

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

**TESE DE DOUTORADO**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LECTINA DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) CONTRA ESPÉCIES DE  
*Candida* E *Cryptococcus***

**LEILANE MARINA MORAIS DOS SANTOS**

**RECIFE  
2021**

**LEILANE MARINA MORAIS DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LECTINA DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) CONTRA ESPÉCIES DE  
*Candida* E *Cryptococcus***

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Orientador:**

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

**Coorientadoras:**

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos

Dra. Pollyanna Michelle da Silva

**RECIFE  
2021**

Catálogo na Fonte:  
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Santos, Leilane Marina Morais dos

Investigação do potencial antifúngico de lectina de sementes de *Moringa oleífera* (WSMoL) contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus* / Leilane Marina Morais dos Santos – 2021.

82 f. : il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadoras: Nataly Diniz de Lima Santos e Pollyana Michelle da Silva  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Lectinas 2. Cândiase 3. Leveduras I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.). II. Santos, Nataly Diniz de Lima (coorient.) III. Silva, Pollyana Michelle da (coorient.) IV. Título

572.6

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-241

LEILANE MARINA MORAIS DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LECTINA DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) CONTRA ESPÉCIES DE  
*Candida* E *Cryptococcus*

Tese apresentada para o cumprimento  
parcial das exigências para obtenção  
do título de Doutora em Bioquímica e  
Fisiologia pela Universidade Federal  
de Pernambuco

Aprovada em: 29/01/2021

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Titular Interno)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (Titular Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Thamara Figueiredo Procópio (Titular Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Marília Cavalcanti Coriolano – (Titular Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Em honra a todos os meus ancestrais e ao meu irmão Leandro.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar esta oportunidade e comandar esse fluxo universal que permitiu que eu estivesse aqui agora finalizando esta etapa. Gratidão Infinita!

À minha família, meus pais, Mário e Nadir, que me deram a oportunidade da Vida e que possibilitaram que eu estivesse aqui, agora, e mesmo com todas as dificuldades que tiveram na vida sempre me contemplaram com seus esforços. Gratidão Infinita! E ao meu irmão que não pode presenciar essa vitória, mas em algum lugar sei que está feliz por essa conquista.

Ao meu orientador Thiago Napoleão, sempre muito presente, solícito e muito dedicado a todas as etapas, desde a iniciação científica até o presente momento. Tive o privilégio de ser orientada por ele desde o mestrado! E as minhas coorientadoras Pollyanna Silva, que me acompanhou em todas as etapas nos experimentos, e Nataly Santos, também sempre disponível e disposta a ajudar. Sou muitíssimo Grata a vocês!!!

A todas as pessoas do Departamento de Bioquímica que me acompanham desde a graduação até aqui. Desde professores funcionários e colegas de trabalho. E aos alunos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (Bioprot) que sempre me ajudaram quando eu precisei principalmente quando entrei no laboratório ainda meio perdida. =)

À minha família Espiritual, que me deu todo um suporte psicológico e emocional e esteve comigo nos momentos mais difíceis. Com vocês eu me redescubro e ressignifico minha trajetória nas ciências, no ensino.... na vida, buscando integrar minha trajetória profissional e dando um novo significado e proposito muito maior para tudo que tenho feito.

A todos os meus terapeutas, que estiveram comigo nas fases mais difíceis preservando minha sanidade mental e emocional e contribuindo para que eu não surtasse durante as dificuldades (Risos!). Terminar um doutorado não é fácil e em tempos de pandemia menos ainda. Tive a Graça de ter tantas pessoas me apoiando nesse momento tão difícil e sou grata demais por isso.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado e me apoiaram para que eu estivesse aqui agora tendo mais uma conquista, e estiveram comigo em momentos de dificuldades e nas alegrias.

Aos familiares, amigos e colegas que mesmo na distância torcem pelo meu sucesso.

Sou Grata!!

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johan Goethe

## RESUMO

*Moringa oleifera* Lamarck (Moringaceae) é uma planta com sementes contendo lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos), dentre elas a lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera* (WSMoL). O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme de WSMoL contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, bem como efeitos subcelulares que possam estar relacionados com essa lectina. WSMoL foi isolada por cromatografia em coluna de quitina seguindo procedimento previamente estabelecido. A atividade antifúngica foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo ensaio de microdiluição e a concentração mínima fungicida (CMF) que foi obtida a partir da CMI, sendo um inoculado em placa de petri contendo Sabouraud. Foram estabelecidas as curvas de crescimento na ausência e presença da lectina em concentrações que variaram entre  $4 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$ ,  $\frac{1}{2}\text{MIC}$ , ou  $\frac{1}{4}\text{MIC}$ . Através de citometria de fluxo, utilizando sondas fluorescentes apropriadas, foram investigadas a ocorrência de morte celular por apoptose ou necrose, alterações no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e influência na integridade lisossomal. Adicionalmente, foi avaliada a atividade antibiofilme de WSMoL sobre o isolado *Cryptococcus neoformans* B3501, apenas nessa cepa por ter sido capaz de formar biofilme. WSMoL apresentou efeito inibitório no crescimento de todas as espécies de *Candida* com CMI de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Atividade fungicida foi detectada, sendo os menores valores de CMF para *C. glabrata* e *C. krusei* (20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). O ensaio de cinética de crescimento revelou que o efeito fungistático se inicia entre nona e a décima nona hora de incubação, dependendo da espécie de *Candida*. A WSMoL, na CMI, teve o número de células apoptóticas e necróticas aumentado após 24 horas de incubação em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Já para *C. parapsilosis*, houve aumento somente no número de células apoptóticas. Após 12 h de incubação, WSMoL induziu hiperpolarização da membrana mitocondrial das células de *Candida*, seguida por redução do  $\Delta\Psi_m$  com 24 horas. Danos à integridade dos lisossomos não foram detectados nas células de *Candida*. Com relação às leveduras do gênero *Cryptococcus*, WSMoL apresentou efeito fungistático (CMI: 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre as linhagens B3501 e H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*, porém não foi detectada ação fungicida. Foi observado que na CMI a cepa H99 apresentou um maior número de células necróticas (9,9% das células em comparação com somente 3,8% no controle negativo). Na mesma concentração não se observou necrose para B3501 e R265. As curvas de crescimento indicaram efeito inibitório sobre H99 se iniciando por volta de 12 horas

de incubação. Para B3501 e R265 WSMoL começou a apresentar efeito inibitório a partir de 16 horas e 20 horas, respectivamente. O tratamento com a lectina resultou em danos na integridade dos lisossomos de células de B3501 e R265, bem como despolarização mitocondrial em B3501. WSMoL, em concentrações entre 25 e 400 µg/mL, inibiu a formação de biofilme por *C. neoformans* B3501, único isolado que se mostrou capaz de produzir biofilme. Em conclusão, WSMoL apresenta potencial antifúngico contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* por induzir eventos que comprometem a homeostase celular, o que estimula futuros estudos para a caracterização detalhada do mecanismo de ação dessa proteína.

**Palavras-chave:** Leveduras patogênicas; Criptococose; Candidíase; Lectina ligadora de quitina.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* Lamarck (Moringaceae) is a plant with seeds containing lectins (proteins that bind to carbohydrates), among them the water-soluble lectin from seeds of *M. oleifera* (WSMoL). The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of WSMoL against yeasts of the genera *Candida* and *Cryptococcus*, as well as subcellular effects that may be related to this lectin. WSMoL was isolated by chitin column chromatography following a previously established procedure. The antifungal activity was evaluated by determining the minimum inhibitory (MIC) and minimum fungicide (MFC) concentrations ranging from  $4 \times$  MIC,  $2 \times$  MIC, MIC,  $\frac{1}{2}$ MIC, or  $\frac{1}{4}$ MIC by the microdilution assay. Growth curves were established in the absence and presence of lectin in different concentrations. Through flow cytometry, using appropriate fluorescent probes, the occurrence of cell death due to apoptosis or necrosis, changes in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and influence on lysosomal integrity were investigated. Additionally, the WSMoL antibiofilm activity on the *Cryptococcus neoformans* B3501 isolate was evaluated. WSMoL showed an inhibitory effect on the growth of all *Candida* species with MIC of 20  $\mu\text{g/mL}$ . Fungicidal activity was detected, with the lowest MFC values for *C. glabrata* and *C. krusei* (20 and 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectively). The growth kinetics assay revealed that the fungistatic effect starts between the ninth and nineteenth incubation, depending on the *Candida* species. The WSMoL, at CMI, had the number of apoptotic and necrotic cells increased after 24 hours of incubation in *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*. For *Candida parapsilosis*, there was an increase only in the number of apoptotic cells. After 12 h of incubation, WSMoL induced hyperpolarization of the mitochondrial membrane of *Candida* cells, followed by a reduction in  $\Delta\Psi_m$  after 24 h. Damage to the integrity of the lysosomes has not been detected in *Candida* cells. Regarding yeasts of the *Cryptococcus* genus, WSMoL had a fungistatic effect (CMI: 6.25  $\mu\text{g/mL}$ ) on isolates B3501 and H99 of *Cryptococcus neoformans* and R265 of *Cryptococcus gattii*, but no fungicidal action was detected. It was observed that in the MIC the H99 strain had a higher number of necrotic cells (9.9% of the cells in compared to only 3.8% in the negative control). The growth curves indicated an inhibitory effect on H99 starting around 12 h of incubation. For B3501 and R265 WSMoL began to show an inhibitory effect after 16 h and 20 h, respectively. Treatment with lectin resulted in damage to the integrity of the lysosomes of B3501 and R265 cells, as well as mitochondrial depolarization in B3501. WSMoL, at concentrations between 25 and 400  $\mu\text{g/mL}$ , inhibited biofilm formation by *C. neoformans*

B3501, the only isolate that was shown to be capable of producing biofilm. In conclusion, WSMoL has antifungal potential against yeasts of the genera *Candida* and *Cryptococcus* for inducing events that compromise cellular homeostasis, which stimulates future studies for the detailed characterization of the mechanism of action of this protein.

