estudos também relataram atividade antimicrobiana da lectina de sementes de *M. oleifera*. Ferreira et al. (2011) relataram que WSMoL inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* com MIC de 7,8 e 250 μg/mL, respectivamente. Moura et al. (2015) mostraram o efeito antibacteriano da mesma lectina contra *Bacillus pumilis*, *B. megaterium*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* e *S. marcescens* com CMI variando de 5,2 a 41,7 μg/mL. Lectinas isoladas de outras plantas demonstraram propriedades bacteriostáticas contra uma variedade de bactérias patogênicas (BRUSTEIN et al., 2012; PROCÓPIO et al., 2017; RUSAENG et al., 2017). Segundo os autores, essa ação está relacionada à ligação reversível aos glicoconjugados na superfície bacteriana levando à inibição do crescimento, aglutinação e alteração da permeabilidade celular (KAMELL et al., 2016; PROCÓPIO et al., 2017). cMoL apresentou atividade contra leveduras e fungos filamentosos (Tabela 2), *Candida krusei* (URM6391) com concentração de 4,0 mg/mL, contra *C. albicans* (URM5901) e *C. glabrata* (URM6392), 2,0 mg/mL, bem como em *C. tropicalis*, com um valor MIC de 62 μg/mL. A atividade fungicida foi detectada para *C. albicans* e *C. tropicalis* na concentração de 4 mg/mL. Fungos do mesmo gênero podem ter diferentes perfis de inibição, o que pode estar relacionado à especificidade das lectinas para as moléculas glicídicas presentes na parede celular do fungo, que são compostas predominantemente por uma matriz 1,3 e 1,6 β de glucanos e quitina, bem como glicoproteínas imersas e outros compostos (KOVALCHUCK et al., 2013; BLEACKLEY et al., 2019). Os glicanos expostos na superfície celular podem exibir diferentes respostas moleculares (código de açúcar) devido às variações anoméricas α e β e pontos de fixação durante a formação da ligação glicosídica (LUDWIG et al., 2019). As interações específicas entre as lectinas e esses carboidratos podem ter efeitos antifúngicos por diferentes mecanismos (PROCÓPIO et al., 2017). Por exemplo, a lectina foliar de *Calliandra surinamensis* é capaz de causar alterações na morfologia celular, danificando a parede celular e interferindo no processo de brotamento/ divisão das células de *C. krusei* (BRUSTEIN et al., 2012). Não houve inibição contra fungos filamentosos de *Sporothrix* e *Aspergillus fumigatus*. Um ensaio de inibição de lectina foi realizado com várias espécies de fungos incluindo *Aspergilus*, a atividade foi observada apenas contra fitopatógenos (VAZ et al 2010). Outro estudo relatou a inibição do crescimento de

*Aspergilus* por uma lectina específica da galactose (SILVA et al., 2014). Fungos dermatófitos também foram inibidos: (Tabela 2), *Microsporum gypseum* (URM6199) 512 µg/mL (50%), *Trichophyton rubrum* (URM5905) 2048 µg/mL (50%), *T. mentagrophytes* (URM6272) e *T. tonsurans* (URM5508) > 2048 µg/mL, *Epidermophyton* (URM4798) 2048 µg/mL (100%). Esses fungos causam infecções superficiais em humanos e assim como outros microrganismos, também apresentam resistência aos medicamentos convencionais, porém as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos medicamentos são menores do que nos tratamentos sistêmicos (KHURANA et al., 2019).

O anti-soro foi obtido após a inoculação de coelhos com cMoL, soro anti-cMoL foi avaliado pelo ensaio de imunodifusão quanto à capacidade de reconhecer a presença da lectina em preparações contendo cMoL. O soro coletado após a terceira inoculação foi capaz de reconhecer a lectina no extrato, na fração e na lectina pura, pois foram observadas linhas de precipitação (Fig. 5A). O anti-soro também interagiu com o WSMoL; nenhuma interação foi observada com Con A (Fig. 5A). O IgG anti-cMoL pode ser utilizado em ensaios imunológicos para o reconhecimento e caracterização funcional de proteínas homólogas nos vários tecidos de *M. oleifera*, segundo Santos et al (2009) a planta é considerada um bom modelo de comparação estrutural entre lectinas e potenciais formas moleculares. Além disso lectinas em sementes de leguminosas são abundantes, possuem múltiplas formas e ampla homologia (SHARON E LIS, 1989; CORREIA E COELHO, 1995; LAGARDA-DIAZ et al., 2017). Anticorpos obtidos por lectinas de sementes podem detectar e quantificar lectinas nos tecidos vegetativos da planta (RAMESHWARAM et al., 2009), nos resultados obtidos por Khurtsidze et al (2017), um anticorpo específico de uma lectina ligadora de galactose foi capaz de detectar lectinas, principalmente nas folhas jovens da planta e estas lectinas vegetais foram utilizadas em estudos investigativos sobre processos fisiológicos da planta. O soro também pode ser usado para investigar homologias em outras espécies vegetais e para revelar as reações cruzadas com outras lectinas de plantas (ASHFORD et al., 1982).

As etapas de produção do antissoro foram monitoradas pela avaliação do potencial eletroquímico que revelou a eficiência em diferentes inoculações em coelhos (Figura 5B), para MOF (339-387 mV), MOF / cMoL (384-400 mV), MOF / anti- soro (402-391 mV), MOF / anti-soro primeira inoculação (360-338 mV), MOF / anti-soro segunda inoculação (313-341 mV) e MOF / anti-soro terceira inoculação (304-326 mV). MOF e cMoL apresentaram perfil característico; soro sem lectina mostrou um potencial semelhante ao soro após a primeira

inoculação. A partir da segunda inoculação, iniciaram-se as alterações, com diminuição do potencial eletroquímico pelas amostras. Um sistema piezoelétrico registrou uma diminuição da frequência, quando uma lectina específica a galactose interagiu com o anticorpo específico, indicando um forte reconhecimento (SOUZA et al., 2019). Os dados confirmam os resultados da imunodifusão, uma vez que as variações ocorreram a partir das doses de reforço. Segundo Delahaut et al. (2017) melhores respostas à produção de IgG são obtidas a partir de doses de reforço. A obtenção de soros altamente específicos e com títulos elevados é relevante em pesquisas envolvendo anticorpos policlonais e para garantir um bom resultado, são necessárias técnicas de monitoramento. Talib et al. (2018) utilizaram o método ELISA para determinar o título de anticorpos policlonais nos diferentes estágios de desenvolvimento, em seus resultados houve uma maior absorbância a partir da terceira, quarta e quinta imunização. A produção de um anti-soro produzido contra a lectina de uma isoforma de *Cratylia mollis* foi monitorada por imunodifusão e o anticorpo purificado foi conjugado e avaliado por ELISA (CORREIA et al., 1995), Souza et al. (2019) detectaram, a partir da terceira imunização, uma linha de precipitação entre a lectina BmoLL e o soro anti-BmoLL de *Bauhinia Monandra*, pelo ensaio de imunodifusão. O comportamento e a especificidade de anticorpos também podem ser monitorados por métodos eletroquímicos. Rawat et al. (2017) desenvolveram um biossensor eletroquímico para avaliar a interação antígeno e anticorpo através da detecção de albumina de soro bovino (BSA). Um imunossensor específico para lectinas pode ter aplicações biotecnológicas (VARGOVÁ et al., 2016). De acordo com Souza et al. (2017) biossensores e imunossensores têm a vantagem como método, devido à sua miniaturização, baixo custo, alta sensibilidade e resultados rápidos. A cMoL inibida com galactose 5, 10 e 15mM, não interage com o anti-soro, principalmente nas concentrações de 10 e 15mM (Fig. 5C), provavelmente a interação entre a lectina e IgG ocorre pelo DRC. Nos resultados obtidos por Souza et al. (2019) não houve diferenças no potencial medido na presença ou ausência de galactose, os autores sugeriram que a interação BmoLL e IgG anti-BmoLL seria independente do local de ligação aos carboidratos. Ashford et al (1982) identificaram por imunodifusão a especificidade do soro de coelho imunizado com lectina de batata (*Solanum tuberosum*) e revelaram populações de anticorpos interagindo com porções distintas da molécula, com o sitio de ligação ao carboidrato e a porção glicosilada. Ensaios eletroquímicos têm sido úteis para caracterizar lectinas em especificidade por carboidratos (SOUZA et al ., 2003; SOUZA et al., 2019), a caracterização estrutural de locais específicos de ligação a carboidratos relacionados à atividade biológica em lectinas vegetais (SUN et al 2019), basearam-se na interface eletrodo/lectina imobilizada e sua interação com ligantes específicos (SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2019), que podem ser:

ligação com carboidratos, anticorpo antígeno, glicoproteínas séricas (SOUZA et al., 2017; TALIB et al 2018; SOUZA et al., 2019; SILVA et al., 2016) amplamente utilizadas em testes analíticos para determinações químicas e biológicas. Também podemos observar que o uso do MOF como suporte eletroquímico foi eficiente, pois cMoL e soro anti-cMoL imobilizados, mantiveram sua atividade. O uso de nanoparticulas em biosensores tem como objetivo um melhor desempenho pelos sistemas, através da associação ativa de biomoléculas com variados nanomateriais incluindo híbridos orgânicos (RAWAT et al., 2017; WANG et al., 2017). As MOFs são estruturas cristalinas formadas por redes coordenadas de metais e ligantes orgânicos, que se destacam por sua extensa área de superfície e a presença de poros com diâmetros ajustáveis (XUE-TING et al., 2019). Essas estruturas têm sido utilizadas em aplicações diversas, como por exemplo: catálise de reações químicas (PATHAN et al., 2011), adsorção de gases (XUE-TING et al., 2019) e também em sistemas eletroquímicos, na detecção de componentes neurotransmissores (ZHOU et al., 2020). A eficiência do sistema eletroquímico no reconhecimento e titulação dos diferentes estágios de produção de IgG anti-cMoL obtido em nossos resultados, demonstram uma nova perspectiva de monitoramento do processo envolvendo antígeno e anticorpo, utilizando um sensor como modelo para estudos direcionados em aplicações médicas, o sistema também pode ser ativado na investigação do procedimento físico-químico de lectinas, como também no campo da pesquisa ambiental no tratamento de poluentes, uma vez que as lectinas de *M. oleifera* já demonstraram atividade de remoção de impurezas de contaminantes em água (SANTOS et al., 2009; FREITAS et al., 2016).

## 5. CONCLUSÃO

O protocolo simples obteve gel de Guar com as características necessárias para interação com cMoL sendo, portanto, capaz de isolar a lectina que mostrou propriedades, bacteriostáticas, fungistáticas e fungicidas. A lectina foi imunogênica e o imunossensor desenvolvido foi eficiente caracterizar a interação cMoL/IgG anti-cMoL; de acordo com o sistema eletroquímico essa ligação ocorre através do domínio de reconhecimento ao carboidrato.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico as bolsas de pesquisa e bolsas (THN, PMGP e LCBBC). O BFO agradece à Fundação de Amparo

à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) as bolsas de pós-graduação (mestrado e doutorado).

## 5 REFERÊNCIAS

ASHFORD, D.; ALLEN, A. K.; NEUBERGER, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemical Journal**, v. 201, p. 641-645, 1982.

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLLA, A.; BACHHAWAT, B.K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v.14, n. 4, p. 382-384, 1977.

BATISTA, K. L. R. et al. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 225, p. 67–72, 2018.

BERTIN, D. et al. Monitoring of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel diseases: A comparison of three commercially available ELISA kits. **Cytokine**, v. 126, 154859, 2020.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, **Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166-1170, 1967.

BLEACKLEY, M. R. et al. The interaction with fungal cell wall polysaccharides determines the salt tolerance of antifungal plant defensins. **The Cell Surface**, v. 5, 100026, 2019.

BRUSTEIN, V. P. A. et al. novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, 315-322, 2012.

COELHO, L. C. B. B. et al. Protein purification by affinity chromatography. In: Rizwan Ahmad. (Org.). Protein Purification. **Rijeka: InTech**. p. 53-72, 2012.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/ pharmacological and therapeutic application. **Journal of Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2017, p. 21-22, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition. Wayne, PA, USA, 2008, Document M38-A2.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne, PA, USA, 2012, Document M27-S4.

COELHO, J. S. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1 from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

DATTA, D.; SWAMY, M. J. Fluorescence and circular dichroism studies on the accessibility of tryptophan residues and unfolding of a jacalin-related α-D-galactose-specific lectin from mulberry (*Morus indica*). **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v.170, p.108-117, 2017.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Academy of Sciences.** v. 121, p. 424-427, 2006.

DELAHAUT. P. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**. v.116, p. 4–1, 2017.

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

FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v.163, p.133–141, 2016.

GOODE, J.; DILLON, G.; Millner. P. A. The development and optimisation of nanobody based electrochemical immunosensors for IgG. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 234, p. 478–484, 2016.

GREEN, A. A.; HUGHES, W.L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, v.1, p.67-90, 1995.

GUPTA, K. C. Gel filtration medium derived from guar gum. **Journal of Chromatography**. v.169, p. 183-190, 1979.

JÚNIOR, R.Q.B. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7(2), p.100-112, 2013.

KAMEEL, N. I. A. et al. Conformational analysis of champedak galactose-binding lectin under different urea concentrations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 98, p. 57-63, 2016.

KATRE, U. V. et al. Structure-activity relation ship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromoles**. v. 42, p. 203-7, 2008.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: recent trends and therapeutic implications. **Fungal genetics and biology**, v. 132, 103255, 2019.

KHURTSIDZE, E. et al. Galactose-binding lectin from mulberry (*Morus alba* L.) seeds with growth hormone-like activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 26–30, 2017

KOVALCHUK, S. N. et al. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1320–1324, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. **ILAR Journal**. v. 46, p. 269-279, 2005.

LOWRY, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Jounal of Biological Chemistry**. v. 193, 265-275, 1951.

LU, X. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis for soybean protein and its application. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 3, p.100-109, 2020.

LUDWIG, A. K. H. Lectinology 4.0: Altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. **General Subjects**. v. 1863, p. 935-940, 2019.

LUZ, L. A. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 58, p. 31-36, 2013.

LUZ, L. A. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in vitro**. v. 44, p. 94-99, 2017.

RAWAT, A. et al. Highly sensitive gold nanoparticle based electrochemical biosensor for detection of Antigenantibody interactions. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 10, n.1, p. 85-92, 2017.

SANTOS, A. F. S. Strategies to obtain lectins from distinct sources. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 63, p. 33-60, 2013.

SANTOS, A. F. S, *Moringa oleifera*: Resource management and multiuse life tree. Journal of Advanced Research. v. 4, n. 6, p. 388-402, 2015.

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

OLIVEIRA, C. F. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 498-504, 2011.

SILVA, P. M, PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal Biological Macromoles**. v. 108, p. 391-400, 2018.

REGENTE, M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**. v. 69, p. 88-95, 2014.

MOURA, M.C. Water-soluble lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal Applied of Microbiology**. v.119, n. 3, 666-676, 2015.

MOURA, K. S. Coagulant activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1361-1371, 2016.

MOURA, M. C. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus sp*.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v.123, p. 861-874, 2017.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 55, p. 261-273, 1992.

PALHARINI, J. G *Eutirucallin*: a lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular in Infection Microbiology**, v.7, p. 1-13, 2017.

PROCÓPIO, T. F. 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.

PROCÓPIO, T. F. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological of Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

REISFELD, R.A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**. v.195, p. 281-3, 1962.

RUNSAENG,P.; Puengyan, P.; Utarabhan, P. A. mann-specific type C lectin of *Fenneropenaeus merguiensis* exhibited antimicrobial activity to mediate the innate immunity of shrimp. **Molecular Immunology**, v. 92, 87-98, 2017.

SANTOS, A. F. S. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. Water Research. v. 39, p. 975-80, 2005.

SILVA, H. C. BUL: A novel lectin from *Bauhinia ungulata L.* seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 203–209, 2014.

SILVA, P. M. S. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p.171-177, 2016.

SILVA, G. G. F. Metal – organic framework: structure and magnetic properties of [ $(Cu_3(BTC)_2(L)x(CuO)y]n$ (L=$H_2O$, DMF). **Journal of Solid State Chemistry**, v. 253, p. 1-15, 2017.

SILVA, R. P. et al. Adsorção de corantes têxteis utilizando a estrutura metal-orgânica $[Cu_3(BTC)_2(H2O)_3]_n$ obtida por síntese eletroquímica. **Acta Brasilienses**, v. 2, p. 11-14, 2018.

SIRITAPETAWEE, J. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1846–1854, 2018.

SOUZA, S. R. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 255–258, 2003.