**Keywords:** Pathogenic yeasts. Cryptococcosis. Candidiasis. Chitin-binding lectin.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	
<b>Figura 1</b> – Representação esquemática de quatro tipos de lectinas, classificadas quanto ao número e tipo de sítios de ligação em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	20
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática do ensaio de hemaglutinação. O primeiro poço da placa corresponde ao controle (ausência da lectina), em que ocorre a precipitação dos eritrócitos no fundo da placa. Nos demais poços é realizada uma diluição seriada da amostra a fim de se detectar a menor concentração na qual ainda se forma a malha de aglutinação.....	22
<b>Figura 3</b> – Aspectos da <i>M. oleífera</i> .....	25
 <b>Artigo Experimental 1</b>	
<b>Fig. 1</b> – Effects of WSMoL on growth of <i>Candida</i> species. Growth curves of <i>C. albicans</i> (A), <i>C. glabrata</i> (B), <i>C. krusei</i> (C) and <i>C. parapsilosis</i> (D) in absence or presence of WSMoL at 4 × MIC, 2 × MIC, MIC, ½MIC, or ¼MIC. The optical density (O.D.) at 600 nm was determined every hour during 24 h. Negative control cells were cultured in a lectin-free medium. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). MIC: minimal inhibitory concentration.....	50
<b>Fig. 2</b> – Investigation of cell death induced by WSMoL on <i>Candida</i> isolates after incubation for 24 h at the minimal inhibitory concentration (MIC). Cell death was assessed by flow cytometry using annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). In the representative FL1 vs. FL3 dot plots, events corresponding to apoptotic (Ann +) and necrotic cells (PI +) can be seen	

in the quadrants LR and UL, respectively. Cells in late apoptosis or necrosis (AnnV+/PI + ) are represented in quadrant UR. Viable cells are in the quadrant LL. Isopropyl alcohol was used as positive control.....

51

**Fig. 3** – Evaluation of the effects of WSMoL on the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of *Candida* isolates after incubation for 12 h (A) or 24 h (B) with the minimal inhibitory concentration (MIC) of the lectin. The overlay histograms shows the fluorescence of rhodamine 123 in FL1 channel. VI: variation index.....

52

**Fig. 4** – Evaluation of the effect of WSMoL on lysosome integrity of *Candida* isolates after incubation for 24 h with the minimal inhibitory concentration (MIC) of the lectin. The curves show the fluorescence of acridine orange in FL1 channel.....

52

## Artigo experimental 2

**Figura 1** – Crescimento de *Cryptococcus neoformans* B5301 (A) e H99 (B) e de *Cryptococcus gattii* R265 (C) na ausência ou presença de WSMoL na  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI ou  $2 \times$  CMI. A densidade óptica (O.D.) a 600 nm foi determinada a cada hora durante 36 h. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CMI: concentração mínima inibitória.....

63

**Figura 2** – Investigação da morte celular em *Cryptococcus neoformans* B5301 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-tratadas (controle negativo) ou tratadas com WSMoL por 36 h na concentração inibitória mínima (CMI) ou álcool isopropílico a 20% (controle positivo). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo usando anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI). Nos gráficos representativos FL1 vs. FL3,

eventos correspondentes a células apoptóticas (Ann+) e necróticas (PI+) podem ser vistos nos quadrantes LR e UL, respectivamente. As células em apoptose tardia ou necrose (AnnV+/PI +) são representadas no quadrante UR. As células viáveis estão no quadrante LL.....

64

**Figura 3** – Avaliação do efeito de WSMoL na integridade de lisossomos de *Cryptococcus neoformans* B5301 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 após incubação por 36 h com a concentração inibitória mínima (CMI) da lectina. As curvas mostram a fluorescência do laranja de acridina no canal FL1. As linhas vermelha, verde e azul correspondem a controle negativo (NC), WSMoL e controle positivo (PC), respectivamente.....

66

**Figura 4** – Avaliação dos efeitos de WSMoL no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de isolados de células de *Cryptococcus neoformans* B5301 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 após incubação por 36 h com a concentração inibitória mínima (CMI) da lectina. Os histogramas de sobreposição mostram a fluorescência da rodamina 123 no canal FL1. VI: índice de variação.....

67

**Figura 5** – Formação de biofilme e crescimento de *Cryptococcus neoformans* B5301 na ausência (controle) e presença de WSMoL em diferentes concentrações. O crescimento foi avaliado pela densidade óptica a 600 nm). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Letras minúsculas foram usadas para comparação de formação de biofilme e letras maiúsculas para crescimento.....

68

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>ARTIGO DE REVISÃO</b>	
<b>Tabela 1</b> – Lectinas com ação antifúngica sobre espécies de três gêneros de leveduras.....	<b>39</b>
<b>Artigo Experimental 1</b>	
<b>Table 1</b> – Evaluation of the viability of <i>Candida</i> cells treated with the water-soluble lectin from <i>Moringa oleifera</i> seeds (WSMoL).....	<b>50</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Lectinas.....</b>	<b>20</b>
3.2.3	Generalidades .....	20
3.1.2	Atividade antimicrobiana de lectinas.....	24
<b>3.2</b>	<b><i>Moringa oleifera</i> .....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (WSMoL).....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo de Revisão.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.</b>	<b>Artigo Experimental 1.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.</b>	<b>Artigo Experimental 2.....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Moringa oleifera* Lamarck (Moringaceae) é uma planta nativa do Nordeste da Índia, Paquistão e Afeganistão, largamente cultivada na região tropical e subtropical. Apresenta diversas propriedades farmacêuticas, sendo utilizada como remédio para várias doenças na medicina tradicional (KALPANA et al., 2013). Diversos estudos já revelaram seu potencial como fonte de agentes nematicida, tripanocida, imunomodulador, entre outros (MEDEIROS et al., 2018; CORIOLANO et al., 2018; PONTUAL et al., 2018). Suas sementes possuem uma lectina (proteínas que se ligam à carboidratos) solúvel em água (WSMoL; *water-soluble M. oleifera lectin*), a qual já foi avaliada quanto a diversas propriedades, incluindo ação antibacteriana contra espécies patogênicas ou corrosivas (FERREIRA et al., 2011; MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017; CORIOLANO et al., 2020).

As lectinas se ligam a carboidratos de forma específica, podendo ser estes monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Lectinas podem reconhecer e interagir com glicoconjugados e polissacarídeos presentes na superfície celular, propriedade que confere a essas proteínas várias atividades biológicas, pois estas são capazes de interferir na integridade das paredes e membrana celulares, bem como desencadear respostas intracelulares (PROCÓPIO et al., 2017). São moléculas onipresentes na natureza, pois podem ser expressas em animais, plantas e microrganismos (HAMED et al., 2017). As lectinas vegetais desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa contra o ataque de microrganismos (DIAS et al., 2015) e vários estudos já retrataram atividade antimicrobiana de lectinas extraídas de plantas (COELHO et al., 2018). Algumas lectinas vegetais são ativas contra fungos por serem capazes de se ligarem à quitina presente nas paredes celulares, resultando em ação inibitória sobre o crescimento e desenvolvimento, dentre outros efeitos (DIAS et al., 2015).

A candidíase é a infecção fúngica mais comum entre a população humana, normalmente decorrente de um desequilíbrio da flora natural ou de um comprometimento do sistema imunológico (TALATTOF et al., 2018). A incidência de candidemia em hospitais terciários em todo o mundo aumentou substancialmente nas últimas décadas. Além disso, estas infecções prolongam a permanência de pacientes em hospitais, tornando maiores os custos relacionados ao tratamento (NETO et al., 2014). A quitina está presente na parede celular de várias espécies de *Candida* (NOGUEIRA et al 2017; PREECHASUTH et al., 2015), podendo ser um alvo da ação das lectinas. Estudos têm sido realizados a fim de avaliar a atividade

antifúngica de lectinas ligadoras de quitina sobre espécies de *Candida* e seus modos de ação sobre essas leveduras (PROCÓPIO et al., 2017b; SILVA et al., 2018).

Fungos do complexo *C. neoformans/C. gattii* são leveduras cosmopolitas encapsuladas capazes de infectar e causar doenças em muitos hospedeiros, incluindo o homem. A doença causada por esses microrganismos é denominada criptococose, sendo uma infecção sistêmica que pode ser subaguda ou crônica e potencialmente fatal, afetando principalmente as meninges (RAMOS et al., 2018). Pode afetar indivíduos aparentemente imunocompetentes, entretanto é mais frequente em pacientes imunocomprometidos, sendo uma importante infecção oportunista relacionada à AIDS e em receptores de transplante de órgão sólido ou indivíduos em uso de corticoides (GUARANA, et al., 2018).

As infecções fúngicas graves precisam de terapia antifúngica apropriada para que o paciente tenha um resultado bem-sucedido. São utilizadas cinco classes antifúngicas principais: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos de pirimidina (FUENTEFRÍA et al., 2018). Poucas classes de drogas antifúngicas estão, portanto, disponíveis, e o surgimento da resistência a essas classes de drogas, bem como a resistência a múltiplas drogas dificulta muito o manejo do paciente (PERLIN et al., 2017). Outro agravante também é o fato que os medicamentos atuais podem ser limitados por interações medicamentosas e graves efeitos adversos /toxicidades que impedem seu uso prolongado ou aumento da dosagem (WIEDERHOLD, 2017). Como exemplo, tem sido observado o aumento da resistência às equinocandinas, resistência aos azóis e resistência cruzada a duas ou mais classes de antifúngicos principalmente em grandes centros terciários e oncológicos dos Estados Unidos da América (FARMAKIOTIS e KONTOYANNIS, 2017). Gago et al. (2016) avaliaram a resistência de cepas de *Cryptococcus* a antifúngicos e observaram que 29% das cepas foram resistentes ao fluconazol. Lindberg et al. (2019) avaliaram medicamentos antifúngicos contra leveduras isoladas de amostras de sangue de pacientes com candidemia e identificaram suscetibilidades reduzidas ao fluconazol e equinocandinas em *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, respectivamente.

Diante deste contexto, produtos naturais têm se mostrado uma terapia alternativa para o tratamento de candidíase e criptococose. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades antifúngica e antibiofilme de WSMoL sobre leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, bem como os efeitos subcelulares desencadeados por essa lectina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ✓ Investigar o potencial de WSMoL no crescimento, sobrevivência e na capacidade formadora de biofilme de espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

### 2.2 Específicos

- ✓ Realizar uma revisão sobre o estado-da-arte em atividade antifúngica de lectinas contra leveduras patogênicas;
- ✓ Avaliar as atividades fungistática e fungicida de WSMoL contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*;
- ✓ Determinar a cinética de crescimento para as leveduras na ausência e presença da lectina;
- ✓ Investigar a ocorrência de morte de celular por apoptose ou necrose nas células de *Candida* e *Cryptococcus* tratadas com a lectina;
- ✓ Investigar a ocorrência de danos em níveis mitocondrial e lisossomal nas células de *Candida* e *Cryptococcus* tratadas com a lectina;
- ✓ Avaliar a atividade antibiofilme de WSMoL contra o isolado *C. neoformans* B5301.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Lectinas

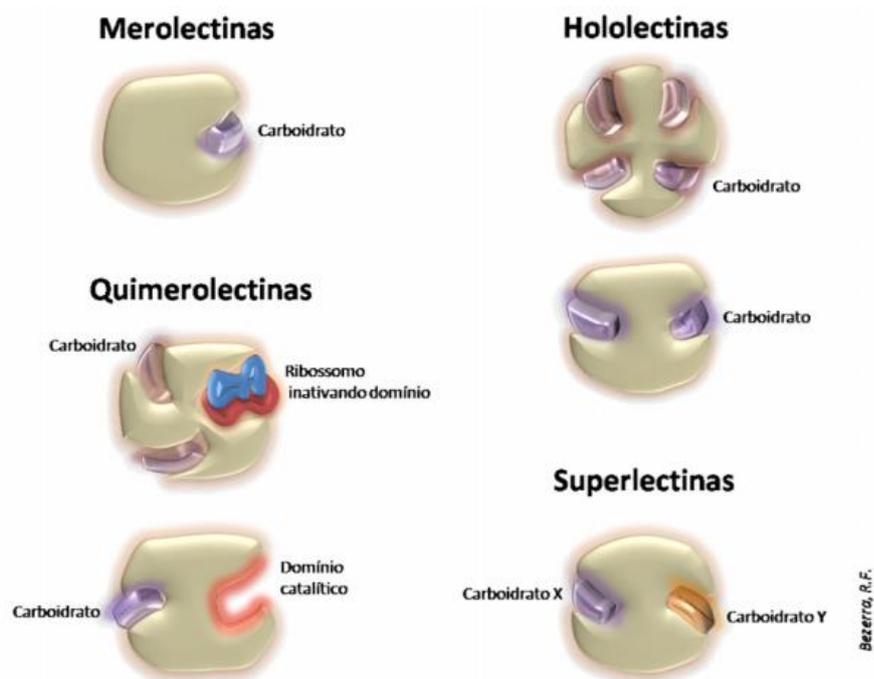
#### 3.2 Generalidades

O termo lectina vem do latim “legere” que significa escolher ou selecionar (KUMAR et al. 2018). As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos de forma reversível e específica; elas não têm origem imune e podem se ligar a açúcares simples (monossacarídeos e dissacarídeos) e complexos (oligossacarídeos e polissacarídeos). A ligação específica da lectina a carboidratos pode resultar em aglutinação celular e precipitação de glicoconjugados. Por isso, as lectinas também são chamadas de aglutininas (HAMED et al., 2017). A interação entre as lectinas e carboidratos ocorre através de ligações não-covalentes, tais como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (PAIVA et al., 2012) e elas diferem-se de enzimas por não alterarem a estrutura covalente do carboidrato ligado (HAMED et al., 2017). As lectinas estão envolvidas no desencadeamento de sinalização celular e respostas bioquímicas em diversos processos biológicos, sendo, portanto, amplamente atuantes no reconhecimento entre as células, proliferação celular, migração celular, adesão à matriz extracelular e interações parasita-hospedeiro (SOUZA et al 2013).

O primeiro relato de lectina foi feito em 1888 por Stillmark, que observou que extratos brutos de mamona (*Ricinus communis*) continham uma proteína chamada ricina, capaz de aglutinar alguns glóbulos vermelhos de animais (HAMID et al., 2013). Por um longo período, essas proteínas foram denominadas hemaglutininas, devido à sua capacidade de aglutinar eritrócitos. Foi presumido por Landsteiner, em 1907, que as ações das hemaglutininas vegetais eram semelhantes às reações de reconhecimento antígeno-anticorpo. Posteriormente, foi isolada a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, denominada como concanavalina A (ConA), sendo demonstrada a capacidade desta proteína de aglutinar eritrócitos, leveduras, bactérias e compostos, tais como grânulos de amido (SHARON e LIS, 2004). No entanto, mais tarde descobriu-se que algumas lectinas não exibiam atividade aglutinante. Foi também definido que as lectinas não induzem alterações na estrutura dos carboidratos aos quais se ligam, e nem têm origem imune, não podendo ser consideradas como anticorpos (DAN et al., 2016).

Com relação ao arranjo molecular as lectinas podem variar consideravelmente desde proteínas monoméricas a proteínas com diferentes subunidades por molécula. De acordo com Van Damme et al. (1998), as lectinas podem ser classificadas quanto ao número e tipos de sítios de ligação, conforme representado na figura 1. Estas lectinas são classificadas em:

- Merolectinas: lectinas com apenas um domínio de ligação a carboidratos, geralmente pequenos peptídeos isolados. Por terem natureza monovalente, esse grupo não pode aglutinar células.
- Hololectinas: apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos idênticos ou homólogos podendo aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas isoladas e caracterizadas pertencem ao grupo das hololectinas.
- Quimerolectinas: inclui todas as lectinas vegetais que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidrato, e um outro domínio com uma atividade catalítica ou uma outra atividade biológica.
- Superlectinas: Lectinas que possuem dois ou mais domínios de ligação a carboidratos, cada um com uma especificidade diferente.



**Figura 1:** Representação esquemática de quatro tipos de lectinas, classificadas quanto ao número e tipo de sítios de ligação em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. Fonte: Bezerra (2009).

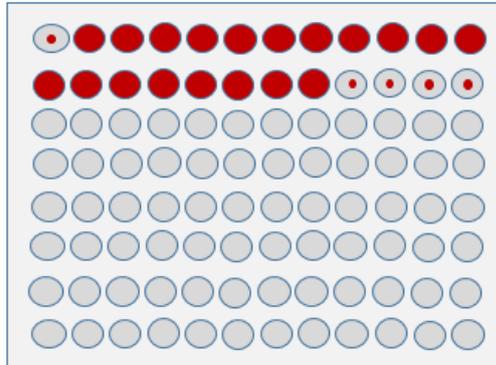
A especificidade de ligação da lectina também pode ser considerada um critério para a classificação. Existem lectinas que se ligam especificamente a monossacarídeos e aquelas que se ligam preferencialmente a oligossacarídeos. Um exemplo de classificação são os grupos de lectinas que se ligam a *N*-acetilglicosamina e quitina; ácidos *N*-glicurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e *N*-acetilmurâmico; ligadoras de glicose/ manose; ligadoras de galactose e *N*-acetil-D-galactosamina; e ligadoras de L-fucose (SHARON e LIS, 1990; KUMAR et al., 2012).