SOUZA, S. R. *Bauhinia Monandra* Leaf Lectin (BmoLL) is Immunogenic: Electrochemical and Piezoelectric Biosensor Recognized Lectin/IgG Anti-BmoLL Interactions (2019).

SOUZA, S. R. Electrochemical Evaluation of Interactions from *Cratylia mollis* Seed Lectin with Inhibitor Carbohydrate. In: Francisco Cruz Sosa. (Org.). Advances and Trends in Biotechnology and Genetics Vol. 1. 01ed.USA: Book Publisher International, p. 01-200, 2019.

SUN, X. A novel oriented antibody immobilization based voltammetric immunosensor for allergenic activity detection of lectin in kidney bean by using AuNPs-PEI-MWCNTs modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, 111607, 2019.

SUN, X. et al. Combined effects of pH and thermal treatments on IgE-binding capacity and conformational structures of lectin from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 329, 127183, 2020.

TALIB, N. SALAM, F. SULAIMAN, Y. Development of Polyclonal Antibody against Clenbuterol for Immunoassay Application. **Molecules**. v. 23, 789, 2018.

TRAN, V.V. Development strategies of conducting polymer-based electrochemical biosensors for virus biomarkers: Potential for rapid COVID-19 detection, Biosensors and Bioelectronics, v. 182, 113192, 2021.

VARGOVÁ, V. Electrochemical sensing of concanavalin A and ovalbumin interaction in solution. **Analitica Chimica Acta**, v. 935, p. 97–103, 2016.

VAZ, A. F. M. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, p.1507–1513, 2010.

Tabela 1 - Resumo da purificação cMoL isolada utilizando o gel de guar preparado por Appukutan et al (1977).

| Amostra | Proteina (mg/mL) | AH | AHE | Purificação (vezes) |
|---|---|---|---|---|
| Extrato salino | 9.68 | 4096 | 423.14 | 1.0 |
| Fração precipitada | 1.9 | 2,048 | 1,077 | 2.5 |
| P2 (cMoL) | 0.398 | 1024 | 2,572 | 6.07 |

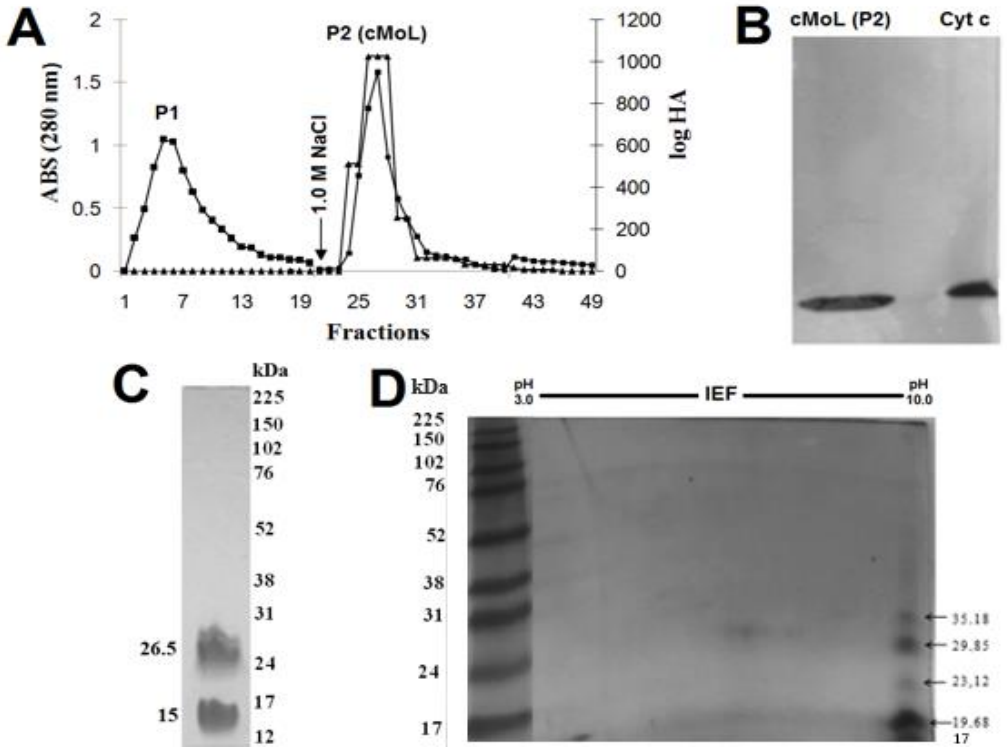
AH: Atividade Hemaglutinante. cMoL correspondeu a P2 da cromatografia de afinidade, como mostrado em Figura 1A. P1 não apresentou AH.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana do cMoL contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

| Fungos | **$CIM_{50}$** | **CMF/CMB** |
|---|---|---|
| *Enterococcus faecalis* | 50 | ND |
| *Echerichia coli* | 12 | ND |
| *Candida albicans* | 2000 | 10000 |
| *C. krusei* | 4000 | ND |
| *C. tropicalis* | 62 | 10000 |
| *C. glabrata* | 2000 | ND |
| *Sporothrix shenkii* | ND | ND |
| *Aspergillus fumigatus* | ND | ND |
| *Myccrosporum gypseum* | 512 | ND |
| *Trichophyton rubrum* | 2048 | ND |
| *T. Mentagrophytes* | 2048 | ND |
| *Epidermophyton* | 2048 | ND |

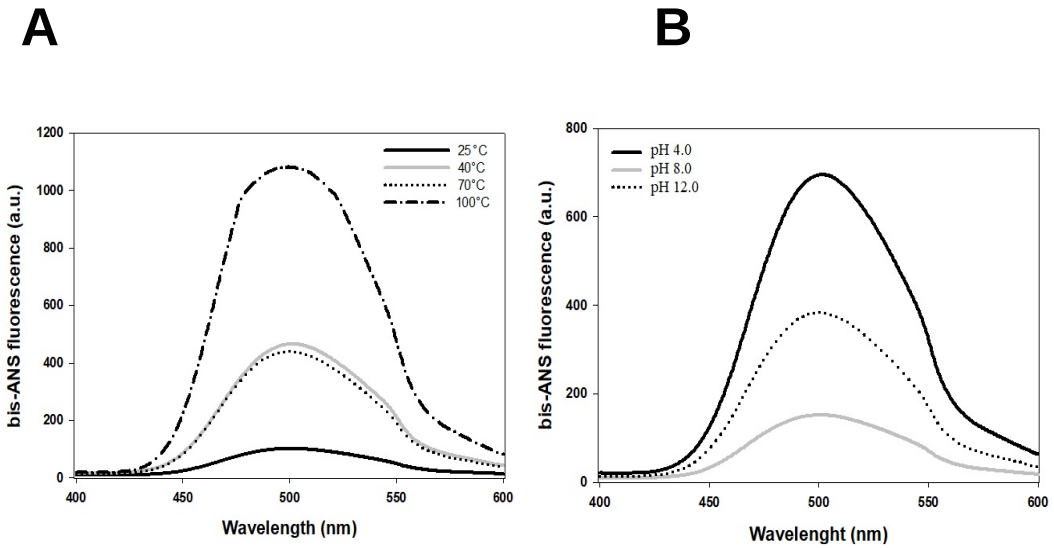
Valores de Concentração Mínima Inibitória ($MIC_{50}$) e Concentração Bacteriana/Fungicida Mínima (CMF / CMB) expressos em (μg/mL). ND: não determinado.

Figura 3 - Purificação da lectina coagulante *Moringa oleifera* (cMoL) isolada utilizando o gel de guar preparado por Appukutan et al (1977).



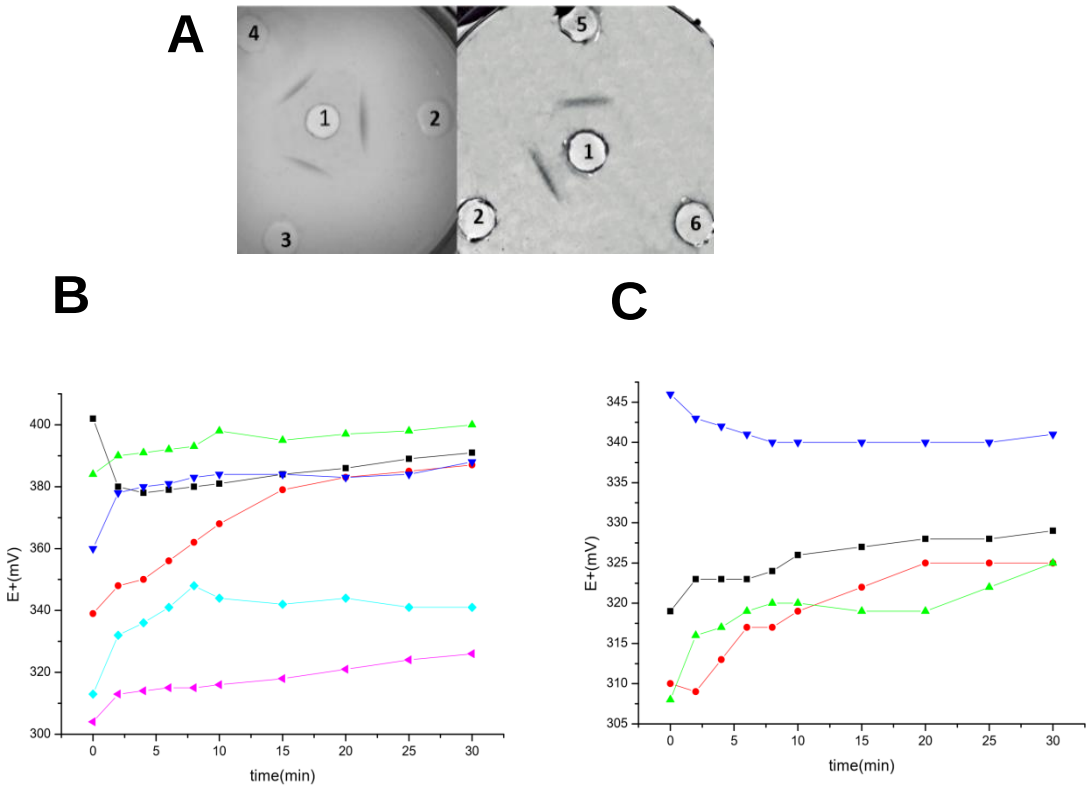

**Legenda -** (A) Cromatografia de afinidade da fração precipitada (10 mg de proteína) em coluna de gel de guar. A etapa de lavagem usou NaCl 0,15 M; cMoL (0,4 mg) foi eluído com NaCl 1,0 M, correspondendo ao pico P2. Recolheram-se fracções de 2,0 mL. (■) Absorbância a 280 nm. (▲) log HA. (B) PAGE para proteínas básicas nativas de cMoL (P2) e o citocromo c padrão. (C) SDS-PAGE (12%, p / v) de cMoL (25 μg) e marcadores de massa molecular, Coomassie Brilliant Blue foi usado na coloração; a reação foi negativa com o reativo de Schiff. (D) Eletroforese bidimensional de cMoL.

Figura 4 - Análise das mudanças conformacionais em cMoL após aquecimento e incubação em diferentes valores de pH.




**Legenda -** (A) Fluorescência de bis-ANS incubado com cMoL previamente aquecido a 25, 40, 70 ou 100°C. (B) Fluorescência de bis-ANS incubado com cMoL em valores de pH de 4,0, 7,0 ou 12,0.

Figura 5 – Imunodifusão em gel de agarose e potencial eletroquímico




**Legenda – (A)** Imunodifusão dupla em gel de agarose revelando a reação positiva (linha de precipitação) entre IgG anti-cMoL (1) e cMoL purificado (2), fração de proteína precipitada (3), extrato salino (4) e WSMoL (5); nenhuma reação foi detectada com Con A (6). **(B)** Potencial Eletroquímico de MOF [Cu3 (BTC) 2 (H2O) 3] e fixado a um eletrodo de platina com pasta de carbono obtida pela mistura de carvão em pó e óleo mineral. A solução salina foi usada como meio eletrolítico. MOF, MOF/cMoL, MOF/IgG anti-cMoL, MOF/IgG anti-cMoL primeira inoculação/cMoL, MOF/IgG anti-cMoL segunda inoculação/cMoL, MOF/IgG anti-cMoL terceira inoculação/cMoL. **(C)** Potencial eletroquímico de MOF, cMoL e IgG anti-cMoL em galactose. A solução salina foi utilizada como controle no meio eletrolítico. Para avaliação, o anticorpo da terceira aplicação foi imobilizado e testado na presença de cMoL em diferentes concentrações de galactose 10, 15 e 20mM. MOF/IgG anti-cMoL/cMoL em NaCl 0,15M IgG anti-cMoL/cMoL em NaCl 0,15M e 10Mm de galactose, IgG anti-cMoL /cMoL em NaCl 0,15M e 15Mm de galactose, IgG anti-cMoL/cMoL em NaCl 0,15M e 20Mm de galactose.

# 4 ARTIGO 2

## CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA* (CMOL) E APLICAÇÃO NO CONTROLE DE CORANTES PRESENTES EM EFLUENTES DE INDÚSTRIA TÊXTIL DEGRADADOS POR UMA NOVA METODOLOGIA, UMA ABORDAGEM ELETROQUÍMICA

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO**

**Anais da Academia Brasileira de Ciências**

**Caracterização da (cMoL) Lectina Coagulante de Sementes de *Moringa oleifera* e aplicação no controle de corantes presentes em efluentes de indústria têxtil degradados por uma nova metodologia, uma abordagem eletroquímica**

Benny Ferreira de Oliveira, Eloisa Ferreira Neves, Thiago Henrique Napoleão, Patrícia Maria Guedes Paiva, Kátia Cristina Silva de Freitas, Sandra Rodrigues de Souza, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho *

Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Autor correspondente.

Endereço de e-mail: lcbbcoelho@gmail.com (L.C.B.B. Coelho)

**Resumo**

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a lectina coagulante de semente de *Moringa oleifera* (cMoL) por métodos eletroquímicos: Potenciometria, voltametria e microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando a estrutura metal orgânica MOF de $[Cu_3(BTC)_2(H_2O)_3]n$ como suporte eletroquímico para imobilizar cMoL. Além disso, uma metodologia utilizando uma bateria de alumínio-ar foi desenvolvida para degradação do corante índigo carmim, utilizando um corante sintético com formulação assemelhada ao efluente têxtil; um biosensor investigou a interação de cMoL com o carboidrato específico e utilizou a lectina como bioativo para monitoramento da concentração residual do corante. A lectina purificada mostrou variações de potencial eletroquímico relacionado à mudança de carga da lectina adsorvida na superfície do eletrodo e no contato com a galactose. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou características de cMoL e de cada componente das etapas de montagem do eletrodo. Os resultados das reações de óxido redução da bateria de alumínio gerou o composto químico $Al(OH)_{3(s)}$ capaz de coagular o corante na solução em cada recipiente, e esse sistema gerou um potencial de 3,99V, aplicado na eletrólise do sistema formado pelo béquer e eletrodos de ferro, promovendo uma eletrocoagulação do corante. A voltametria cíclica mostrou picos diferenciados de óxido-redução relacionados à quantificação dos resíduos por cMoL. O sistema eletroquímico foi capaz de caracterizar cMoL avaliando a interação com

o ligante, o novo método foi eficiente para degradar o corante; o biossensor poderá ser utilizado para caracterização estrutural de lectinas bem como sítios de ligação aos carboidratos e também pode ser aplicado no monitoramento de resíduos de corantes em efluentes têxteis.

**Palavras chave:** lectinas, cMoL, *Moringa oleifera*, MOF, efluentes têxteis, sistemas eletroquímicos.

# 1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que possuem sítios de ligação aos carboidratos, podendo reconhece-los de forma específica e reversível, desta forma, possuem aplicações bioquímicas, biomédicas e biotecnológicas (Coelho et al., 2017). Elas estão amplamente distribuídas na natureza nos tecidos diversos dos organismos e podem aderir aos carboidratos presentes na membrana ou parede celular aglutinando células, reconhecendo gliconjugados e glicanos complexos (Santos et al., 2013).

*M. oleifera* é uma árvore polivalente (Santos et al., 2012; Santos et al., 2015; Raman et al., 2018) com propriedades terapêuticas para usos medicinais alternativos (Soliman et al., 2020). Extratos de suas sementes mostraram eficiência na remoção do ácido húmico em comparação ao componente químico utilizado habitualmente (Santos et al., 2012) e também possui proteínas coagulantes utilizadas no tratamento de água e na remoção de resíduos industriais (Shan et al., 2017).