As lectinas são encontradas em uma grande variedade de organismos, como algas, microrganismos, plantas, invertebrados e vertebrados (AKKOUH, 2015). Por reconhecerem carboidratos e glicoconjugados em células, tecidos e fluidos biológicos, as lectinas são valiosas ferramentas na Biotecnologia, incluindo uso em diagnósticos e como agentes terapêuticos (COELHO et al., 2017). As lectinas podem ter diversas atividades biológicas, tais como antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, imunomoduladora, inseticida, entre outras (MITCHELL et al., 2017; ZHANG et al., 2015; GOMES et al., 2012; CATANZARO et al., 2020; FERREIRA et al., 2018).

As lectinas variam em sua solubilidade e estabilidade de acordo com a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, podendo essas características estruturais serem exploradas para obtenção de preparações concentradas de lectinas e para purificação das mesmas (PAIVA et al., 2011). O isolamento das lectinas pode ser realizado por uma combinação de diferentes técnicas de purificação. Para precipitar lectinas podem ser usados ácidos (por exemplo, ácido acético), solventes orgânicos (por exemplo, acetona) ou sal (por exemplo, sulfato de amônio) (NAAEMM et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; SANTOS et al., 2021). Métodos cromatográficos, incluindo cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia e filtração em gel, podem ser utilizados (LAM e NG, 2011). As condições da coluna utilizadas nas etapas cromatográficas para lavagem, adsorção e dessorção (incluindo volume e concentração de proteína da amostra, tamanho do poro e carga da matriz, comprimento da coluna, temperatura, solução usada dessorção, a velocidade do fluxo e o volume da fração coletada) são definidos a fim de aumentar o rendimento e o grau de pureza. A escolha do método cromatográfico é realizada de acordo com as características bioquímicas da lectina (PAIVA, P. M. G et al., 2010).

O método mais utilizado para detecção de lectinas é o ensaio de hemaglutinação (Figura 2). Nesse ensaio, a ligação de lectinas a glicoconjugados na superfície do eritrócito forma uma rede que mantém os eritrócitos aglutinados e suspensos em solução, fenômeno chamado de

atividade hemaglutinante. Esse ensaio pode ser realizado em placas de microtitulação e é de fácil visualização (PAIVA et al., 2012).



**Figura 2:** Representação esquemática do ensaio de hemaglutinação. O primeiro poço da placa corresponde ao controle (ausência da lectina), em que ocorre a precipitação dos eritrócitos no fundo da placa. Nos demais poços é realizada uma diluição seriada da amostra a fim de se detectar a menor concentração na qual ainda se forma a malha de aglutinação. Fonte: A autora

Para confirmação da presença de lectinas, é necessário realizar o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, uma vez que componentes como taninos, flavonoides, íons e enzimas são capazes de dispersar ou lisar os eritrócitos, o que resulta em aspecto visualmente similar no ensaio de hemaglutinação (pseudo-aglutinação). O teste de inibição explora a capacidade específica das lectinas de se ligarem a carboidratos livres em solução, que ocupam os sítios de ligação a carboidratos e impedem a interação da lectina com os glicoconjugados da superfície dos eritrócitos (PAIVA et al., 2012). O ensaio de hemaglutinação também permite avaliar a estabilidade da lectina a valores de pH e temperatura, podendo assim determinar as condições a serem utilizadas na aplicação biotecnológica da lectina. Além disso, o ensaio pode revelar especificidade de carboidratos da lectina, através da definição definida pelo carboidrato que inibe mais efetivamente a atividade hemaglutinante (PAIVA et al., 2010).

O interesse pelas lectinas tem se intensificado devido à sua especificidade para carboidratos, pois podem ser reagentes valiosos para a investigação de açúcares da superfície celular, purificação e caracterização de glicoproteínas (SING et al., 2014). Centenas de lectinas vegetais foram isoladas e caracterizadas em graus variados, principalmente em sementes. A diversidade estrutural dessas proteínas requer mais estudos para aprimorar a compreensão de suas diferentes propriedades, bioquímicas e funcionais (POMPEU et al.,

2015). É improvável que todas as funções e aplicações das lectinas tenham sido identificadas. Sua ampla ocorrência e suas propriedades bem definidas de ligação a carboidratos são ferramentas importantes no campo da Glicobiologia, Imunologia, Biotecnologia. (NASI et al., 2009 POMPEU et al., 2015).

Quanto a especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser monoespecíficas ou poliespecíficas. Este último grupo engloba lectinas que podem interagir com mais de um açúcar (ZUBČEVIĆ et al., 2018). As lectinas de plantas podem ser categorizadas em doze famílias com base na similaridade estrutural do domínio de reconhecimento de carboidratos: amarantinas; homólogas da aglutina de *Agaricus bisporus*; aglutininas relacionadas a quitinases; aglutininas da família *Euonymus*; cianovirinas; família da aglutinina de *Galanthus nivalis*; lectinas com domínio heveínico; lectinas relacionadas à jacalina; lectinas de leguminosas; lectinas com domínio LysM; Nictaba; lectinas da família ricina-B (JIANG et al., 2015; CHANG-SHAN et al., 2018).

### 3.1.2. Atividade antimicrobiana de lectinas

Lectinas de plantas com atividades antibacterianas e antifúngicas contra microrganismos causadores de doenças humanas têm sido isoladas de sementes, cerne, cladódios e folhas (GOMES et al., 2013). A atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem sido explicada pela interação das lectinas com resíduos de carboidratos acessíveis da parede celular ou membrana celular incluindo os ácidos teicoicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (QADIR et al., 2013). Esta ligação pode desencadear uma cascata de respostas biológicas e, conseqüentemente, inibir a motilidade e multiplicação de micro-organismos (POMPEU et al. 2015).

Devido ao fato de os fungos serem os principais patógenos presentes em culturas vegetais, subentende-se que as plantas exibam uma variedade de respostas de defesa à infestação por fungos. Dentre estas respostas, está o aumento da expressão de quitinases, proteínas inibidoras de proteases e proteínas ligadoras de quitina (dentre essas, as lectinas). Supostamente, a maioria dessas respostas se desenvolveu para combater infecções fúngicas, embora também tem sido demonstrado que lectinas ligadoras de quitina possuem atividade inseticida (BUETER et al., 2013).

A quitina é um dos polímeros de carboidratos mais abundantes na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Apresenta cadeia linear e é composta de unidades de *N*-acetilglicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta 1 \rightarrow 4$ , sendo encontrada nos

exoesqueletos de insetos, paredes celulares de fungos, ovos de nematódeos, diatomáceas marinhas e conchas de crustáceos e zooplâncton (ZIATABAR et al. 2018; CHANG-SHAN et al., 2018).

Os peptídeos semelhantes à heveína são uma família de peptídeos ricos em cisteína e com capacidade de ligação à quitina, consistindo em 29-45 aminoácidos (KINI et al., 2015). São classificados em um amplo esquema como módulos de ligação de carboidratos que incluem lectinas (WONG, K. H. et al. 2017). Sua propriedade de ligação de quitina é essencial para a defesa da planta contra fungos (KINI et al., 2015). Apesar de se saber que a heveína apresenta uma afinidade relativamente fraca para quitina-oligossacarídeos, outras lectinas ligadoras de quitina tem múltiplos domínios de ligação a carboidratos e suas sequências de aminoácidos são significativamente diferentes, incluindo os resíduos aromáticos (ITAKURA et al., 2017). A inibição do crescimento fúngico pode ocorrer através da ligação da lectina a componentes da parede das hifas e células fúngicas, resultando em má absorção de nutrientes, bem como pela interferência nos processos de germinação dos esporos (QADIR et al., 2013).

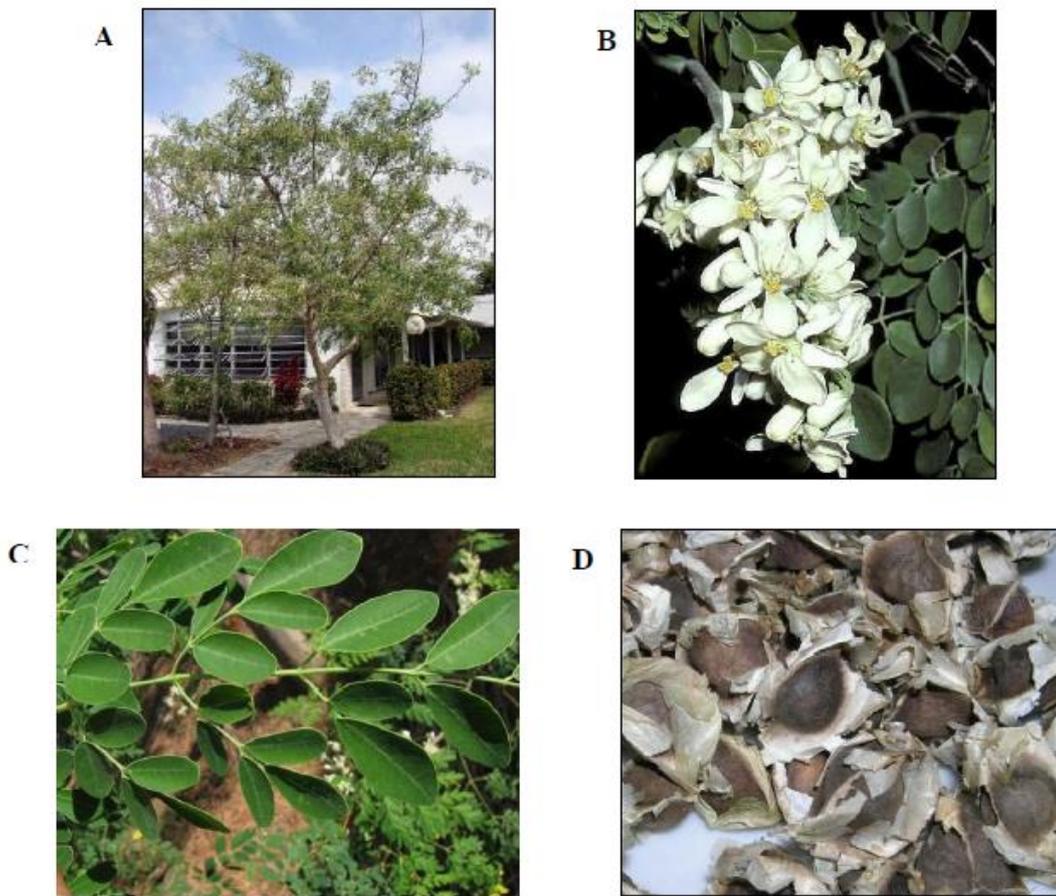
A atividade antifúngica de lectinas, principalmente contra leveduras patogênicas é abordada em maiores detalhes na seção 4.1 dessa tese, que apresenta um artigo de revisão sobre o tema. Maiores detalhes sobre os gêneros investigados nessa tese (*Candida* e *Cryptococcus*) também são apresentados na mesma seção.

### 3.2. *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* (Figura 3) é uma planta da família Moringaceae, que inclui outras 12 espécies. É uma das espécies mais conhecidas e amplamente distribuídas da família, podendo crescer em trópicos úmidos ou terras quentes, sendo pouco afetada pela seca (FARES et al., 2007). No Brasil, está distribuída amplamente, inclusive por toda região do semiárido. (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Seu epíteto específico se refere à quantidade de óleo que pode ser encontrada em suas sementes (AYERZA, 2011).

É uma planta comestível que apresenta grandes potenciais nutricional e medicinal, atribuídos a suas raízes, casca, folhas, flores, frutos e sementes (SHARIFUDIN et al., 2013). Nas Filipinas, é conhecida como “melhor amiga da mãe” devido a sua utilização para aumentar a produção de leite da mulher, sendo também prescrita para anemia (ANWAR, F. et al., 2007). Altamente valorizada no mundo antigo, a *M. oleifera* foi bastante utilizada pelos romanos, gregos e egípcios, que extraíam o óleo das suas sementes e usavam como perfume e

loção para a pele (DIXIT, S. et al., 2016). *M. oleifera* também é utilizada para purificação de água e produção de biodiesel (SAINI et al., 2016). Diversas atividades biológicas como atividades antiproliferativa, antimicrobiana, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, entre outras, são relatadas para compostos funcionais presentes em variadas partes da planta (ZAFFER et al., 2014; TILOKE et al., 2016; FITRIANA et al., 2016; MARTÍNEZ-GONZALEZ et al., 2017).



**Figura 3:** Aspectos da *M. oleifera*

(A) Aspecto geral. (B) Flores. (C) Folhas. (D) Sementes. Fonte: SANTOS (2013).

Análises fitoquímicas demonstraram que suas folhas são ricas em potássio, cálcio, fósforo, ferro, vitaminas A e D, aminoácidos essenciais e conhecidos antioxidantes, como  $\beta$ -caroteno, vitamina C, e flavonoides (MBIKAY et al., 2012). Suas sementes contêm até 40% de óleo, com uma composição de ácidos graxos de alta qualidade (ácido oleico > 70%) e, após refinação, uma notável resistência à degradação oxidativa (ANWAR, 2005; LEONE e

BHANGER, 2016). Suas propriedades tornam o óleo adequado tanto para consumo humano quanto para fins comerciais (LEONE et al., 2016).

### 3.2 Lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL)

As sementes de *M. oleifera* contêm uma lectina solúvel em água denominada WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) (SANTOS et al. 2005). Essa lectina é proteína ácida com ponto isoelétrico (pI) 4,5 e massa molecular de 60 kDa, capaz de se ligar à quitina e sua atividade hemaglutinante é inibida por frutose e glicose (COELHO et al., 2009; ROLIM et al., 2011; MOURA et al., 2016). Além da WSMoL, foram isoladas mais duas lectinas de sementes de *M. oleifera*: a cMoL (*coagulant M. oleifera lectin*) e a MoL (*M. oleifera lectin*), as quais são proteínas básicas (KATRE et al., 2008; LUZ et al., 2013), diferentemente de WSMoL.

Diversas atividades biológicas já foram relatadas para WSMoL. Coelho et al. (2009) relataram a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e Agra-Neto et al. (2014) mostraram que essa ação larvicida está relacionada com o estímulo da atividade de proteases intestinais, causando danos à homeostase desse órgão. Essa lectina também apresentou atividade ovicida e efeito repelente de oviposição sobre o *A. aegypti*, tanto em condições de laboratório quanto de campo simulado (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Estudo demonstrou que a atividade ovicida de WSMoL está relacionada com o rompimento da rede exocoriônica, resultando em deformação e degeneração da superfície dos ovos; também foi demonstrado que WSMoL é capaz de penetrar no trato digestivo do embrião (ALVES et al., 2020).

A ação estimulante de oviposição de WSMoL está relacionada com receptores gustatórios presentes no corpo das fêmeas grávidas e não com respostas olfativas; foi demonstrado que essa lectina é capaz de se ligar a proteínas de membrana extraídas das patas das fêmeas de *A. aegypti*, dentre as quais foram identificadas proteínas com similaridades com transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassettes*) (SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2020). Foi relatado que a irradiação de WSMoL com uma dose baixa (10 mGy) de radiação gama aumenta os efeitos deletérios dessa lectina sobre ovos e larvas do *A. aegypti* (SANTOS et al., 2020). Por fim, outro estudo relatou que fêmeas adultas de *A. aegypti* que se desenvolvem a partir de larvas tratadas com preparação enriquecida de WSMoL apresentam capacidade reduzida de ingurgitamento após o repasto sanguíneo, com consequente comprometimento de sua fertilidade e fecundidade (SILVA et al., 2019). Os autores afirmam

que esses resultados foram provavelmente devido aos danos à organização do intestino médio e ao comprometimento do processo de remodelação intestinal durante a metamorfose.

WSMoL mostrou ser agente inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger* (PAIVA et al., 2011) e foi capaz de prejudicar a fisiologia nutricional de adultos do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (OLIVEIRA et al., 2020). Uma pesquisa mostrou que essa lectina é capaz de se ligar à matriz peritrófica de larvas de *Anagasta kuehniella*, causando um bloqueio parcial dos poros dessa matriz e interferindo na circulação e atividade de enzimas digestivas, o que levou à redução no ganho de peso e extensão do período larval (OLIVEIRA et al., 2017).

WSMoL causou redução na eclosão dos ovos e inibiu o desenvolvimento larval de nematódeos gastrointestinais coletados de cabras; o estudo mostrou que WSMoL se ligou a superfície dos ovos (MEDEIROS et al., 2018). Essa lectina inibiu *in vitro* a motilidade de todos os estágios do parasita *Haemonchus contortus* e causou alterações morfológicas, incluindo alterações nas cristas da cutícula, nas estrias longitudinais e na vulva (MEDEIROS et al., 2020).

Foi revelada a capacidade de WSMoL em promover a redução da turbidez de água, propriedade que pode estar relacionada com a redução da resistência elétrica do meio (MOURA et al., 2016). Essa lectina também se mostrou capaz de remover íons metálicos (cádmio, chumbo, cobre, zinco, magnésio, manganês e alumínio) do meio aquoso (FREITAS et al., 2016a). Estudo realizado utilizando água coletada do Riacho do Cavouco mostrou que WSMoL apresentou efeito sinérgico junto ao coagulante sulfato de alumínio para promover a redução da turbidez; adicionalmente a presença da lectina reduziu a quantidade de alumínio residual solúvel na água. Os autores ainda demonstraram que o tratamento com a lectina reduziu a ecotoxicidade da água coletada do riacho para sementes de rúcula e alface (FREITAS et al., 2016b).