Uma das moléculas coagulantes de sementes *Moringa oleifera* (cMoL), é uma lectina catiônica, específica de galactose, mostrou ser resistente ao pH amplo e altas temperaturas, a lectina foi parcialmente caracterizada, mostrou perfil molecular de 26,5 KDa; ponto isoelétrico aproximado 11,67; 101 aminoácidos (Santos et al., 2009) e apresentou as seguintes atividades biológicas: anticoagulante (Luz et al., 2013), inseticida (Oliveira et al., 2011), antiparasitária (Medeiros et al 2020), citotoxicidade para células tumorais (Luz et al., 2017) e remoção da turbidez da água de forma semelhante ao tratamento com sulfato de alumínio (Santos et al., 2009).

Os métodos eletroquímicos são sensíveis, financeiramente viáveis, rápidos e possuem uma variedade de estilos instrumentais e componentes (Souza et al., 2019). Esses ensaios têm sido úteis para detectar uma diversidade de analitos (Andrade et al., 2011; Doménech-Carbó et al., 2016; Ejeian et al., 2018). Sistemas potenciométricos e amperométricos detectam através de sinais elétricos mensuráveis, mudanças conformacionais de biomoléculas quando em contato com um ligante ou alterações no meio eletrolítico, correlacionando a distribuição de carga e função biológica (Santana et al., 2012).

A coagulação corresponde a primeira etapa de tratamento de água, nas redes de abastecimento, é utilizada para uma diminuição da turbidez e coloração, bem como a eliminação

de patógenos (Santos et al., 2014). Um dos métodos promissores com esta finalidade é a eletrocoagulação, que consiste em um método alternativo ao tratamento químico, ocorre pela desestabilização de partículas poluentes através processos redox, promovidos por uma corrente elétrica aplicada na célula eletroquímica, o sistema é composto por eletrodos metálicos, que podem ser de Ferro ou Alumínio solução eletrolítica, a reação gera substâncias coagulantes, que podem ser hidróxidos metálicos ou polihidróxidos, responsáveis pela floculação dessas partículas, que flutuam na superfície (Kothai et al., 2020).

MOFs são estruturas bidimensionais ou tridimensionais, que formam redes de coordenação com centros metálicos e ligantes orgânicos, que se destacam por suas qualidades, como presença de poros ajustáveis e ampla área de superfície e tem mostrado diversas aplicações como separação de gases, purificação de moléculas, encapsulamento de drogas. (Ahmad et al., 2015).

Neste trabalho cMoL foi caracterizada por métodos eletroquímicos: potenciometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso um biossensor foi projetado utilizando cMoL imobilizada no polímero metal orgânico MOF $[Cu_3(BTC)_2(H_2O)_3]n$, com o objetivo de monitoramento residual do corante índigo carmim que simula um efluente têxtil, degradado por eletrocoagulação.

# 2 MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 Isolamento de lectina

O extrato obtido da semente de *M. oleifera* em pó e solução salina, foi adicionado com sulfato de amónio a 60% (p/v) de saturação de acordo com Green e Hughes (1955). A fração precipitada (F 0-60%) foi coletada, ressuspendida e dialisada contra água destilada (4 h, com duas trocas líquidas); depois adicionada numa coluna (10 x 1,0 cm) contendo o gel guar (Appukutan et al., 1977), equilibrado com NaCl a 0,15 M. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas relatadas por Santos et al. (2009) para purificar a cMoL. Foi mantida uma taxa de fluxo de 20 mL/h e, após um passo de lavagem com a solução de equilíbrio, as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl 1,0 M. Frações de 2,0 mL foram recolhidas e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e AH. A concentração de proteína foi estimada pelo método de Lowry et al (1951) e o ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi utilizado para avaliar a capacidade de ligação de carboidratos da lectina, de acordo com Paiva e Coelho (1992).

## 2.2 Avaliações eletroquímicas de cMoL imobilizado na superfície do eletrodo MOF/Platina

### 2.2.1 Síntese do Metal-Organic Framework - MOF de [Cu3(BTC)2.(H2O)3]n

A MOF [$Cu_3$(BTC)2. ($H_2O)_3$]n é um polímero poroso e cristalino composto por um centro metálico, dímeros de cobre (dois íons de cobre II) e a unidade de roda de pás formada por quatro ânions carboxilato dos ligantes BTC-. Foi sintetizada por via eletroquímica utilizando a amperometria no laboratório de eletroquímica do DQ/UFRPE de acordo com o método desenvolvido por Silva et al. (2018) utilizando uma solução de ácido 1,3,5-benzenotricarboxilico, nitrato de sódio e dimetilformamida em água Mllipore numa razão de 1:1. A síntese durou cerca de 17 min.

### 2.2.2 Confecção do eletrodo de referência

O eletrodo de referência é composto por um fio de prata (Ag). Parte deste fio, é recoberto com cloreto de prata (AgCl) e esta, foi inserida numa ponteira plástica contendo solução condutora saturada de KCl 3mol/L.

### 2.2.3 Lavagem e preparação do eletrodo de trabalho

O eletrodo constitui-se como uma placa de platina de área 0,5 cm2. Antes de ser montado, o mesmo sofre lavagem química com imersão numa solução de ácido nítrico ($HNO_3$) P.A durante 2 minutos, em seguida foi lavado com água destilada e secagem a temperatura ambiente. Para fixar a MOF/cMoL no eletrodo de platina foi utilizado uma pasta composta por 0,0650g de carbono em pó e 6 gotas de óleo mineral, para construção do eletrodo de trabalho modificado, Pt/MOF/cMoL**.**

### 2.2.4 Imobilização e Pontenciometria

No processo de imobilização da lectina na MOF $[Cu_3(BTC)2(H_2O)_3]n$, foi realizada a pesagem de 0,0060g desse polímero e a adição de 20 µl de cMoL 3mg/L, em uma temperatura de 4°C durante 24h.

Após a montagem do eletrodo de trabalho nas condições mencionadas acima e no item 4.2.3, foram feitam as medidas dos potenciais eletroquímicos das seguintes etapas:

1) Eletrodo de Platina com MOF (Pt/MOF);
2) Eletrodo de platina com Pt/MOF/cMoL com NaCl 0,15M no meio eletrolítico;
3) Pt/MOF/cMoL com NaCl 0,15M e diferentes concentrações de galactose: 10, 15 e 20mM.

O eletrodo de platina juntamente com eletrodo de referência prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e a solução salina no meio eletrolítico, compõem a célula eletroquímica, esse sistema foi ligado ao potenciômetro com cabo adaptado para leituras potenciométricas.

## 2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização foi realizada através da obtenção de imagens no Microscópico Eletrônico de Varredura (MEV), Marca: TESCAN, Modelo: VEGA3, equipamento disponível CENAPESQ/UFRPE.

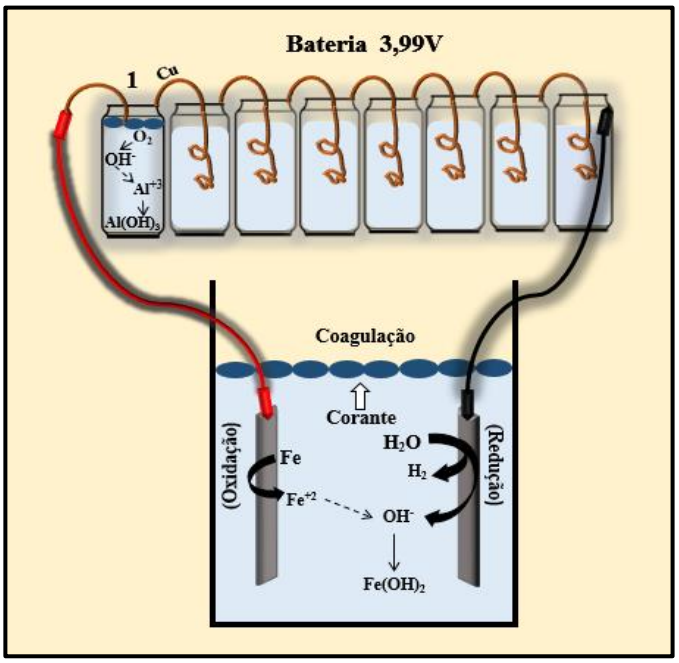
## 2.4 Eletrocoagulação (EC)

Para a construção da bateria de alumínio foram utilizados os seguintes reagentes e materiais: corante para tecido do índigo-carmim na concentração 0,1 g/L-1 que simulou um efluente têxtil, para o controle de cargas o NaCl foi adicionado na solução, recipiente de alumínio e fios de cobre de 1m de comprimento por 2,5mm de espessura.

Os componentes da célula eletroquímica foram eletrodos de ferro (sacrifício) e solução eletrolítica, contendo a mesma solução da bateria de alumínio.

O sistema foi conectado pela fonte de energia externa (bateria de alumínio) composta por pilhas, cujo os eletrodos foram os recipientes de alumínio (ânodo) e os fios de cobre (cátodo), essas pilhas foram ligadas em série, no qual o fio de cobre foi inserido no interior de cada recipienteligando a recipiente seguinte. O potencial foi medido ligando o terminal positivo do multímetro no primeiro fio de cobre, e o terminal negativo no último recipiente e foi equivalente à soma do potencial de cada pilha Fig 1.

Figura 1 - Sistema eletroquímico mostrando mecanismo de eletrocoagulação.




**Legenda:** Sistema eletroquímico mostrando mecanismo de eletrocoagulação. O recipiente com o número 1, está exemplificando os detalhes das reações em cada recipiente.

## 2.5 Voltametria cíclica

Foi realizada a caraterização eletroquímica por voltametria cíclica no potenciostato/galvanostato da Autolab Eletrochemical Instruments, localizado no Laboratório de Análises Químicas e Sensores –LAQIS/UFRPE. Na medição utilizou-se o eletrodo de referência Ag/AgCl, um fio de platina como contra eletrodo e o eletrodo de trabalho modificado Pt/MOF/cMoL inseridos em amostras contendo corante do tipo índigo-carmim após o tratamento com os recipientes de alumínio. O tratamento da solução com corante, nos recipientes de alumínio teve duração de 1h.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as medidas potenciométricas utilizando o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, ambos imersos em solução de NaCl 0,15mol/L e acoplados a um medidor potenciométrico. Verificou-se o potencial eletroquímico em todas as fases deste sistema analítico (Fig. 2). Os potenciais eletroquímicos mais elevados, resultam da interação entre cMoL imobilizada no eletrodo de platina revestido com MOF (Pt/MOF/cMoL) e as diferentes concentrações de galactose, revelando que essas alterações são resultantes das intrínsecas mudanças conformacionais ocorridas na superfície da lectina imobilizada. Um

comportamento semelhante foi observado em uma lectina adsorvida em esferas de nafion na presença do carboidrato (Souza et al., 2003). O desempenho biológico de uma lectina correlacionando as modificações estruturais e distribuição de cargas superficiais foi elucidado por potenciometria (Santana et al., 2012). Os potenciais redox de uma camada adsorvida podem revelar dados característicos sobre seu estado de equilíbrio, através dos métodos eletroquímicos, a interface de moléculas com cargas elétricas, adsorvidas na superfície do eletrodo pode ser avaliada de forma simplificada (Souza et al., 2001) além disso, o potencial eletroquímico de uma molécula diz respeito a carga distributiva de sua superfície quando exposta a um campo elétrico (Souza et al., 2003) e a investigação da região da dupla camada elétrica de interfaces é relevante para o entendimento dos mecanismos de interações biológicas de lectinas (Souza et al., 2001).

A imobilização da cMoL na estrutura metal-orgânica [Cu3(BTC)2.(H2O)3]n foi eficiênciente e facilitou a obtenção dos potenciais eletroquímicos, mostrando que a utilização do sistema eletroquímico com eletrodo de trabalho modificado poderá ser aplicado para estudo da interação dessa lectina com o corante do tipo índigo. Em eletroquímica de moléculas biológicas, um biossensor é considerado eficiente, quando o elemento biológico imobilizado não sofre desnaturação mantendo, portanto, sua atividade (Abreu et al., 2017). A imobilização de lectinas para o reconhecimento de açúcar oferece mais vantagens entre os sistemas bioespecíficos proteínas/carboidratos por não sofrer alterações estruturais, após as ligações e além disso podem fornecer domínios de ligação aos carboidratos independentes (Li et al., 2011).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a MOF e investigar a sua interação com a cMoL e galactose Fig 3. A característica geométrica dos cristais da MOF Cu-BTC está representada por uma estrutura octaédrica lisa, de tamanho aproximado 2 μm. A Fig. 3B mostra a galactose aderida na superfície da MOF, na Fig. 3C uma estrutura globular de cMoL aderida na superfície da MOF e o sistema completo MOF/cMoL/galactose está representado na fig.3D.

Para o tratamento dos residuos de corante nas pilhas de alumínio, como mostra o mecanismo de eletrocoagulação esquematizado na Fig 1. No cátodo da pilha o oxigênio dissolvido na água sofre redução na superfície do cobre formando hidroxila. No ânodo, o alumínio sofre oxidação liberando $Al^{3+}$ os quais, reagem com a hidroxila para formar $Al(OH)_{3(s)}$, um precipitado branco responsável pela coagulação do corante contido na solução, conforme as seguintes equações:

Ânodo: $Al_{(s)} \longrightarrow Al_3+_{(aq)} + 3e^-$, $E^0 = -1,66$ V (1)

Cátodo: $O_2 + 2H_2O + 4\ e^- \rightarrow 4OH^-$, $E^0 = 0{,}82$ V (2)

Reação Global: $Al_{(s)} + 3OH^- \rightarrow Al(OH)_{3\,(s)} + 3e^-$, $E^0 = 2.30$ V (3)

O potencial gerado pela bateria foi equivalente a 3,99V e possibilitou a eletrólise para tratamento de novas amostras de corante no sistema formado pelo béquer e eletrodos de ferro (Figura 1). O recipiente é o ânodo na bateria porque ela sofre a oxidação, os elétrons formados nessa oxidação percorrem o fio externo até o eletrodo de ferro que promoverá a redução da água formando hidróxido (OH-) e hidrogênio ($H_2$), enquanto que no eletrodo de ferro, conectado ao fio de cobre, ocorreu a oxidação do ferro formando $Fe^{2+}$ os quais, reagem com o hidróxido para produzir $Fe(OH)_2$, um precipitado gelatinoso capaz de coagular o corante contido na solução (Figura 4 A e B).

$Fe_{(s)} \rightarrow Fe^{2+}_{(aq)} + 2e^-$ (4)

$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$ (5)

Foi medido o pH das amostras com corante para verificar a formação de hidróxidos na solução (Tabela 1).

Tabela 1 - Medição do pH das amostras.

| **Amostras com corante** | **pH** |
|---|---|
| Amostra sem tratamento | 5,97 |
| Amostra após tratamento com eletrodo de alumínio | 6,24 |
| Amostra após tratamento com eletrodo de ferro | 7,01 |

Medição do pH das amostras antes do tratamento e após o tratamento eletroquímico, com eletrodos de ferro e alumínio.

Observou-se um aumento do pH das amostras após o tratamento, autores sugerem que essa elevação no pH ocorre devido a evolução do hidrogênio no cátodo (Meneses et al., 2011). As técnicas comumente aplicadas no tratamento de efluentes possuem um custo elevado, além da adição de componentes químicos, em vista disso a busca por novos métodos para o tratamento de água tem sido realizada (Criado et al., 2020). Métodos de eletrocoagulação (EC) são mais vantajosos do que outros tratamentos, pois utilizam uma simples instrumentação, possuem fácil manuseio, além disso o lodo residual formado pode ser retido com mais facilidade, devido a sua constituição por óxidos/hidróxidos metálicos (Kalivel et al., 2020), portanto esta técnica é bastante utilizada na remoção da cor e descontaminação do efluente (Hendaoui et al., 2020). Apesar disso o método apresenta algumas limitações, como consumo

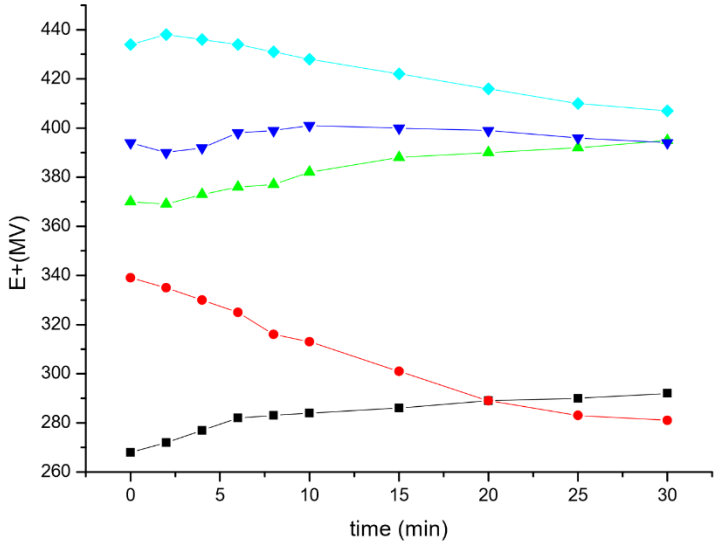
de energia elétrica, então tem-se investigado novas alternativas de aprimoramento (Özyonar et al., 2020), como no exemplo do trabalho o sistema composto por recipientes de alumínio gerando energia para ativar a reação de degradação do corante, representa, portanto, uma importância ciêntifica, econômica e ambiental.