A ação citotóxica imunomoduladora de WSMoL e citotóxica em células mononucleares de sangue periférico - PBMC de WSMoL, também foi investigada e essa lectina não apresentou toxicidade para células normais e foi capaz de ativar linfócitos humanos *in vitro* e estimular a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10 e óxido nítrico. (CORIOLANO et al., 2018, CORIOLANO et al., 2020). Com relação às suas propriedades antimicrobianas, WSMoL apresentou atividade antibacteriana contra diversas espécies de bactérias corrosivas e patogênicas. Dentre os efeitos descritos estão atividade bacteriostática e bactericida, alteração da permeabilidade da membrana plasmática, perda da integridade

celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático e ação antibiofilme (MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017; CORIOLANO et al., 2020).

Como uma das etapas necessárias para definir a segurança de WSMoL, Yurre et al. (2020) avaliaram os possíveis efeitos cardiotoxicos desta proteína em camundongos. A administração de WSMoL demonstrou um perfil de segurança cardíaca. Além disso, WSMoL não induziu alterações nos níveis de glicose no sangue ou peso corporal quando comparadas ao controle.

## 4 RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de artigos.

### 4.1. Artigo de Revisão

A revisão de literatura sobre o estado-da-arte na avaliação da atividade antifúngica de lectinas foi construída na forma de capítulo submetido para inclusão no livro “Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes - Volume 2”, a ser publicado pela *Latin American Publications*.

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE LECTINAS SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS: UMA REVISÃO

### Leilane Marina Moraes dos Santos

Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

E-mail: leilanemarina1@gmail.com

### Thiago Henrique Napoleão

Professor Associado da Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

E-mail: thiago.napoleao@ufpe.br

## RESUMO

Muitas espécies de leveduras são componentes normais da microbiota humana. Porém, em determinadas circunstâncias como enfraquecimento do sistema imunológico, algumas espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, e *Trichosporon* podem causar doenças. A candidíase é a causa mais importante de micose oportunista em todo o mundo e a principal causa de infecção nosocomial na corrente sanguínea. A criptococose afeta humanos e diversos animais e, apesar do pulmão ser o local mais comum de entrada do patógeno no corpo, a meningoencefalite é a

manifestação clínica mais comum dessa infecção. A tricosporonose é uma outra infecção oportunista, com taxas de mortalidade de 42% a 90%, sendo relatada como a segunda infecção mais comum por fungemia em pacientes com doenças hematológicas malignas. A resistência a antifúngicos comerciais tem sido uma das causas para o aumento da mortalidade causada por infecções fúngicas invasivas. Nesse cenário, é crescente a busca por novos agentes antimicrobianos que possam servir como alternativas. Lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos) têm sido descritas como agentes antimicrobianos por inibirem crescimento e germinação e induzirem a morte de células fúngicas. Essas proteínas têm se mostrado como importantes alternativas para o combate de infecções causadas por leveduras, sendo o maior número de estudos realizados frente a espécies do gênero *Candida*. Atualmente, constitui um desafio para os pesquisadores a realização de mais estudos visando a avaliação das atividades em modelos *in vivo*. A disseminação da resistência a antifúngicos torna urgente o desenvolvimento de alternativas para uso nas terapias contra infecções causadas por esses microrganismos.

## **ABSTRACT**

Many yeast species are normal components of the human microbiota. However, in certain circumstances such as weakened immune systems, some species of *Candida*, *Cryptococcus*, and *Trichosporon* can cause diseases. Candidiasis is the most important cause of opportunistic ringworm worldwide and the main cause of nosocomial infection in the bloodstream. Cryptococcosis affects humans and several animals and, although the lung is the most common site of entry of the pathogen into the body, meningoencephalitis is the most common clinical manifestation of this infection. Trichosporonosis is another opportunistic infection, with mortality rates from 42% to 90%, being reported as the second most common fungal infection in patients with malignant hematological diseases. Resistance to commercial antifungals has been one of the causes for the increase in mortality caused by invasive fungal infections. In this scenario, the search for new antimicrobial agents that can serve as alternatives is growing. Lectins (proteins that bind to carbohydrates) have been described as antimicrobial agents because they can inhibit growth and germination and induce the death of fungal cells. These proteins have been shown to be important alternatives to fight infections caused by yeasts, with the largest number of studies carried out against species of the genus *Candida*. Currently, it is a challenge for researchers to carry out more studies aimed at

evaluating activities using *in vivo* models. The spread of antifungal resistance makes it urgent to develop alternatives for use in therapies against infections caused by these microorganisms.

## INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo de organismos que se caracterizam por serem eucarióticos, saprófitos ou parasitários. São produtores de esporos e podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuada. A reprodução assexuada ocorre por brotamento, fragmentação ou produção de esporos, enquanto a reprodução sexuada ocorre através da meiose e da fusão, originando núcleos diploides e promovendo a variação genética na população dos fungos (TAN e HSU, 2018). Tanto a quitina quanto a quitosana são polissacarídeos que estão frequentemente incorporados na estrutura da parede celular, ancorando outros componentes na superfície da célula fúngica (BROWN et al., 2020).

Há duas principais formas nas quais os fungos podem se apresentar: leveduras e bolores. Podem também se apresentar de forma dimórfica, ou seja, variarem sua morfologia de acordo com fatores ambientais (CARMONA e LIMPER, 2018). As leveduras são unicelulares e se reproduzem por brotamento, enquanto os bolores formam hifas multicelulares e podem crescer por extensão apical (TAN e HSU, 2018).

As leveduras podem pertencer aos grupos dos ascomicetos (*Saccharomyces* e *Candida*, por exemplo) ou basidiomicetos (por exemplo, *Cryptococcus*, *Malassezia* e *Trichosporon*). Dentre 150.000 espécies de fungos estimadas, aproximadamente 10% são leveduras (GUARRO, 2012). Muitas espécies de leveduras são componentes normais da microbiota humana. Algumas leveduras, porém, são consideradas patógenos oportunistas porque podem causar doenças em determinadas circunstâncias, como enfraquecimento do sistema imunológico.

Segundo Kameswaran e Raghunandhan (2009), de acordo com o local de infecção, as micoses podem ser superficiais, cutâneas, subcutâneas ou sistêmicas (profundas). O ônus causado pelas infecções invasivas por fungos em pacientes nos sistemas de saúde é difícil de mensurar; entretanto, é bem reconhecido que este tipo de infecção está associado a altas taxas de morbimortalidade e custos elevados de assistência médica. Nas últimas décadas, foi observada uma maior prevalência destas infecções devido ao crescente tamanho da população de indivíduos imunocomprometidos, que inclui pessoas vivendo com o vírus da

imunodeficiência adquirida (HIV), receptores de transplante e pacientes com câncer (CASTANHEIRA et al., 2017).

A resistência aos antifúngicos comerciais também tem sido uma das causas para o aumento da mortalidade causada por infecções fúngicas invasivas. Essa resistência pode ser primária (intrínseca) ou secundária (adquirida). A resistência primária ocorre sem exposição prévia ao medicamento. A resistência secundária é gerada após a exposição a um antifúngico e pode estar associada a uma expressão gênica alterada (MAYR e LASS-FLÖRL, 2011).

Os fármacos utilizados atualmente também podem ter seu uso limitado devido a sua toxicidade, como é o caso por exemplo, dos polienos (as formulações de anfotericina B). Os polienos existentes estão disponíveis apenas por via intravenosa (GUBBINS e HELDENBRAND, 2009). Seus efeitos adversos estão relacionados à nefrotoxicidade, limitadora de dose, o que leva à busca contínua de alternativas igualmente eficazes, mas menos tóxicas que poderiam ser administrado tanto por via intravenosa quanto oral (LEWIS, 2011). Nesse cenário, é crescente a busca por novos agentes antimicrobianos que possam servir como alternativas aos antifúngicos atualmente disponíveis.

## **LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

Nesse tópico, apresentaremos informações sobre três gêneros de leveduras para os quais tem sido descrita atividade antifúngica de lectinas.

### ***CANDIDA***

A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, a qual continua sendo a causa mais importante de micose oportunista em todo o mundo e a principal causa de infecção nosocomial na corrente sanguínea (NUCCI et al., 2010). As candidemias são infecções sistêmicas causadas por diferentes espécies de *Candida*, que são responsáveis por 80% dos casos de infecções nosocomiais causadas por fungos. Entretanto, nem todas as espécies desse gênero são responsáveis por causar infecção em humanos. Leveduras do gênero *Candida* são comensais e naturalmente fazem parte da microbiota na mucosa oral, trato gastrointestinal e trato gênito-urinário. O gênero *Candida* inclui cerca de 150 espécies, sendo mais de 17 espécies conhecidas por serem agentes etiológicos de infecção humana; no entanto, mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida*

*glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (MORIS et al., 2008; SARDI et al., 2013).

A parede celular de *Candida* é composta em sua região externa por glicoproteínas altamente manosiladas (GOW et al., 2017). *C. albicans* é um comensal e um patógeno que pode exibir morfologia de leveduras, hifas ou pseudo-hifas. Estas transições morfológicas promovem colonização e invasão em diferentes locais anatômicos e também ocorrem em outras espécies de *Candida*. A forma de levedura está associada à disseminação e a forma hifal à adesão, invasão tecidual e atividade proteolítica (ACHKA e FRIES, 2010). A capacidade de produzir hifas verdadeiras é uma relevante característica em termos de epidemiologia e virulência, encontrada em *C. albicans*, *Candida dubliniensis* e *C. tropicalis* (ZUZA-ALVES, 2017).

*Candida* pode crescer associada a superfícies, incorporadas em uma matriz extracelular composta de carboidratos e proteínas, que se caracteriza como biofilme. Os biofilmes se formam rapidamente em superfícies, como cateteres e dispositivos intrauterinos, tornando-se resistentes a agentes antifúngicos, especialmente azóis. Biofilmes também podem se formar nas superfícies mucosas e promover a persistência de infecção por fungos (ACHKA e FRIES, 2010). *C. albicans* apresenta uma capacidade de infectar variados nichos no hospedeiro, característica que se deve a uma ampla gama de fatores de virulência. Dentre eles se inclui as transições morfológicas já mencionadas, a formação de biofilmes, a expressão de adesinas e invasinas, trigmotropismo, troca fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas (MAYER et al., 2013).

Em uma pesquisa realizada em um hospital terciário brasileiro, foi avaliada a incidência de espécies de *Candida*, sendo observado que a espécie de *Candida* não-*albicans* mais incidente foi *C. glabrata* (37,62%), geralmente considerada uma espécie de baixa virulência, mas com uma taxa de mortalidade mais alta que *C. albicans*. *C. parapsilosis* (25,74%) e *C. tropicalis* (16,86%) foram a segunda e terceira espécies mais comumente isoladas (SAVASTANO et al., 2016). *C. tropicalis* é particularmente relevante nas infecções do trato urinário, enquanto *C. parapsilosis* é frequentemente encontrada como agente causador de infecções relacionadas a cateteres (CAVALHEIRO, 2018).

Azóis e equinocandinas são drogas antifúngicas usadas globalmente para tratar infecções por *Candida* (PRISTOV e GHANNOUM, 2019). As equinocandinas têm seu sítio de ação na enzima glucana sintase, responsável pela biossíntese de polímeros da parede celular (PERLIN, 2015). Antifúngicos azólicos (como o fluconazol) atuam inibindo a síntese de ergosterol e são mais frequentemente utilizados para o tratamento, pois são baratos, exibem

toxicidade limitada e disponíveis para administração oral (WHALEY, 2017). A resistência de *Candida* a esses antifúngicos tem aumentado (PRISTOV e GHANNOUM, 2019) e será abordada em mais detalhes no tópico 3.

## ***CRYPTOCOCCUS***

*Cryptococcus* é um gênero de fungos basidiomicetos com mais de 30 espécies amplamente distribuídas. São leveduras com cápsulas polissacarídicas, sapróbias no ambiente, sendo isoladas principalmente de excreta de aves e vegetais em decomposição (PESSOA et al., 2012; MAZIARZ e PERFECT, 2016). São causadores da criptococose, uma importante infecção fúngica que afeta humanos e diversos animais, tais como mamíferos, pássaros, répteis e invertebrados. A meningite criptococócica causa 15% das mortes relacionadas à AIDS em todo mundo (RAJASINGHAM et al., 2017).

Duas espécies são comumente conhecidas por causarem doenças em seres humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Historicamente, o gênero foi classificado em 3 variedades, 5 sorotipos (baseados em diferenças estruturais na cápsula de polissacarídeo) e 8 subtipos moleculares (MAZIARZ e PERFECT, 2016). *C. neoformans* dos sorotipos A e D infectam principalmente hospedeiros imunocomprometidos. Entretanto, *C. gattii* infecta tanto imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Os sorotipos A, D e AD são geralmente encontrados em todo o mundo, enquanto o *C. gattii* é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais. As infecções do sorotipo tipo D são mais encontradas na Europa Ocidental (JONES et al., 2017). Entretanto, há relatos de prevalência de *Cryptococcus* até mesmo em regiões subpolares (BUZZINI et al., 2017).

A parede celular de patógenos do gênero *Cryptococcus* é composta por uma camada rica em quitina próxima à membrana, cercada por uma rede de polissacarídeos compostas por  $\beta$ -1,3- e  $\beta$ -1,6-glucanas, xilomananas e galactomananas (JONES et al., 2017). A cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* é um dos mais importantes fatores de virulência, sendo formada por repetições de dois polissacarídeos, glucuronoxilomanano e glucuronoxilomanogalactano e pode incluir manoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico (CASADEVALL et al., 2019). Outros atributos de virulência bem caracterizados são a capacidade de crescer na temperatura corporal dos mamíferos e a produção de melanina, urease e fosfolipase B (ESHER et al., 2018). A melanina desempenha um importante papel protetor contra o estresse ambiental (EISENMAN e CASADEVALL, 2011). Já a função da urease, bem como da fosfolipase B, está associada à desestabilização de membranas, lise

celular, liberação de segundos mensageiros lipídicos (COX et al., 2001) e disseminação de fungos do pulmão para o cérebro (SHI et al., 2010).

A infecção por *Cryptococcus* ocorre através da inalação da levedura, sendo o pulmão o principal local da infecção. Apesar do pulmão ser o local comum de entrada do patógeno no corpo, a meningoencefalite é a manifestação clínica mais comum de infecção. As características clínicas da meningite criptocócica geralmente se manifestam em 1 a 2 semanas e incluem febre, mal-estar, cefaleia, rigidez da nuca, fotofobia, náuseas e vômitos (MADA et al., 2020). A anfotericina B tem sido a base do tratamento da meningite criptocócica. O uso de um regime à base de polieno foi associado à redução significativa da carga de levedura no sistema nervoso central e está correlacionado a uma melhor sobrevida (MOURAD e PERFECT, 2018). A flucitosina tem seu efeito apenas sobre as células fúngicas, não havendo ação nas células de mamíferos. Porém, seu uso não é recomendado como monoterapia sendo utilizado normalmente com outro antifúngico como a anfotericina B. Ainda, este medicamento depende fortemente da função renal de um indivíduo, pois não sofre metabolismo no corpo e, em 24 h, 85 a 95% da flucitosina é excretada na urina sem alterar sua forma original (PADDA e PARMAR, 2020). A resistência de *Cryptococcus* a antifúngicos será abordada no tópico 3.

### **TRICHOSPORON**

*Trichosporon* spp. são organismos anamórficos basidiomicetos semelhantes a leveduras, com capacidade de crescimento filamentosos, sendo, portanto, dimórficos (MARINÉ, et al., 2015). Sua distribuição geográfica é bem variada sendo encontrados tanto em áreas tropicais quanto em áreas temperadas. Podem colonizar seres humanos em diferentes regiões do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, cavidade oral, trato respiratório, pele e vagina. Recentemente, baseado em múltiplas análises sequenciais de genes, a taxonomia de *Trichosporon* foi reavaliada e novos gêneros foram propostos para os clados monofiléticos, que incluem *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* e *Apiotrichum* (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017).

Cinquenta espécies de *Trichosporon* foram descritas em diferentes regiões do globo, incluindo 16 espécies com relevância clínica (COLOMBO et al., 2011). *Trichosporon* é considerado uma importante causa de vários tipos de infecções incluindo piedra branca e onicomicose, podendo também causar infecções profundas, associadas à mucosa (BENTUBO et al 2014). Tricosporonose é o nome atribuído à forma invasiva das doenças causadas por

*Trichosporon* spp., sendo uma infecção oportunista e com taxas de mortalidade de 42% a 90%, apesar da terapia antifúngica. Foi relatada como a segunda infecção mais comum por fungemia, excetuando-se aquelas causadas por *Candida*, em pacientes com doenças hematológicas malignas (MICELI et al., 2011). Micoses emergentes também podem ser causadas por *Trichosporon*, documentadas em pacientes com neoplasias hematológicas ou outras condições associadas à imunossupressão (TAVERNA et al. 2014).

O perfil de susceptibilidade de *Trichosporon* spp. é capaz de variar de acordo com a espécie sendo importante para fins epidemiológicos, a fim de definir melhor a associação clínica de espécies melhorando o tratamento antifúngico (TAVERNA et al., 2014). *Trichosporon asahii* possui uma capacidade de invadir a pele e outros tecidos que requer diversas características de virulência, que inclui a transição de levedura para hifa, formação de biofilme, atividade de lipases e proteases e a composição dinâmica da parede celular (DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

## **RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS**

A terapia antifúngica é um componente central no tratamento de pacientes com micoses agudas e crônicas. Entretanto, devido ao número escasso de classes de medicamentos antifúngicos, as opções de tratamento são restritas (COWEN et al., 2015). Além disso, a resistência antifúngica está se tornando uma grande preocupação, reduzindo as possibilidades de tratamento, principalmente no contexto da necessidade de assistência a pacientes de alto risco com micoses invasivas (WIEDERHOLD, 2017).