Para identificar a ocorrência de interação entre cMoL e o corante do tipo índigo-carmim foi realizada a voltametria cíclica Fig. 5. Através do voltamograma observou-se a eficiência do tratamento devido à diferença nos picos redox, no qual houve uma diminuição nos picos da corrente nas amostras tratadas, indicando que cMoL foi capaz de monitorar os resíduos antes e após o tratamento. Não foi verificada diferença relevante entre as amostras tratadas nas pilhas de alumínio ou após a eletrólise. Em um estudo anterior, cMoL mostrou capacidade coagulante para remoção de impurezas em águas turvas (Santos et al., 2009), porém é a primeira vez que este mecanismo da lectina permitiu sua aplicação em um biosensor eletroquímico no controle de resíduos de efluentes. O método de eletrocoagulação foi eficiente na remoção de corantes, indicando uma possibilidade de utilizar sistemas contendo reatores revestidos com alumínio e eletrodos de cobre para tratamento de efluentes oriundos de indústrias têxteis. O biosensor utilizando cMoL pode ser utilizado no reconhecimento de corantes em efluentes de indústria têxtil.

## 4 CONCLUSÕES

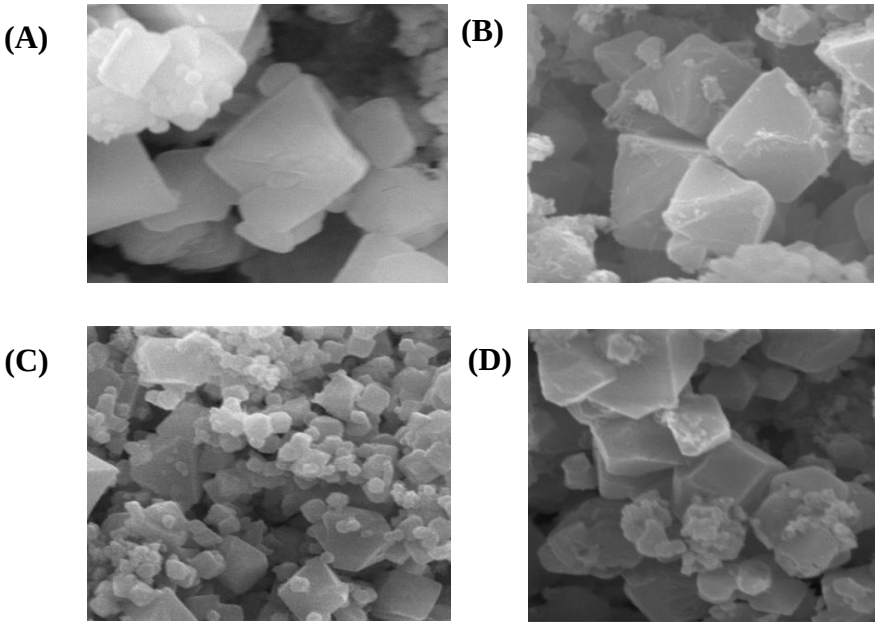
A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) foi caracterizada por métodos eletroquímicos. O método de eletrocoagulação foi eficiente na remoção do corante e constitui um método de aprimoramento do sistema convencional. O biosensor utilizando cMoL imobilizada foi capaz de monitorar resíduos de corante das amostras tratadas com eletrodos de ferro e alumínio.

Figura 2 - Potencial eletroquímico de eletrodos.




**Legenda -** Potencial eletroquímico do eletrodo de platina revestido com MOF, Pt/MOF (-■-), eletrodo de platina revestido com MOF e cMoL imobilizada, Pt/MOF/cMoL, (-●-); eletrodo de platina revestido com MOF e cMoL imobilizada, Pt/MOF/cMoL e interagindo com diferentes concentrações de galactose: 10mM (-▲-), 15 mM (-▼-) e 20 mM (-◆-). Número de repetições perfaz o total de cinco (05).

Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelando estruturas: cristais da MOF de [$Cu_3$(BTC)2.($H_2O$)3]n

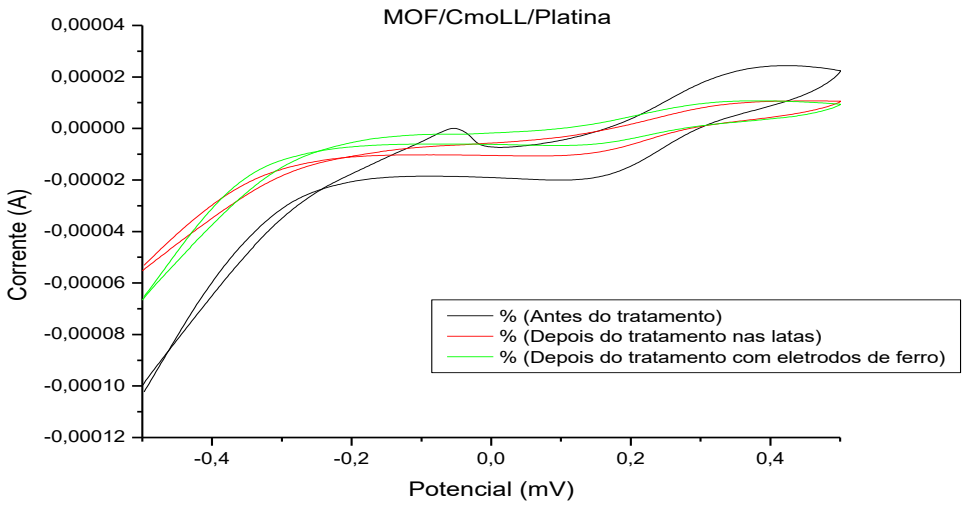



**Legenda -** Cristais da MOF de $[Cu_3(BTC)_2.(H_2O)_3]_n$ (A), Cristais da MOF de $[Cu_3(BTC)_2.(H_2O)_3]_n$ com cMoL imobilizada (B), Cristais da MOF de $[Cu_3(BTC)_2.(H_2O)_3]_n$ com cMoL imobilizada interagindo com galactose 10 Mm (C), Cristais da MOF de $[Cu_3(BTC)_2.(H_2O)_3]_n$ com galactose 10 mM (D).

Figura 4 - Solução de corante exibindo o processo de coagulação após o tratamento eletroquímico

**Fonte:** o autor (2019)

Figura 5 - Voltamograma cíclico com amostras antes do tratamento, após o tratamento na pilha de alumínio e também, após o tratamento por eletrólise.



## 5 REFERÊNCIAS

ABREU, D. S. SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of Canavalia brasiliensis lectin (ConBr). **Electrochimica Acta**, v. 241, p. 116–123, 2017.

AHMAD, N. et al. Metal–organic molecular cages: applications of biochemical implications. Chemical Society Reviews, v. 44, n. 1, p. 9–25, 2015.

ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011.

APPUKUTTAN, P.S.; SUROLLA, A.; BACHHAWAT, B.K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 14, n. 4, 382-384, 1977.

CAMPELLO. et al. Laser ablation: A new technique for the preparation of metal-organic frameworks Cu3(BTC)2(H2O)3. **Materials Letters**, v. 148, p. 200–203, 2015.

CHU, F.; THORNTON, D. T. et al. NGUYEN, H. T. Chemical cross-linking in the structural analysis of protein assemblies. **Methods**, v. 144, p. 53–63, 2018.

COELHO, L. C. B. B. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic application. **Journal of Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2017, p. 21-22, 2017.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 67-90, 1995.

CRIADO, S. P. Optimization of electrocoagulation process for disperse and reactive dyes using the response surface method with reuse application. **Journal of Cleaner Production**, 122690, 2020.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Acad. Sci,** v**.** 121, 424-427, 2006.

DOMÉNECH-CARBÓ, A. et al. Transmembrane electrochemistry of erythrocytes: Direct electrochemical test for detecting hemolysis in whole blood. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 419–428, 2016.

EJEIAN, F. Biosensors for wastewater monitoring: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 118, p.66–79, 2018.

HENDAOUI, K.; Trabelsi-Ayadi, M.; Ayari, F. Optimization and mechanisms analysis of Indigo dye removal using continuous electrocoagulation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. doi:10.1016/j.cjche.2020.07.065, 2020.

KALIVEL, Elucidation of electrocoagulation mechanism in the removal of Blue SI dye from aqueous solution using Al-Al, Cu-Cu electrodes - A comparative study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, 110858, 2020.

KOTHAI, A. Experimental investigation of textile dyeing wastewater treatment using aluminium in electro coagulation process and Fenton's reagent in advanced oxidation process. **Materials Today: Proceedings**. doi:10.1016/j.matpr.2020.07.094, 2020.

LI, W. et al. Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 11, p. 4203–4208, 2011.

LUZ, L. A. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters**. International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

LUZ, L. A. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in vitro**. v. 44, p. 94-99, 2017.

MEDEIROS, M. L. S. et al. In vitro effects of *Moringa oleifera* seed lectins on Haemonchus contortus in larval and adult stages. **Experimental Parasitology**. v. 218, 108004, 2020.

MENESES**.** J. M. Tratamento do efluente do biodiesel utilizando a eletrocoagulação/flotação: investigação dos parâmetros operacionais. **Quimica Nova**, v. 35, n. 2, p. 235-240, 2012.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. Process Biochem. v. 46, p. 498-504, 2011.

ÖZYONAR, F.; GÖKKUŞ, Ö.; & SABUNI, M. Removal of disperse and reactive dyes from aqueous solutions using ultrasound-assisted electrocoagulation. **Chemosphere**, 127325, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12732, 2020.

RAMAN, J. K.; ALVES, C. M.; GNANSOUNOU, E. A review on moringa tree and vetiver grass – Potential biorefinery feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1044–1051, 2018.

REISFELD, R.A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-3, 1962.

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

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

SANTOS, A. F. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. *Moringa oleifera*: a multipurpose tree with water coagulant seed proteins. **Advances in Environmental Research**, v. 17, p. 1-10, 2012.

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

SANTOS, A. F. S. et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications,**Current Topics in Peptide & Protein Research**.v.15, p.41-62, 2014.

SANTOS, A. F. S. et al *Moringa oleifera*: Resource management and multiuse life tree. **Advances in Research**. v.4, n. 6, p. 388-402, 2015.

SOLIMAN, M. M. et al. The ameliorative impacts of *Moringa oleifera* leaf extract against oxidative stress and methotrexate-induced hepato-renal dysfunction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, 110259, 2020.

SHAN, T. C. et al. The use of *Moringa oleifera* seed as a natural coagulant for wastewater treatment and heavy metals removal. **Applied Water Science**, v. 7, n. 3, p. 1369–1376, 2016.

SOUZA, S. R. et al. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surfasse. Carbohydrate Polymers. **2001**, 2, 46, 191-193.

SOUZA, S.R. et al. *Bauhinia Monandra* Leaf Lectin (BmoLL) is Immunogenic: Electrochemical and Piezoelectric Biosensor Recognized Lectin/IgG Anti-BmoLL Interactions (2019).

WANG J. **Analytical electrochemistry**. Second edition, Wiley-VCH, A John, Wiley & Sons, Inc., 2019.

## 5 ARTIGO 3

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA COAGULANTE DE SEMENTE DE *MORINGA OLEIFERA* (CMOL) CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO**

**Anais da Academia Brasileira de Ciências**

**Atividade antimicrobiana da lectina coagulante de semente de *Moringa oleifera* (cMoL) contra isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans***

Benny Ferreira de Oliveira[a], Maria Daniela Silva Buonafina Paz[b], Rejane Pereira Neves[b], Thiago Henrique Napoleão[a], Patrícia Maria Guedes Paiva[a], Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho[a*]

[a]*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*
[b]*Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

* Autor para correspondência: Celular, +55 81 999455897; Endereço de e-mail: lcbbcoelho@gmail.com

**Resumo**

*Cryptococcus neoformans* é um fungo oportunista que causa graves infecções em pacientes com baixa imunidade. O aumento da resistência aos medicamentos, além de poucas opções de tratamento, tem levado a busca por novas fontes de compostos ativos. Lectinas de plantas podem aderir aos carboidratos da superfície celular de microrganismos impedindo seu crescimento. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de inibição e antifúngico da lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) contra isolados clínicos de *C. neoformans*. Para avaliar a atividade antifúngica de cMoL, um teste de sensibilidade à microdiluição em caldo foi realizada seguindo um protocolo padrão e o efeito inibitório de D-galactose na ligação foi avaliado. Uma concentração mínima inibitória (CMI) de 128 μg/mL foi observada. A lectina mostrou uma concentração mínima fungicida (CMF) 256 μg/mL. A adição do carboidrato não inibiu a ação da lectina. Os resultados estimulam novas pesquisas de cMoL na produção de um novo fármaco ou a ação sinérgica com medicamentos convencionais.

**Palavras chave:** Lectinas, *M. oleifera,* cMoL, fungos, *Cryptococcus neoformans*

# 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças provocas por fungos invasores, está relacionada, na maioria das vezes, a espécies do gênero *Candida* e *Cryptococcus*, sendo estes microrganismos oportunistas responsáveis pelo aumento de infecções em indivíduos imunossuprimidos (Brilhante et al., 2015). Criptococose é uma infecção pulmonar ou disseminada, adquirida por inalação de particulado contaminado com a levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* ou *C. gattii*. Estima-se que 200.000 pacientes com HIV adquirem a meningite criptocócica em todo o mundo e o número de óbitos alcançaram 181.100 mortes por ano (Tanu et al., 2020). Além disso, a resistência desses microrganismos a medicamentos comumente utilizados no tratamento das pessoas infectadas tem sido relatada com frequência, tornando necessária a busca por novas alternativas de tratamento (Zarfar et al 2019; Martinez et al 2010).

Entre estas alternativas, as lectinas tem demonstrado atividades para diversas áreas da medicina incluindo o controle de patógenos (El-Maradny et al 2021), são proteínas ou glicoproteínas que reconhecem estruturas de carboidratos aderidos na superfície da célula e em glicoconjugados, expondo uma elevada afinidade e especificidade (Santos et al 2013). As interações reversíveis entre estas biomoléculas e seus ligantes, permitem diversas aplicações biotecnológicas, farmacológicas e terapêuticas (Coelho et al 2017). Lectinas de plantas tem demonstrado atividade de inibição contra fungos patogênicos de importância médica (Kafkle et al 2013).

*Moringa oleifera*, uma espécie arbórea, que se desenvolve rapidamente, teve origem na Índia e seu cultivo foi ampliado em regiões tropicais e subtropicais (Raman et al 2018). Esta planta possui uma boa adaptação climática e um amplo valor biotecnológico (Napoleão et al 2019), suas sementes contêm lectinas com diversas aplicações biológicas, por exemplo a lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL), uma ligadora de galactose, com peso molecular 26,5 kDa, é resistente à altas temperaturas e variações de pH, já demonstrou diversas atividades (Santos et al 2009; Oliveira et al 2011; Luz et al 2017; Medeiros et al 2020), outra lectina da semente de *M.oleifera*, WSMoL mostrou atividades contra bactérias e fungos de importância médica (Moura et al., 2017; Santos et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da cMoL, lectina coagulante de *M. oleifera*, contra isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos da Coleção de culturas Micoteca URM. Em resultados prévios, a lectina revelou uma ação antimicrobiana principalmente contra fungos.

# 2 MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 Isolamento de lectina

O extrato salino do pó da semente triturada de *M. oleifera*, foi adicionado com sulfato a (p/v) 60% de saturação de acordo com Green e Hughes (1955). A fração precipitada (F 0-60%) foi coletada, ressuspendida e dialisada contra água destilada (4h, com duas trocas líquidas); depois adicionada numa coluna (10 x 1,0 cm) contendo o gel guar (Appukutan et al. 1977), equilibrado com NaCl a 0,15 M. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas relatadas por Santos et al. (2009) para purificar a cMoL. Foi mantida uma taxa de fluxo de 20 mL/h e, após um passo de lavagem com a solução de equilíbrio, as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl 1,0 M. Frações de 2,0 mL foram recolhidas e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e AH. A concentração de proteína foi estimada pelo método de Lowry et al (1951) e o ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi utilizado para avaliar a capacidade de ligação de carboidratos da lectina, de acordo com Paiva e Coelho (1992)

## 2.2 Atividade antifungica

Os ensaios antifúngicos foram realizados utilizando 11 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* URM 6900, URM 6901, URM 6902, URM 6903, URM 6904, URM 6905, URM 6906, URM 6907, URM 6908, URM 6909, URM 6898, obtidos da coleção de culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O método utilizado para a levedura seguiu as condições descritas no documento do Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 (2008). O meio de cultura foi RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS, 0,165 mol/L, Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O cMoL foi preparado e utilizado 1024 μg/mL, diluído em dimetilsulfóxido, DMSO (Dinâmica: Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil). As colônias fúngicas foram adicionadas 3 mL de solução salina esterilizada 0,85%, e a suspensão foi homogeneizada com pipeta. Posteriormente, a mistura resultante foi transferida para tubos de ensaio esterelizados, adiconados com Tween 20 (10 μL de Tween/5mL de solução salina). Após 5 min de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e agitado por 15s em

vórtex. A suspensão foi ajustada por espectrofotômetro a 530 nm para obter uma densidade óptica entre 0,09 a 0,13. As suspensões foram então diluídas (1:50) em RPMI 1640 para obtenção de uma concentração final de cerca de 0,4 x $10^4$ a 5 x $10^4$ CFU/mL. As placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) foram usadas para os testes, nas quais 100 μL de cada diluição de droga a ser avaliada estavam nas linhas 1 a 10. Em seguida, 100 μL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas linhas 11 e 12, que foram utilizados como controle de esterilização e crescimento, respectivamente. Posteriormente, 100 μL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das linhas 1 a 10 e ao poço 12, e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 48h para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CMI), definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CMF), o conteúdo dos poços mostrando 100% de inibição do crescimento foi cultivado no meio Sabouraud Dextrose Ágar em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35 °C por três dias para determinar a viabilidade do fungo. A CMF foi confirmada pela ausência de crescimento de fungos. O efeito da D-galactose na atividade antimicrobiana de cMoL também foi determinado. O cMoL (4096 μg/ml) foi pré-incubado com D-galactose 200 mM a 37 °C por 1h e, em seguida, os ensaios antimicrobianos da lectina foram realizados conforme descrito acima. Os testes de controle foram feitos com meio de cultura sem cMoL e meio de cultura sem cMoL contendo D-galactose. Os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração mínima inibitória (CMI) foi estimada conforme mostrado na Tabela 1. Dos onze isolados de *C. neoformans* testados, oito foram inibidos com 128 μg/mL e dois isolados foram inibidos em uma concentração mínima de 64 μg/mL. O motivo da ampliação do número de isolados clínicos de *C. neoformans* testados neste trabalho, objetivou confirmar a ação antimicrobiana da lectina. Variações de atividade de inibição entre lectinas e fungos de uma mesma espécie podem estar relacionadas as estruturas heterogêneas dos carboidratos da superfície celular (Kafkle et al., 2013; Ludwig et al., 2019), a capsula de *C. neoformans,* seu principal fator de virulência, é constituída por uma estrutura entrelaçada de polissacarídeos, principalmente glucuronoxilomanano (GXM), além de glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), em uma menor quantidade, além de glicanos complexos, manoproteínas, glucanos e quitooligômeros (Fonseca et al., 2013). Outra lectina de semente de *M. oleifera* WSMoL inibiu o crescimento de espécies de Candida com um MIC de 20 μg/mL (Santos et al., 2020). Kafkle et al (2013) avaliaram o potencial de inibição de leveduras de importância médica, do

gênero *Candida* e as espécies: *Malassezia paquidermatis, Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp. e *C. neoformans* por lectinas obtidas das seguintes plantas: *Abelmoschus esculentus, Canavalia brasiliensis, Mucuna pruriens, Clitoria fairchildiana, Dioclea virgata, Bauhinia variegata* observando a inibição apenas da espécie *Candida parapsilosis* pelas lectinas testadas, com o valor do CMI entre 0,97 e 125 μg/mL. Regente et al., (2014) investigaram o potencial antifúngico da lectina Helja, extraída da muda do girassol contra leveduras patogênicas de humanos, e verificaram uma inibição em 200 μg/mL, além disso a lectina induziu alterações na morfologia celular, na permeabilidade da membrana, e induziu a produção de oxigênio reativo em um dos microrganismos. A lectina (WGA), obtida do germem do trigo, ao se ligar com estruturas derivadas de quitina na parede celular de *Cryptococcus* sp., promoveu um bloqueio das vias necessárias para formação da cápsula, alterando os mecanismos patogênicos Fonseca et al.,2013. *C. neoformans* é um fungo leveduriforme, adquirido do ambiente e que causa doenças em humanos. A incidência de infecções provocadas por esta espécie patogênica tem atingido cerca de um milhão de pessoas por ano (Zafar et al., 2019). A contaminação acontece quando o patógeno ao ser inalado provoca inicialmente pneumonia (Mayer et al., 2019), podendo resultar em lesões cerebrais severas (Kathiresu et al., 2020). O aumento exacerbado da resistência microbiana, tem sido causa de preocupação no mundo todo, principalmente fungos nos quais as opções de tratamentos são escassas (Zafar et al., 2019). Algumas barreiras são relatadas no tratamento de infecções causadas por fungos como, dificuldades no tratamento e na aquisição de novas drogas, bem como um custo elevado (Lai et al., 2016). Um efeito sinérgico da associação de medicamentos tradicionais com outras substâncias, podem potencializar a ação, além de diminuir a concentração do fármaco e também previnir a resistência. O uso combinado de medicamentos tradicionais e substâncias naturais tem mostrado um efeito positivo no tratamento da doença (Sangalli-Leite et al., 2016).

Na presença do açúcar inibidor de cMoL, a D galactose (200 mM) a lectina manteve a atividade antimicrobiana Fig.1., Segundo Santos et al., (2019) interações biológicas de lectinas quando não interrompidas pelo carboidrato específico, podem indicar que a ligação não ocorre através do domínio de ligação ao carboidrato (DCR). Lectinas podem se ligar mais fortemente aos carboidratos complexos, como por exemplo na membrana de microrganismos, do que açúcares livres (Souza et al 2003; Gajdos et al 2021). Uma lectina especifica à galactose testada contra fungos e bactérias, mostrou atividade contra bactérias apenas (Siritapetawee et al 2018). Neste mesmo trabalho a lectina pré-incubada com galactose mostrou que a atividade bactericida foi neutralizada, porém a atividade de inibição em algumas das bactérias foi mantida, o autor atribuiu esses resultados à afinidade da lectina pela galactose da parede celular

do microrganismo. Diante desses resultados, novas pesquisas de detalhamento da ação antimicrobiana da lectina, bem como o potencial de inibição de fatores de virulência de *C. neoformas* podem ser investigadas, para desenvolvimento de novos fármacos.

Figura 1 - Representação esquemática de cMoL interagindo com o patógeno *Cryptococcus neoformans*, através de um domínio diferente do domínio de reconhecimento ao carboidrato. cMoL inibida pela galactose se ligou à cepa patogênica.

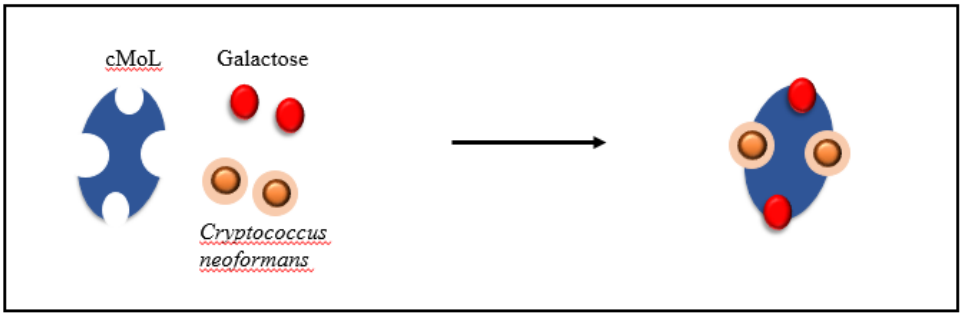



**Tabela 1 -** Perfil de inibição de CIM 50 exibindo a concentra inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de isolados de *C. neoformans* frente a lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL).

| ***C. neoformans*** | **CIM (µg/mL)** | **CFM (µg/mL)** |
|---|---|---|
| URM 6900 | 128 | 256 |
| URM 6901 | 128 | 256 |
| URM 6902 | 128 | 256 |
| URM 6903 | 128 | 256 |
| URM 6904 | 128 | 256 |
| URM 6905 | 128 | 256 |
| URM 6906 | 128 | 256 |
| URM 6907 | 128 | 256 |
| URM 6908 | 128 | 256 |
| URM 6909 | 64 | 128 |
| URM 6898 | 64 | 128 |

# 4 CONCLUSÃO

A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) promoveu uma atividade fungicida frente aos isolados clínicos de *C. neoformans.* A atividade antimicrobiana da lectina não foi inibida na presença da galactose.

## 5 REFERÊNCIAS


1. A.F.S. Santos, L.A. Luz, C.C.A. Argolo, J.A. Teixeira, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochem. 44 (2009), pp. 504-508.
2. A.F.S. Santos, T.H. Napoleão, R.F. Bezerra, E.V.M.M. Carvalho, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Strategies to obtain lectins from distinct sources. Adv Exp Med Biol. 63 (2013) 33-60.
3. A.K. Ludwig, H. Kaltner, J. Kopitz, & H.-J. Gabius. Lectinology 4.0: Altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. General Subjects. 1863 (2019) 935-940.
4. C.F.R. Oliveira, L.A. Luz, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, S.M.M.L.R. Macedo, Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. Process Biochem. 46 (2011) 498-504.
5. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Suplement. CLSI document M27-S3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).
6. F.L. Fonseca, A.J. Guimarães, L. Kmetzsch, F.F. Dutra, F.D. Silva, C.P. Taborda, G. S. Araujo, S. Frases, C.C. Staats, M.T. Bozza, A. Schrank, M.H. Vainstein, L. Nimrichter, A. Casadevall, M.L. Rodrigues. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chitooligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. Fungal Genet Biol. 60 (2013) 64–73.
7. F.L. Mayer, J.W. Kronstad, *Cryptococcus neoformans.* Trends in Microbiology. (2019). F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A.C.A.P. Silva, J.F. Silva, H.C. Oliveira, J.L. Singulani, F.P. Gullo, R.M. Silva, L.O Regasini, D.H.S. Silva, V.S. Bolzani, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes-Giannini. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by in vitro and in vivo evaluation. Internat J Antimicrob Agents, 48(5), (2016), 504–511.
8. G.B. Klafke, G.M. Moreira, L.G. Monte, J. L. Pereira, T.M. Brandolt, M.O. Xavier, T. Santi-Gadelha, O.A. Dellagostin, L.S Pinto. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. Mycopathologia. 175, (2013); 147-151.
9. H. Zafar, S. Altamirano, E.R. Ballou, K. Nielsen. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. Current Opinion in Microbiology (2019) 52, 158–164.
10. J.K. Raman, C.M. Alves, E. Gnansounou. A review on moringa tree and vetiver grass – Potential biorefinery feedstocks. Bioresource Technology. (2018). 249, 1044–1051.
11. J. Siritapetawee, W. Limphirat, W. Wongviriya, J. Maneesan, & W. Samosornsuk. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. Int. J. Biol. Macromol. 120 (2018) 1846–1854.
12. L.A. Luz, F.A. Rossato, R.A.P. Costa, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, Coelho, L.C.B.B, Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. Toxicology in vitro. 44 (2017) 94-99.
13. L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, V.L.M. Lima, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/ pharmacological and therapeutic application. J. Evid *Based* Complementary Altern Med. 2017 (2017) 21-22.
14. L.M.M. Santos, P.M. Silva, M.C. Moura, A.R. Carvalho Junior , P.K. Amorim , T.F. Procópio , L.C.B.B. Coelho , L.C.N. Silva , P.M.G. Paiva , N.D.L. Santos , T.H. Napoleão. Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). J Mycol Med. (2020). 101074.

15. L.R. Martinez, M.R. Mihu, G. Han, S. Frases, R.J.B. Cordero, A. Casadevall, A.J. Friedman, J.M. Friedman, J.D. Nosanchuk. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. Biomaterials. (2010). 31(4), 669–679.
16. M.C. Moura, D.S. Trentin, T.H. Napoleão, M. Primon-Barros, A.S. Xavier, N.P. Carneiro, P.M.G. Paiva, Macedo, A.J., L.C.B.B. Coelho, Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus sp*.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. J Appl Microbiol. 123 (2017) 861-874.
17. M.L.S. Medeiros, R.R.V. Alves, B.F. In vitro effects of *Moringa oleifera* seed lectins on *Haemonchus contortus* in larval and adult stages. Experimental Parasitology. (2020) 218, 108004. doi:10.1016/j.exppara.2020.108004.
18. M. Regente, G.B. Taveira, M. Pinedo, M.M. Elizalde, A.J. Ticchi, M.S.S. Diz, A.O. Carvalho, L. Canal, V.M. Gomes, A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. Curr Microbiol. 69 (2014) 88-95.
19. R. Kathiresu, S. N. Zinat, M. Fernando. Immune reconstitution inflammatory syndrome following *Cryptococcal neoformans* infection in an immunocompetent host: A case report and review of the literature. IDCases, (2020). e00699.
20. R.S.N. Brilhante, E.P. Caetano, J.S. Oliveira, D.S.C.M. Castelo-Branco, E.R.Y Souza, L.P. Alencar, L.A. Cordeiro, T.J.P.G. Bandeira, J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of Candida and Cryptococcus species. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. (2015). 19(5), 459–465.
21. S. Tanu, M. Mihir, S. Rajeev, A. Annu. Neurological worsening during treatment of an immunocompetent adult with *Cryptococcus neoformans* meningitis. Medical Mycology Case Reports 27 (2020) 48–51.
22. T.H. Napoleão, A.F.S. Santos, L.A. Luz, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho. *Moringa oleifera*: A Powerful Source of Environmentally, Medicinally and Biotechnologically Relevant Compounds Advances in Applied Science and Technology (2019).
23. Y.W. Lai, L.T. Campbell, M.R. Wilkins, C.N.I. Pang, S. Chen, D.A. Carter. (2016). Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in Cryptococcus. International Journal of Antimicrobial Agents, 48(4), 388–394.
24. El-Maradny, Y. A, El-Fakharany, E. M, Abu-Serie, M.M., Hashish, M. H, Selim, H.S. Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses, International Journal of Biological Macromolecules, v. 179, 239-258, 2021.
Souza GA, Oliveira PSL, Trapani S, Santos ACO, Rosa JC, Laure HJ et al. Amino acid sequence and tertiary structure of Cratylia mollis seed lectin. Glycobiology. 2003; 13(12): 961-972.
Gajdos L, Blakeley MP, Kumar A, Wimmerová M, Haertlein M, Forsyth V, Imberty A, Devos JM. Visualization of hydrogen atoms in a perdeuterated, lectin-fucose complex reveals key details of protein-carbohydrate interactions. Structure. 2021; 29: 1-11.

# 6 CONCLUSÕES

A cMoL purificada até a homogeneidade, em quantidades de miligramas, por meio de um protocolo de afinidade com gel de guar simples, mostrou propriedades bacteriostáticas, fungistáticas e fungicidas. A lectina foi imunogênica e o imunossensor desenvolvido foi eficiente no monitoramento da produção do IgG anti-cMoL; de acordo com o sistema eletroquímico a interação cMoL/IgG anti-cMoL ocorreu através do DRC.

A lectina foi caracterizada por métodos eletroquímicos. O método foi eficiente na remoção do corante índigo carmim, nas amostras tratadas com eletrodos de ferro e alumínio. O biosensor utilizando cMoL imobilizada foi capaz de monitorar resíduos do corante.

A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL) promoveu uma atividade fungistática e fungicida frente aos isolados clínicos de *C. neoformans.* A cMoL inibida por carboidrato manteve a atividade contra o microrganismo, podendo indicar uma maior interação com os carboidratos complexos da membrana/parede celular do microrganismo.

# REFERÊNCIAS

ABID, S. A. et al. Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. **Life sciences**, 119117, 2021.

ABREU, D. S. et al. SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). **Electrochimica Acta**, v. 241, p. 116–123, 2017.

ADESINA, O. A. et al. Process parametric studies for decolouration of dye from local ‘tie and dye’ industrial effluent using *Moringa oleifera* seed. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 37, p. 23-30, 2021.

AHMAD, N. Metal–organic molecular cages: applications of biochemical implications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 9–25, 2015.

ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011.

ASADUZZAMAN, A. K. M. et. al. *Moringa oleifera* seed lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF-κB gene expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, 1936–1944, 2018.

ASHFORD, D.; ALLEN, A. K.; NEUBERGER, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemical Jornal**. v. 201, p. 641-645, 1982.

BETTAZZI, F. Biosensors and Related Bioanalytical Tools. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1–33, 2017.

BUNN-MORENO M. M.; CAMPOS-NETO A. Lectin (s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator (s) of distinct human T and B cell functions. **J Immunol.** v. 127(2), p. 427-9, 1981.

BUTLE, A. B. et al. Immunostimulatory and anti-allergic potential of novel heterotrimeric lectin from seeds of *Zizyphus mauritiana* Lam, **Int. J. Biol. Macromol**, v. 171, p.389-397, 2021.

CAVADA, B. S. et al. A review of Vicieae lectins studies: End of the book or a story in the writing? **Int. J. Biol. Macromol**, v. 181, p. 1104-1123, 2021.

CESEWSKI E.; JOHNSON, BN. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 159, 112214. 2020.

CHEN, M. et al. Molecular characterization and expression analysis of galectins in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) in response to *Vibrio harveyi* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 347–354, 2019.

CHEN, P. K. et al. The lectin Orysata induces phosphatase-mediated and carbohydrate-independent aggregation of insect cells, **J Insect Physiol**, v. 131, 104241, 2021.

CLARKE, W.; D'ORAZIO, P. Electrochemistry. Contemporary Practice in Clinical Chemistry, p. 159–170, 2020. DOI:10.1016/b978-0-12-815499-1.00009-0.

CLEMENT, F.; PRAMOD, S. N.; VENKATESH, Y. P. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 316–324, 2010.

COELHO, J. S. Paiva, Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v.77, 934-938, 2009.

COELHO, L. C. B. B. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic application. **Journal of Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2017, p. 21-22, 2017.

CORIOLANO, M. C. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, p. 1-8, 2019.

DAMME, E. J. V., et al., Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

DASSAA, A. et al. Electrochemical degradation of disperse blue 56 from aqueous solution using aluminum electrodes. **Materials Today: Proceedings**, p. 1-5, 2020.

DELAHAUT, P. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**, v.116, p. 4–1, 2017.

DUTTA, A. K. *Moringa oleifera*: a review on its importance and medicinal application in recent age. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 12, p. 1829-1843, 2017.

El-MARADNY. Y. A. et al. Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses, **Int. J. Biol. Macromol**, v. 179, p. 239-258, 2021.

ENAM, F. et al. Lectins as Analytical Tools, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, doi.org/10.1016/B978-0-12-819475-1.00083-3, 2021.

FALKOWSKI, P.; LUKASZEWSKI, Z.; GORODKIEWICZ, E. Potential of Surface Plasmon Resonance Biosensors in cancer detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 113802. 2020.

FRUHMANN, P. et al. Immunoassay and amperometric biosensor approaches for the detection of deltamethrin in seawater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5923–5930, 2018.

GAJDOS, L. et al. Visualization of hydrogen atoms in a perdeuterated lectin-fucose complex reveals key details of protein-carbohydrate interactions, **Structure**, 2021. doi.org/10.1016/j.str.2021.03.003.

GAUTAM, A. K. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the Cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, 19, S0141-8130, 2019.

GUPTA, K. C. Gel filtration medium derived from guar gum. **Journal Chromatography**, v. 169, 183-190, 1979.

HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E.; BENNETT, B. T. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry, **ILAR J**, v. 37(3), p. 93-118, 1995.
JARDIM, W. F. Measurement and interpretation of redox potential values ($E_H$) in environmental matrices. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

KHURTSIDZE, E. et al. Galactose-binding lectin from mulberry (Morus alba L.) seeds with growth hormone-like activity. **Annals of Agrarian Science**, v.15, n.1, p. 26–30, 2017.

KIM, K.; CHOI, G.; KIM, K. Determination of equilibrium state and Sn redox ratio in aluminoborosilicate glass melts by potentiometry and voltammetry. **Electrochemistry Communications**, v.109, 106554, 2019.

LACERDA, R. R**. Isolamento, caracterização e atividade biológica da lectina de semente variedade Brasileira de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* var. cascavel**), 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations, **ILAR J**, v. 46(3), p. 269-279, 2005.

LI, Y. Quantifying the efficiency of o-benzoquinones reaction with amino acids and related nucleophiles by cyclic voltammetry. **Food chemistry**, v. 317, 126454, 2020.

LUDWIG, A. K. Lectinology 4.0: Altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. **BBA - General Subjects**, v. 1863, p. 935-940, 2019.

LUZ, L. A. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters**. International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

LUZ, L. A. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in vitro**. v. 44, p. 94-99, 2017.

MA, W.; LI, X.; BAI, Y.; LIU, H. et al. Applications of metal-organic frameworks as advanced sorbents in biomacromolecules sample preparation. **TrAC Trend Anal Chem,** v. 109, p. 154-162, 2018.

MAIZUWO, A. I. et al. Phytochemical Constituents, Biological Activities, Therapeutic Potentials and Nutritional Values of *Moringa oleifera* (Zogale): A Review. **Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry**, v.3, n. 4, p. 60-66, 2017.

MCCONHACHIE, G. L. et al. Field trials of apropriate hydraulic flocculation processes. **Water Research**, v. 33, p. 1425-1434, 1999.

MEDEIROS, M. L. S. et al. In vitro effects of *Moringa oleifera* seed lectins on *Haemonchus contortus* in larval and adult stages. **Experimental Parasitology**. v. 218, 108004, 2020.

MEHROTRA, P. et al. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p.153–159, 2016.

MISHRA, A. et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, 110827, 2019.

MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47(7), p. 1183-8, 1998.

NĚMEC, P. Biomass production of a young plantation of *Moringa stenopetala* (Baker f.) Cufod. and *Moringa oleifera* Lam. in southern Ethiopia. **South African Journal of Botany**, v. 129, 463-470, 2020.

NIVETHA, R. et al. In silico analysis of carbohydrate-binding pockets in the lectin genes from various species of Canavalia, **Comp Biol Chem**, v. 92, 107477, 2021.

NTIBREY, R. A. K. Antimicrobial and coagulation potential of *Moringa oleifera* seed powder coupled with sand filtration for treatment of bath wastewater from public senior high schools in Ghana. **Heliyon**, v. 6, n. 8, e04627, 2020.

OLIVEIRA, C. F. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin(cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, J. E, et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8.1, p. 1 –11, 2013.

OLIVEIRA W. F. et al. Titanium dioxide nanotubes functionalized with *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science Engineering C**, v. 90, p. 664-672, 2018.

OMAÑA-SANZ, B. et al. An electrochemical method to rapidly assess the environmental risk of silver release from nanowire transparent conductive films. **NanoImpact**, v. 18, 100217, 2020.

PACHECO, W. F. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAIVA, P. M. G. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982–989, 2011.

PARROTTA, J. A. Healing Plants of Peninsular India. **New York: CABI Publishing**, p. 903, 2001.

PARTHIBAN, E. Purification, characterization of mosquito larvicidal lectin *from Annona muricata* and its eco-toxic effect on non-target organism. **Process Biochemistry**. v. 99, 357-366, 2020.

PIMENTEL, J. C. **Caracterização das lectinas de folhas de Bauhinia monandra (BmoLL) e de sementes de Cratylia mollis (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos**. 106f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

PUNDIR, C. S.; YADAV, N.; CHHILLAR, A. K. Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. **Trends in Food Science & Technology**. doi:10.1016/j.tifs.2019.01.003, 2019.

RAJESWARI. M. et al. Modelling and efficiency assessment of the up flow fixed bed process packed with *Moringa oleifera* for continuous Cd (II) removal from drinking water, **Journal of Molecular Structure**, v. 1236, 130328, 2021.

RAMAN, J. K.; ALVES, C. M.; GNANSOUNOU, E. A review on moringa tree and vetiver grass – Potential biorefinery feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1044–1051, 2018.

RAWAT, A. et al. Highly sensitive gold nanoparticle based electrochemical biosensor for detection of Antigenantibody interactions. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 10, n.1, p. 85-92, 2017.

RATHNASAMY, S. K. et al. Air-assisted dispersive liquid phase microextraction coupled chromatography quantification for purification of therapeutic lectin from aloe vera – A potential COVID-19 immune booster, **Microchem J**, v. 165, 106187, 2021.

RENGARAJ, S. et al. Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 50–58, 2018.

SÁ, S. R. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic *candida* species. **Talanta**, v. 121375. 2020.

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

SANTOS, A. F. S. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-80, 2005.

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

SANTOS, A. F. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. *Moringa oleifera*: a multipurpose tree with water coagulant seed proteins. **Advances in Environmental Research**, v. 17, p. 1-10, 2012.

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

SANTOS, A. F. S. *Moringa oleifera*: Resource management and multiuse life tree. **Advances in Research**. v.4, n. 6, p. 388-402, 2015.

SANTOS, N. D. L. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 129, 3-8, 2020.

SHU, J. A new electrochemical method for simultaneous removal of $Mn^{2+}$and $NH_{4+}$-N in wastewater with Cu plate as cathode. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, 111341, 2020.

SILVA, P. M. S. et al. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171-177, 2016.

SILVA, M. L. S. Lectin-based biosensors as analytical tools for clinical oncology. **Cancer Letters**, v. 436, p. 63–74, 2018.

SILVA, P. M. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal Biological Macromoles**, v. 108 p. 391-400, 2018.

SILVA, M.; LUÍSA S. Lectin biosensors in cancer glycan biomarker detection. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 93, p.1-61, 2019.

SOLTANI HOWYZEH, M.; SADAT NOORI, S. A.; SHARIATI J., V. Essential oil profiling of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) industrial medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 255–259, 2018.

SOUZA, S. R. et al. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surfasse. **Carbohydrate Polymers**, v.2, n.46, p. 191-193, 2001.

SOUZA, S. R. et al. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 255–258, 2003.

SOUZA, S. R. et al. Charge transference detection through cyclic voltammograms in the interaction of *Cratylia mollis* seed lectin-carbohydrate inhibitor. **Biotechnology Journal International**. v.18, n. 3, p. 1-8, 2017.

SOUZA, S. R. et al. *Bauhinia Monandra* Leaf Lectin (BmoLL) is Immunogenic: Electrochemical and Piezoelectric Biosensor Recognized Lectin/IgG Anti-BmoLL Interactions 2019.

STANTIČ, M. et al. Application of lectin immobilized on polyHIPE monoliths for bioprocess monitoring of glycosylated proteins, **J. Chromatogr B Biomed Appl**, v. 1174, 122731, 2021.

STEIN, D. R. Human polyclonal antibodies produced in transchromosomal cattle prevent lethal Zika virus infection and testicular atrophy in mice. **Antiviral Research**, v. 146, 164–173, 2017.

STOCK, N. K.; ESCADAFAL, C.; ACHAZI, K.; CISSÉ, M.; NIEDRIG, M. Development and characterization of polyclonal peptide antibodies for the detection of Yellow fever virus proteins**. J Virol Methods**, v. 222, p.110–116, 2015.

SULTANA, S. Nutritional and functional properties of *Moringa oleifera*. **Metabolism Open**, v. 8, 100061, 2020.

SUN, X. et al. A novel oriented antibody immobilization based voltammetric immunosensor for allergenic activity detection of lectin in kidney bean by using AuNPs-PEI-MWCNTs modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v, 143, p. 1-8, 111607, 2019.

TAMILARASAN, K. et al. Isolation, characterization of galactose-specific lectin from *Odoiporus longicollis* and its antibacterial and anticancer **activities, Int J Biol Macromol**, 2021, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.054.

TANG, Z. Contributing to liquid biopsy: Optical and electrochemical methods in cancer biomarker analysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 415, 213317, 2020.

TAKALOO, S, ZAND, M M. Wearable electrochemical flexible biosensors: With the focus on affinity biosensors, **Sensing and Bio-Sensing Research**. v. 32, 100403, 2021.

TOMIYASU, J. Lectin histochemical studies on the olfactory gland and two types of gland in vomeronasal organ of the brown bear. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 6, p. 566–571, 2018.

TRAN, V. V. et al. Development strategies of conducting polymer-based electrochemical biosensors for virus biomarkers: Potential for rapid COVID-19 detection, **Biosens Bioelectron**, v. 182, 113192, 2021.

VAN DAMME, E. **Carbohydrate-protein Interactions: Plant Lectins.** Comprehensive glycoscience-from chemistry to systems biology, p. 563–599, 2007.

VASTA, G. R. et al. Lectin Repertoires in Invertebrates and Ectothermic Vertebrates: Structural and Functional Aspects, **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, ISBN 9780124095472, 2021.

WANG J. **Analytical electrochemistry**. Second edition, Wiley-VCH, A John, Wiley & Sons, Inc., 2019.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. Second edition. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 53, n. 9, p. 1689-1699, 2019.

XIAOJIE, S.; YU, L.; LEI, Y.; GUANG, Y, M I N, Q. Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein. **Stem Cell Res**, v. 50, 102125, 2021.

XIONG, Y et al. Virucidal activity of Moringa A from *Moringa oleifera* seeds against Influenza A Viruses by regulating TFEB, **Int Immunopharmacol**, v. 95, 107561, 2021.

ZAINAB, B. et al. In-silico elucidation of *Moringa oleifera* phytochemicals against Diabetes Mellitus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 2299-2307, 2020.

ZHANG, S. et al. Metal–organic frameworks (MOFs) based electrochemical biosensors for early cancer diagnosis in vitro**, Coord Chem Rev**, v. 439, 213948, 2021.

ZHOU, Y. et al. A sensitive electrochemical method for indole based on the signal amplification strategy by gold/iron-oxide composite nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 1142, p. 56–64, 2021.

ZHU, X.; SHI, L. **Electrochemistry**. Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications, 209–236, 2019.

# ANEXO

Experimental Parasitology 218 (2020) 108004

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Full length article

## *In vitro* effects of *Moringa oleifera* seed lectins on *Haemonchus contortus* in larval and adult stages

Mário L.S. Medeiros [a,*], Robson R.V. Alves [b], Benny F. Oliveira [b], Thiago H. Napoleão [b], Patrícia M.G. Paiva [b], Luana C.B.B. Coelho [b], Ana C.D.S. Bezerra [c], Michele D.C. Silva [c,**]

[a] Departamento de Ciências Biomédicas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Rua Atirador Miguel Antônio da Silva Neto, S/n, Aeroporto, 59607 360, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil
[b] Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Morais Rego S/n, Cidade Universitária, 50670 901, Recife, Pernambuco, Brazil
[c] Departamento de Biociências, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Semi Árido, Av. Francisco Mota 572, Costa e Silva, 59625 900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil

ARTICLE INFO

*Keywords:*
*Moringa oleifera*
Lectin
Nematode
Motility index

ABSTRACT

*Haemonchus contortus* is a hematophagous parasite causing damage to the production of ruminant animals throughout the world. This study evaluated the *in vitro* effect of proteins from *Moringa oleifera* (WSMoL - Water Soluble *M. oleifera* Lectin and cMoL - coagulant *M. oleifera* Lectin) on the motility of infective larvae and adult male and female worms of *H. contortus*. The specific activity of total proteases and the morphology of the worms exposed to the lectins were observed. Both lectins inhibited motility of all parasite stages tested. WSMoL and cMoL at 500 μg $mL^{-1}$ interfered in the motility of larvae. Values of 11.1% and 8.1% were the lowest motility indices of larvae with sheath, and 30.6% and 16.4% were the lowest motility indices of exsheathed larvae treated with WSMoL and cMoL, respectively. In 1 mg $mL^{-1}$ solutions of WSMoL and of cMoL, the motility index of adult male worms was 23.3% ($p < 0.001$) and 20% ($p < 0.001$), while the motility index of adult female worms was 63.3% ($p > 0.05$) and 26.6% ($p < 0.001$), respectively. Greater proteolytic activity was detected in extracts obtained from adult worms, male and female, after incubation with the lectins. Morphological changes caused by the lectins were revealed by changes in the crests of the cuticle, in the longitudinal striations and at the vulva.

### 1. Introduction

The helminth *Haemonchus contortus* is the parasite with the highest infectious character in ruminants, causing damage to the production of these animals throughout the world, especially due to its hematophagous habit (Hoberg et al., 2004; Hoste et al., 2016).

Resistance to anthelmintics has encouraged increased screening of natural compounds with nematicidal effects which interfere in the life cycle of the parasites. Lectins have been shown to have nematicidal effects by interacting with worm glycoproteins and inhibiting egg hatching and larvae development (Hoste and Torres-Acosta, 2011; Ríos-De Álvarez et al., 2012; Sandoval-Castro et al., 2012; Heim et al., 2015; Medeiros et al., 2018).

Lectins are proteins of non-immunological origin with carbohydrate-specific binding sites, through which they are able to interact with cells, glycoproteins and free carbohydrates in solution (Coelho et al., 2017), and thereby offer a range of applications. Two lectins of *Moringa oleifera* Lamarck 1785 seeds, WSMoL (Water Soluble *M. oleifera* Lectin) and cMoL (coagulant *M. oleifera* Lectin) (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2009), have been the focus of investigations regarding their nematicidal action. WSMoL is an acidic oligomeric protein (pH 4.5) that has a net negative charge in 0.15 M NaCl solution, with a molecular mass of approximately 60 kDa and with a peptide sequence similar to the proteins MO2.1 and MO2.2 (flocculating proteins of *M. oleifera*, as identified in the NCBI database – identification number gi|127215 – last updated December 2019) and whose specific activity has been found to decrease in the presence of fructose and pork thyroglobulin (Gassenschmidt et al., 1995; Coelho et al., 2009; Moura et al., 2016). cMoL is a cationic, thermostable, non-glycosylated protein, active at a wide pH range from 4.0 to 9.0, with a molecular weight of 26.6 kDa, and with

* Corresponding author.
** Corresponding author.
*E mail addresses:* mariolsmedeiros@gmail.com (M.L.S. Medeiros), micheledalvina@ufersa.edu.br (M.D.C. Silva).

https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108004
Received 17 February 2020; Received in revised form 19 August 2020; Accepted 18 September 2020
Available online 19 September 2020
0014-4894/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

affinity for glycoproteins such as azocasein and asialofetuin (Santos et al., 2009; Luz et al., 2013). These lectins present biological activities, such as insecticidal, coagulant in water, bactericidal and nematicidal (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2009, 2012, 2014; Ferreira et al., 2011; Luz et al., 2013; Moura et al., 2016; Medeiros et al., 2018). This study reports the effect of the lectins WSMoL and cMoL on the motility of *H. contortus* in the third larval and the adult stages; in addition, changes were verified in the protease activity and morphological aspects of the species after treatment with the lectins.

## 2. Material and methods

### 2.1. Purification of lectins

WSMoL was isolated following the protocol of Coelho et al. (2009). Seeds (10 g) of *M. oleifera* were triturated and homogenized in distilled water (100 mL) for 16 h at 28 °C. Then, the solution was filtered through gauze and centrifuged (3,000×*g* for 15 min at 4 °C). The supernatant was subjected to protein precipitation with ammonium sulfate at 60% saturation (for 4 h at 28 °C). The material was centrifuged and the precipitate obtained was solubilized in 0.15 M NaCl and dialyzed (in a membrane with porosity to retain molecules of 3.5 kDa) against 0.15 M NaCl solution (for 6 h at 4 °C). The dialyzed protein fraction was chromatographed in a chitin (Sigma – Aldrich, MO, USA) column (18 × 1.5 cm); the lectin adsorbed was eluted with 1 M acetic acid and the protein pool obtained was dialyzed against 0.15 M NaCl solution (for 6 h at 4 °C).

cMoL was isolated as described by Santos et al. (2009); seeds were processed and homogenized in 0.15 M NaCl for 6 h at room temperature. Then the material was filtered and centrifuged (12,000×*g* for 20 min at 4 °C). The protein content was precipitated with 60% of ammonium sulfate for 4 h at room temperature; the material was centrifuged, and the protein fraction obtained was dialyzed at 4 °C against distilled water (two exchanges) and then against 0.15 M NaCl solution (overnight). The dialyzed protein fraction was chromatographed on a guar gel (Sigma – Aldrich, MO, USA) column (10 × 1.0 cm) previously balanced with 0.15 M NaCl; the adsorbed cMoL was eluted with 1 M NaCl, and the protein pool obtained was dialyzed against distilled water (four exchanges, 1 h each exchange). The collection was previously authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) (authorization No. 36301–2). Herbarium specimens of the species were previously deposited at Dárdano de Andrade Lima Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), located in Recife, Brazil (Herbarium specimen Nº 73.345).

### 2.2. Declaration of ethics

The research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the *Universidade Federal Rural do Semi-Árido* (UFERSA) under number 23091.009318/2016–40 and in accordance with Federal Law No. 11794/2009.

### 2.3. Larvae of H. contortus

The *H. contortus* strain used in the tests was isolated in 2010 from the Santa Inês flock of the EMBRAPA Southeast Livestock Unit (CPPSE) (field isolate) and was registered with the Consortium on Anthelmintic Resistance SNPs – Parasite Isolate Database (CARS). The isolate was granted by EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) and stored at 10 °C until its use (one month) (Preston et al., 2015). The *H. contortus* larvae used in the tests have been characterized as resistant to the main classes of anthelmintics (albendazole, ivermectin and moxidectin) (Chagas et al., 2013; Gainza et al., 2019).

L3 larvae were exsheathed and sterilized by means of incubation with 0.15% (v/v) sodium hypochlorite (NaClO) at 37 °C for 20 min (Nikolaou et al., 2002). The exsheathed larvae (called xL3) were washed 5 times in saline solution (0.9%), through centrifugation (6000 rpm for 5 min) at room temperature (28 °C).

### 2.4. Isolation of adult H. contortus

Adult worms were collected from autopsies of fresh abomasum of naturally infected animals, through washes of the organ with 0.9% saline solution. The organic material rich in worms obtained through the abomasum washes was collected, placed in closed plastic bottles which were placed in a thermal box, kept at 35 °C and taken immediately to the laboratory. The experiment was carried out immediately after collection. Adult female and male worms were identified according to the methodology previously described by Ueno and Gonçalves (1998), separated and transferred to 12-well sterile plates (10 worms per well), containing 500 μL/well of Luria Bertani medium at 37 °C.

### 2.5. Effect of lectins on motility of H. contortus

The effect of WSMoL and cMoL on the motility of larvae and adult worms of *H. contortus* (larvae with sheath – shL3, exsheathed larvae – xL3 and female or male worms) was analyzed as previously described (Hounzangbe-Adote et al., 2005; Preston et al., 2015; Witola et al., 2016), with modifications. The larvae or adult worms were transferred to 12-well sterile plates containing 500 μL/well of Luria Bertani medium (LB medium: consisting of 5 g of tryptone, 2.5 g of yeast extract and 2.5 g NaCl dissolved in 500 mL of sterile, distilled water, autoclaved and supplemented with 2.5 μg $mL^{-1}$ of amphotericin, 100 IU $mL^{-1}$ of penicillin and 100 μg $mL^{-1}$ of streptomycin), at 37 °C. Wells containing either 20 larvae or 10 adult male or female worms were set up in triplicate at each lectin concentration tested; LB medium without added lectin was used as a negative control. For shL3 and xL3, the lectin concentrations tested were 3.9–500 μg $mL^{-1}$; for adult male and female worms, the lectins were tested at 1 mg $mL^{-1}$ and 500 μg $mL^{-1}$. Plates were incubated at 37 °C and motility was assessed at time intervals of (1) 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 h for shL3; (2) 24, 48 and 72 h for xL3 and (3) 2, 4, 6 and 8 h for adult worms. To stimulate motility, plates were shaken and the motility was observed in an inverted microscope (20x; manual shaking of the plates and light from the optical microscope on the larvae were used as stimuli for the motility of the larvae immediately before the analysis of the presence or absence of motility). The motility index was measured using the formula previously described by Hounzangbe-Adote et al. (2005):

$$\%MI\left(MotilityIndex\%\right)=\frac{number\,of\,motile\,larvae\,or\,worms\,in\,the\,treatment}{total\,number\,of\,larvae\,or\,worms}x100$$

### 2.6. Zymogram of proteases

After 8 h of incubation with 1 mg $mL^{-1}$ of the lectins WSMoL and cMoL (separately) or in LB medium (negative control), 20 adult worms of the treatments (males and females separately) were collected, crushed and homogenized in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, followed by centrifugation (9,000×*g* at 4 °C for 15 min) to obtain the extracts. The supernatant obtained in each case was collected and the protein concentration was determined using the Lowry method (Lowry et al., 1951). The protease activity of worm extracts was determined according to the methodology previously described by García-Carreño et al. (1993). Samples of the worm extracts (100 μg of protein) were subjected to 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at 4 °C. After running the buffer, the gel was immersed in 2.5% (v/v) Triton X-100 prepared in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) to remove the SDS; then it was incubated in 3% casein (p/v) prepared in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) for 30 min at 4 °C and then for 90 min at 37 °C to allow for the digestion of casein peptides with protease activity. Finally, the gel was stained for 16 h using 0.02% (p/v) Coomassie Brilliant Blue prepared in a 10% acetic acid solution, and then bleached with a solution containing 40% ethanol, 10% acetic acid

and 50% distilled water. Clear bands against the blue background showed protease activity.

### 2.7. Scanning electron microscopy of adult H. contortus

The adult male and female worms exposed for 8 h to WSMoL or cMoL (1 mg $mL^{-1}$) or incubated in LB medium (negative control) were fixed by incubation for 72 h with a 2.5% (v/v) glutaraldehyde solution prepared in PBS 0.1 M, pH 7.4, and post-fixed by incubation for 1 h with a solution of 1% osmium tetroxide in PBS (pH 7.4). Subsequently, the worms were dehydrated in a series of ethyl alcohol solutions (30, 50, 70, 95 and 100%), then coated with a layer of gold-palladium for 15 min (Quorum, Q150T ES), forming a 20-nm layer. The worms were observed in a scanning electron microscope (QUANTA- EGF) with a voltage of 10 kV.

### 2.8. Statistical analysis

The parasite motility index was analyzed by GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Prism Software, Inc™), by ANOVA and Bonferroni post-test, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). Data were expressed as mean ± standard deviation.

## 3. Results

### 3.1. Effect of lectins on parasite motility

WSMoL and cMoL inhibited the motility of all life cycle stages studied ($p < 0.05$; Figs. 1–4). The time course depended on the concentration of lectin used and there was evidence of recovery of motility in the larvae.

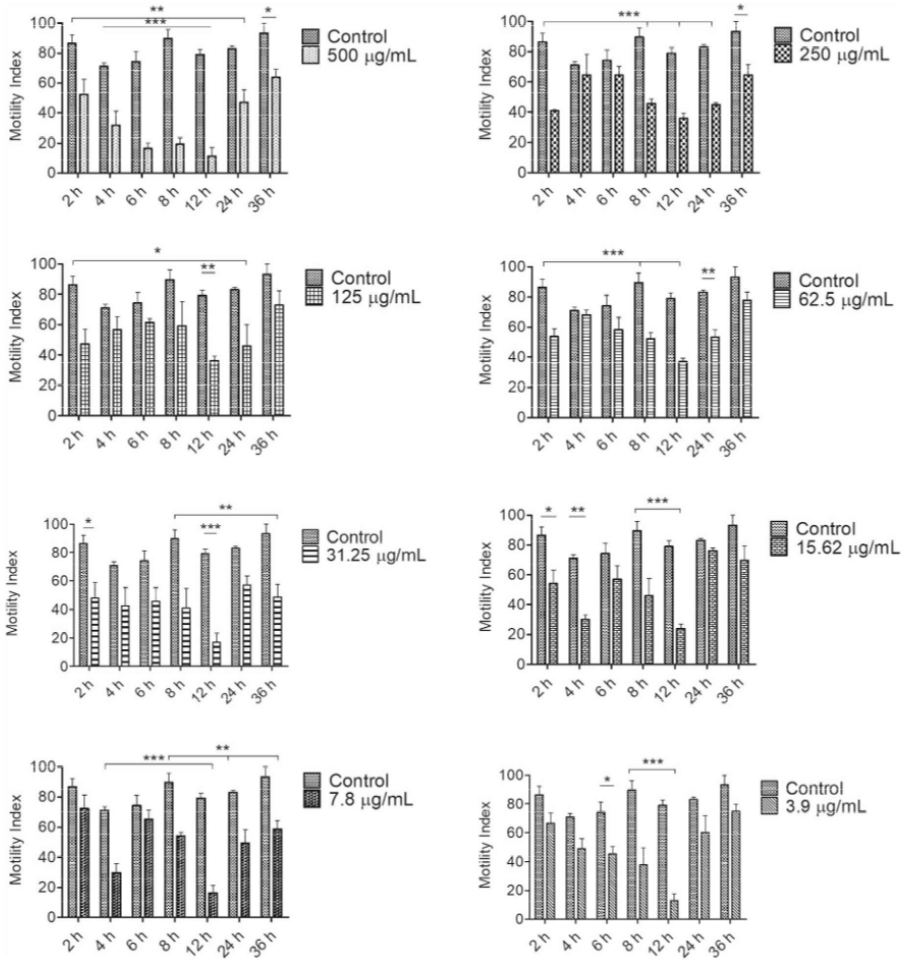



**Fig. 1.** Effect of WSMoL (Water Soluble *Moringa oleifera* Lectin) on the motility index (in percentage) of *Haemonchus contortus* larvae at stage L3 after 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 h of exposure to concentrations from 3.9 to 500 µg $mL^{-1}$ (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$). The horizontal bars represent similar significance in the treatments indicated and the vertical bars represent the standard deviation of the data.

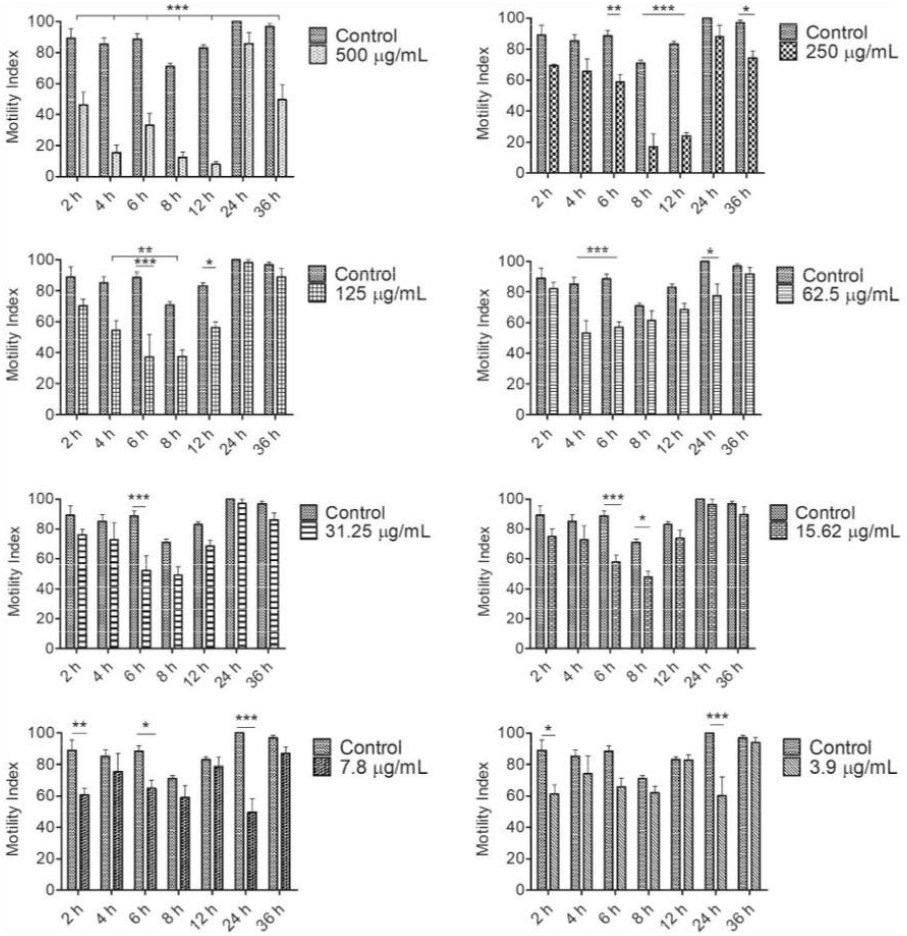



**Fig. 2.** Effect of cMoL (coagulant *Moringa oleifera* Lectin) on motility index (in percentage) of *Haemonchus contortus* larvae at stage L3 after 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 h of exposure to concentrations from 3.9 to 500 µg $mL^{-1}$ (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$). The horizontal bars represent similar significance in the treatments indicated and the vertical bars represent the standard deviation of the data.

The highest concentrations of both lectins interfered in the shL3 motility index during the first hours, having a maximum effect after 12 h (11.1% for WSMoL and 8.1% for cMoL) ($p < 0.001$; Figs. 1 and 2) and having a variation in motility after that. The lower concentrations had a later effect and also showed a recovery in motility.

The motility index of the xL3 exposed to WSMoL (at a concentration of 500 µg $mL^{-1}$) was 46.3% after 24 h and 30.6% after 72 h ($p < 0.001$; Fig. 3A). Exposure to cMoL at the same concentration resulted in a motility index of 16.4% after 24 h and 24.5% after 72 h ($p < 0.001$; Fig. 3B).

The highest concentration assessed of both lectins promoted a lower motility index in male worms than in female ones after 8 h exposure: 23.3% in the presence of WSMoL and 20% in the presence of cMoL in males (Fig. 4A and C) and 63.3% ($p > 0.05$) in the presence of WSMoL and 26.6% in the presence of cMoL in females (Fig. 4B and D).

### 3.2. Zymogram

The zymogram performed with extracts of adult worms, male and female, exposed for 8 h to the lectins WSMoL and cMoL or not exposed to lectins (negative control), revealed higher proteolytic activity in samples obtained from worms subjected to incubation with the lectins, in extracts of both male and female worms (Fig. 5).

### 3.3. Scanning electron microscopy

Compared to the control group (Fig. 6A and B), the following morphological changes were observed: the presence of aggregates in the anterior part of the worm body treated with WSMoL (Fig. 6D), as well as in the vulva of worms treated with cMoL (Fig. 6F); irregular patterns of the superficial cuticle of the crest along the body of nematodes treated with WSMoL (Fig. 6C); morphological changes in the vulva of females treated with cMoL (Fig. 6F); and distortion in the longitudinal striations

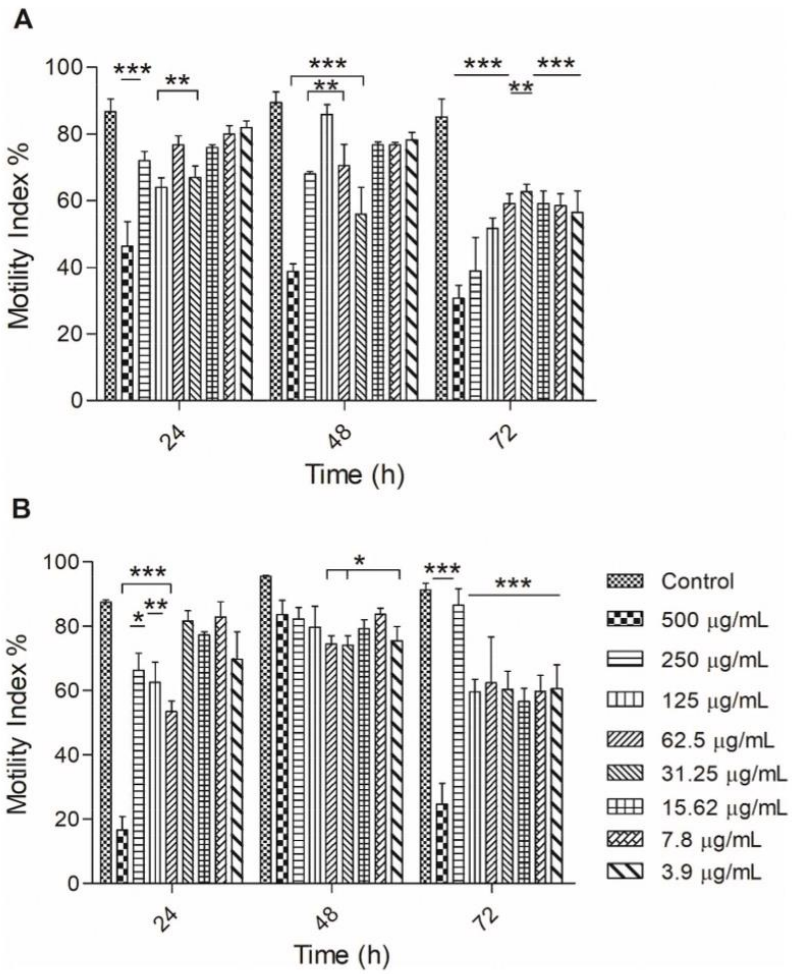



**Fig. 3.** Effect of WSMoL (Water Soluble *Moringa oleifera* Lectin) and cMoL (coagulant *Moringa oleifera* Lectin) on the motility index (in percentage) of *Haemonchus contortus* larvae at stage L3 (larvae without the sheath) drawn after 24, 48 and 72 h of exposure. A: assays with WSMoL (3.9–500 µg mL$^{-1}$). B: assays with cMoL (3.9–500 µg mL$^{-1}$) (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). The horizontal bars represent similar significance in the treatments indicated and the vertical bars represent the standard deviation of the data.

(related to the nerve cords) of worms treated with cMoL (Fig. 6E).

## 4. Discussion

In this study, the lectins WSMoL and cMoL interfered in the motility of infective larvae of *H. contortus* (shL3 and xL3) (Figs. 1–3), with a lower index of motility in xL3 exposed to cMoL. xL3, upon losing their sheath, may become more sensitive to volatile anthelmintics (Molan et al., 2003) as the test revealed that cMoL has greater paralyzing effect on the larvae without the sheath protection. In the infective stage of *H. contortus*, motility is a characteristic of extreme importance in the infection process, as is the presence of the sheath, which gives stability in the face of environmental conditions (free phase) and in the beginning of the infection process in the host (parasitic phase) (Fetterer and Rhoads, 1993; Fleming et al., 2006; Brunet et al., 2007; Page et al., 2014).

In the tests of motility index in adult worms, it was observed that the lectins require a longer time of incubation in females to cause a significant change in motility, in comparison with the data obtained with the males (Fig. 4B and D), and that cMoL promoted a lower percentage of motility in females than WSMoL. The size of the female worms (larger than the males) and their functional particularities for the perpetuation of the species (because they are responsible for the development of the eggs) are characteristics that, hypothetically, suggest an explanation for the greater tolerance to treatments associated with this gender.

The anthelmintic activity of WSMoL has already been previously evaluated in tests of hatchability of eggs and larval development; WSMoL has shown significant effects, with bioaffinity for components of eggs and larvae (Medeiros et al., 2018). This study is the first report of anthelmintic activity of cMoL.

Treatments with WSMoL and cMoL promoted an increase in the proteolytic enzymatic activities of male and female worms of *H. contortus* (Fig. 5), contributing to their nematicidal effects. Dysfunctions in the activity of proteolytic enzymes can trigger different metabolic damage (López-Otín and Bond, 2008). Thus, an increase or decrease of the

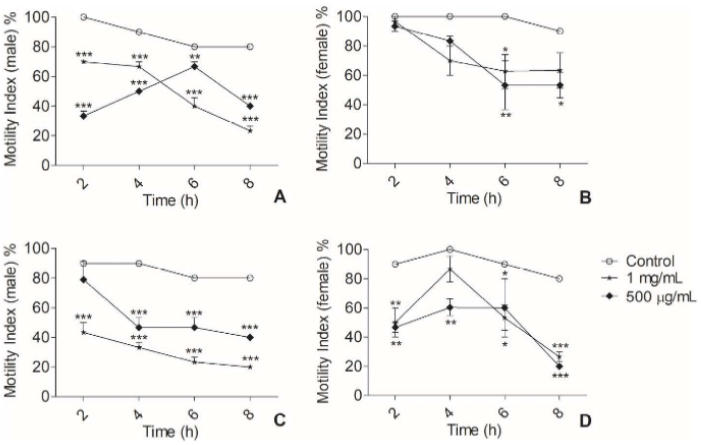



**Fig. 4.** Motility index of adult worms (males and females) of *Haemonchus contortus* after 8 h exposure to WSMoL (Water Soluble *Moringa oleifera* Lectin) and cMoL (coagulant *Moringa oleifera* Lectin). A and B: tests with male and female worms, respectively, exposed to WSMoL (1 mg $mL^{-1}$ and 500 µg $mL^{-1}$). C and D: tests with male and female worms, respectively, exposed to cMoL (1 mg $mL^{-1}$ and 500 µg $mL^{-1}$). (Control) represents the negative control containing Luria Bertani medium. The vertical bars represent the standard deviation of the data. (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

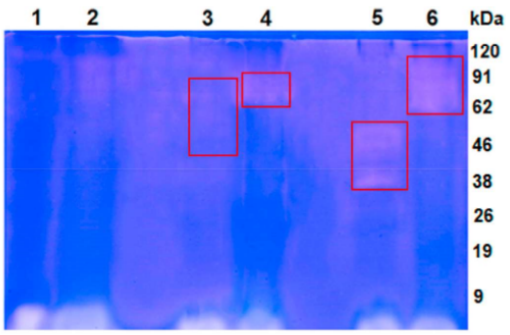



**Fig. 5.** Zymogram of total proteases of extracts of adult worms from *Haemonchus contortus* after 8 h of incubation with WSMoL and cMoL (1 mg $mL^{-1}$). Lines 1 and 2: extract of male and female worms, respectively, from the negative control; lines 3 and 4: extract of male and female worms, respectively, after incubation with cMoL; lines 5 and 6: extract of male and female worms, respectively, after incubation with WSMoL. Red squares represent protease activity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

protease activity of metalloproteinases, cysteine-peptidases and serine peptidases can interfere in the developmental cycle of nematodes, interfering with the vital functions of worms (Karanu et al., 1993, 1997; Laing et al., 2013; Medeiros et al., 2018).

The microscopic analysis performed in this study showed morphological changes in worms exposed to lectins, mainly in the proper development of cuticle crests and vulva morphology. Chlorine channels regulated by glutamate (GluCl) are a family of ionic channels present in the provision of vertical striations or longitudinal striations in nematodes and are important targets for paralyzing anthelmintics (Portillo et al., 2003). Damage to these channels may contribute to motility dysfunction, as well as interfere in the reproduction and development of worms.

The cuticular protein load is distinct at different developmental stages of nematodes, and interactions have already been observed among proteins on the surface of adult nematodes and infective larvae with a N-acetylglucosamine-specific lectin (WGA - wheat germ agglutinin) (Fetterer and Rhoads, 1993; Ríos-De Álvarez et al., 2012). WSMoL and cMoL have the ability to interact with soluble N-acetylglucosamine and chitin (a polysaccharide which decomposes into this monosaccharide) (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Paiva et al., 2011), and can therefore interact with the nematode cuticle, since this structure contains regions rich in glycoproteins and lipids (Fetterer and Rhoads, 1993; Molan et al., 2003). In addition, a molecular disorder in the cuticle can trigger paralysis in these worms, interfering in motor functions and physiological characteristics (such as mobility, feeding behavior and reproduction) (Fetterer and Rhoads, 1997; Molan et al., 2003; Iqbal et al., 2007; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2013; Andre et al., 2016), suggesting that the interaction of lectins with cuticle components is distinct at different stages of development of the nematode analyzed.

In the tests, the incubation time with the substance assayed is also important, and after a given time of incubation of adult worms under *in vitro* conditions, viability can decline significantly, regardless of the action of the substance tested, as a result of physiological conditions required by the worms (such as the obtaining of nutrients by the cuticle and hematophagous habit) (Fetterer and Rhoads, 1993; Geary et al., 1993). In this study, several incubation solutions were tested (PBS, 0.9% NaCl solution, distilled water and LB medium), and only the LB medium allowed better viability of worms in the negative control, after 8 h of incubation (data not shown). Another important aspect is that the different motility indices (after different exposure times to the lectins), observed in the tests with the infective larvae, can be explained by possible mechanisms of tolerance against the lectins tested, since the larvae used in the tests were resistant to the main classes of anthelmintics (Rudin, 1990; Maizels et al., 1993; Kumarasingha et al., 2016).

The hemagglutinating activity maintained at low pH of both lectins (WSMoL at pH 4.5 and cMoL is a highly stable protein, active at a pH range of 4.0–9.0) (Santos et al., 2005, 2009) is a desirable characteristic for *in vivo* tests, either to evaluate anthelmintic action on the nematodes present in the rumen (usually a neutral pH) or in the abomasum (acid pH). In addition, WSMoL and cMoL showed no toxic effects evident in *in vitro* toxicity tests, as well as lack of *in vivo* toxicity of preparations with the seeds of *M. oleifera*, which allow for the possibility of carrying out *in vivo* analyses in experimental models involving the species *H. contortus* (Rolim et al., 2011; Araújo et al., 2013; Luz et al., 2017).

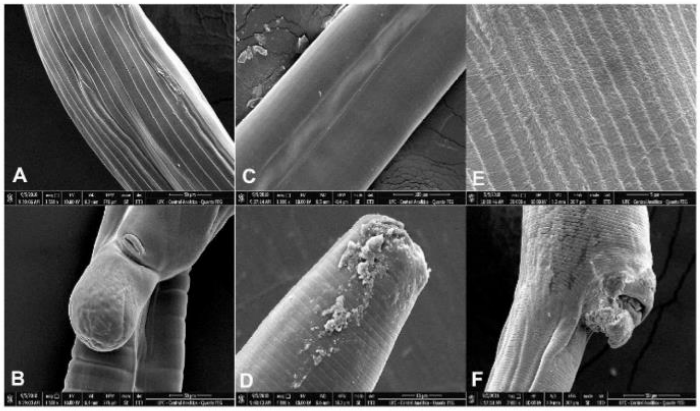



**Fig. 6.** Scanning electron microscopy of adult worms of *Haemonchus contortus* after 8 h of exposure to WSMoL (Water Soluble *Moringa oleifera* Lectin) and cMoL (coagulant *Moringa oleifera* Lectin), under incubation in Luria Bertani medium. A and B: worms of the negative control (cuticle and vulva, respectively). C and D: worms exposed to 1 mg $mL^{-1}$ of WSMoL (cuticle and anterior part of the body, respectively). E and F: worms exposed to 1 mg $mL^{-1}$ of cMoL (longitudinal ridges and vulva, respectively).

## Authors' contributions

All authors contributed to the conception, data acquisition, analysis and interpretation of this study. MLSM, MDCS, ACDSB and LCBBC critically revised the manuscript for important intellectual content and gave final approval. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Consent for publication

Not applicable.

## Availability of data and material

The data will not be shared. All data is contained that paper.

## CRediT authorship contribution statement

**Mário L.S. Medeiros:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Project administration. **Robson R.V. Alves:** Methodology. **Benny F. Oliveira:** Methodology. **Thiago H. Napoleão:** Methodology, Formal analysis, Resources, Funding acquisition. **Patrícia M.G. Paiva:** Methodology, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Luana C.B.B. Coelho:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Ana C. D.S. Bezerra:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Michele D.C. Silva:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Software: Programming, software development; designing computer programs; implementation of the computer code and supporting algorithms; testing of existing code components. Data Curation: Management activities to annotate (produce metadata), scrub data and maintain research data (including software code, where it is necessary for interpreting the data itself) for initial use and later reuse.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors are thankful to the Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) and to the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for research grants (CNPq – process numbers 308640/2015–2, 306809/2015–0 and 446902/2014–4) and fellowships (THN, PMGP, LCBBC).

## References

Andre, W.P.P., Ribeiro, W.L.C., Cavalcante, G.S., Santos, J.M.L., Macedo, I.T.F., Paula, H. C.B., Freitas, R.M., Morais, S.M., Melo, J.V., Bevilaqua, C.M.L., 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. Vet. Parasitol. 218, 52–58.

Araújo, L.C.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V.B., Barros, A.L.S., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C.B.B., Silva, T.G., Paiva, P.M.G., 2013. Evaluation of cytotoxic and anti inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. PloS One 8, e81973.

Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin rich plant extract (sainfoin) both in vitro and *in vivo*. Parasitology 134, 1253–1262.

Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.F., Paiva, P.M.G.P., 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere 77, 934–938.

Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T. H., Correia, M.T.S., 2017. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 1594074.

Chagas, A.C., Katiki, L.M., Silva, I.C., Giglioti, R., Esteves, S.N., Oliveira, M.C., Barioni Júnior, W., 2013. *Haemonchus contortus*: a multiple resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. Parasitol. Int. 62, 1–6.

Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Santos, A.F.S., Sá, R.A., Carneiro da Cunha, M.G., Morais, M.M.C., Silva Lucca, R.A., Oliva, M.L.V., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2011. Coagulant and antibacterial activities of the water soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. Lett. Appl. Microbiol. 53, 186–192.

Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1993. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. Vet. Parasitol. 46, 103–111.

Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1997. The *in vitro* uptake of albumin by adult *Haemonchus contortus* is altered by extracorporeal digestion. Vet. Parasitol. 73, 249–256.

Fleming, S.A., Craig, T., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Navarre, C., Rings, M., 2006. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. J. Vet. Intern. Med. 20, 435–444.

Gainza, Y.A., Fantatto, R.R., Albuquerque, A.C.A., Amarante, A.F.T., Ferraz Júnior, R.S., Niciura, S.C.M., Chagas, A.C.S., 2019. Padronização do teste de desenvolvimento larvar (TDL) para diagnóstico da resistência anti helmíntica em Haemonchus contortus. São Carlos - SP: Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

García Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Anal. Biochem. 214, 65–69.