A resistência a medicamentos pode ser classificada como microbiológica ou clínica. A resistência microbiológica é identificada através da determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) *in vitro* para um determinado antifúngico e interpretação desse valor de acordo com os pontos de corte clínicos (MORIO et al., 2017). Já a resistência clínica refere-se à persistência de uma infecção fúngica, mesmo com o tratamento. Embora a resistência microbiológica possa contribuir para o desenvolvimento da resistência clínica, outros fatores também podem estar envolvidos, como função imunológica comprometida, doença subjacente, biodisponibilidade reduzida do medicamento e aumento do metabolismo do medicamento (SANGUINETTI et al., 2015). O aumento da resistência antifúngica pode ser devido ao uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou ao uso frequente do mesmo

medicamento na profilaxia de infecções fúngicas em humanos e animais (KONTOYIANNIS, 2017).

Vários são os mecanismos de resistência de *Candida* contra azóis e variam desde a ativação de bombas de efluxo capazes de promover a exocitose do fármaco, bem como alteração ou diminuição da expressão de proteínas-alvo. Em relação às equinocandinas, os mecanismos de resistência baseiam-se na ocorrência de mutações pontuais adquiridas nos genes que codificam as glucana sintases, levando a uma diminuição da sensibilidade ao fármaco (VIEIRA e NASCIMENTO, 2017).

Numa avaliação realizada por Bongomin et al. (2018) acerca da resistência de *Cryptococcus* spp. em estudos de 1988 a maio de 2017, foi observada uma prevalência média de resistência ao fluconazol de 12,1%. Também observou-se que cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* que apresentaram resistência a antifúngicos apresentaram uma superexpressão de genes responsáveis pela bomba de efluxo. O mecanismo de resistência de *Cryptococcus* a fluconazol ainda não foi totalmente elucidado (ZAFAR et al., 2019).

Estudos afirmam que o tratamento antifúngico das doenças de pele associadas a *Malassezia* não é clinicamente eficaz em até um terço dos pacientes (SAMAREI et al., 2017). Leong et al. (2017) testaram a susceptibilidade de 52 cepas de 13 espécies de *Malassezia* a 11 antifúngicos comumente utilizados. Os menores valores de CMI foram encontrados para os azóis itraconazol, posaconazol e voriconazol e todas foram resistentes a equinocandinas e griseofulvina. Algumas espécies também apresentaram altos valores de CMI para cetoconazol, que é um antifúngico tópico amplamente recomendado para infecções cutâneas por *Malassezia*.

O manejo terapêutico de infecções causadas por *Trichosporon* também é desafiador, uma vez que espécies desse gênero exibem uma resistência intrínseca às equinocandinas e uma baixa suscetibilidade aos polienos (ALMEIDA-JUNIOR e HENNEQUIN, 2016). Além disso, as espécies de *Trichosporon* podem mostrar suscetibilidade limitada à anfotericina B e fluconazol (SANTOS, et al., 2016).

## **ATIVIDADE DE LECTINAS CONTRA LEVEDURAS**

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza que apresentam pelo menos um domínio capaz de reconhecer e se ligar a carboidratos ou glicoconjugados com alta especificidade e de forma reversível (DIAS et al., 2015). Desempenham na natureza papéis nos fenômenos de reconhecimento biológico e podem proteger plantas e animais contra patógenos (BUUL e BROUNS, 2014). As lectinas estão envolvidas no reconhecimento entre células, proliferação celular, migração celular, adesão à matriz extracelular e interações parasita-hospedeiro. Têm sido relatadas diversas atividades biológicas das lectinas, tais como inseticida (NAPOLEÃO et al., 2019), antimicrobiana (EL-ARABY et al., 2020), antiviral (SUBRAMANIAM et al., 2020) e antitumoral (GOMES et al., 2021).

A ação antimicrobiana das lectinas inclui bloqueio de invasão e infecção, inibição de crescimento e germinação, regulação de adesão e migração de células microbianas, e indução da morte da célula microbiana. A morte de células microbianas por lectinas pode envolver a formação de poros, seguida por alterações na permeabilidade celular, e também interações com os componentes da parede celular, tais como a quitina (COELHO et al., 2018). A Tabela 1 lista as lectinas que apresentaram atividade antifúngica contra leveduras.

Silva et al. (2018) relataram que a lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, com CMI de 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente, e causou morte das células com concentração mínima fungicida (CMF) de 50 e 12,5 µg/mL, respectivamente. Além disso, o tratamento dessas leveduras com essa lectina resultou em diminuição do conteúdo intracelular de ATP e induziu a peroxidação lipídica. PgTeL também foi capaz de danificar a integridade da parede celular fúngica de ambas as espécies. Uma lectina oriunda de folíolos de *Calliandra surinamensis*, denominada CasuL, foi avaliada contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Essa lectina foi ativa apenas contra *C. krusei*, apresentando valores de CMI e CMF de 125 e 250 µg/mL, respectivamente. CasuL promoveu alterações drásticas na morfologia dessa levedura, com retração do conteúdo citoplasmático e ruptura celular (PROCÓPIO et al., 2017). Silva et al. (2019) isolaram uma lectina de raízes de *Portulaca elatior* (PeRoL), que apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* com CMI de 16 µg/mL.

Recentemente, Santos et al. (2021) descreveram os efeitos da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) no crescimento e sobrevivência de espécies de *Candida*. WSMoL inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com CMI de 20 µg/mL. Menor valor de CMF (20 µg/mL) foi detectado para *C.*

*glabrata* e o mais alto (80 µg/mL) para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Essa lectina induziu apoptose e necrose nas células fúngicas e causou hiperpolarização da membrana mitocondrial.

Também foram avaliadas as atividades das lectinas DvioL, DRL e ConBr, obtidas das sementes das plantas leguminosas *Dioclea violacea*, *Dioclea rostrata* e *Canavalia brasiliensis*, frente a leveduras dos gêneros *Candida* e *Trichosporon* isoladas de secreções vaginais. A lectina DRL mostrou atividade antifúngica contra *Candida guilliermondii* (CMI: 128 µg/mL), *Candida shehatae* (CMI: 4 µg/mL) e *Candida membranaefaciens* (CMI: 64 µg/mL). DvioL mostrou atividade antifúngica em onze cepas do gênero *Candida*, com CMI variando de 8 a 256 µg/mL. A ConBr apresentou atividade antifúngica contra oito isolados do gênero *Candida*, e *Trichosporon cutaneum* CMI entre 2 e 256 µg/mL (GOMES et al., 2012).

**Tabela 1.** Lectinas com ação antifúngica sobre espécies de três gêneros de leveduras.

Gênero	Lectinas	
	Nome	Fonte
<i>Candida</i>	ApuL	Inflorescência de <i>Alpinia purpurata</i>
	BVL	Semente de <i>Bauhinia variegata</i>
	C-25	Semente de <i>Cicer arietinum</i>
	CasuL	Folíolo de <i>Calliandra surinamensis</i>
	CFAL	Semente de <i>Clitoria fairchildiana</i>
	ConBr	Semente de <i>Canavalia brasiliensis</i>
	ConBr II	Semente de <i>Canavalia brasiliensis</i>
	DdeL	Semente de <i>Dypsis decaryi</i>
	DRL	Semente de <i>Dioclea rostrata</i>
	DvioL	Semente de <i>Dioclea violacea</i>
	DVL	Semente de <i>Dioclea virgata</i>
	Helja	Semente de <i>Helianthus annuus</i>
	PeRoL	Raiz de <i>Portulaca elatior</i>
	PgTeL	Sarcotesta de <i>Punica granatum</i>
	SteLL	Folha de <i>Schinus terebinthifolia</i>
	WSMoL	Semente de <i>Moringa oleifera</i>
	---	Semente de <i>Archidendron jiringa</i>
---	Hemolinfa de <i>Portunus pelagicus</i>	
<i>Cryptococcus</i>	Citovirina	Cianobactérias
	WGA	Gérmen de trigo
<i>Trichosporon</i>	ConBr	Semente de <i>Canavalia brasiliensis</i>

Klafke et al. (2013) estudaram a ação de seis diferentes lectinas oriundas de plantas sobre oito espécies de leveduras. Essas lectinas foram extraídas de folhas de *Abelmoschus*

*esculentus*, sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna pruriens*, *Clitoria fairchildiana*, *Dioclea virgata* e *Bauhinia variegata*. Atividade inibitória foi observada apenas para *C. parapsilosis* com CMI entre 0,97 a 125 µg/mL e CMF de 3,9 a 500 µg/mL. Charungchitrak et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana da lectina de sementes de *Archidendron jiringa* contra *C. albicans* obtendo uma CMI de 0,0567 mg/mL.

Del Rio et al. (2019) avaliaram a ação da lectina de *Helianthus annuus*, denominada Helja, contra *C. albicans*, explorando também sua capacidade de inibir a produção de biofilme. Foi detectada uma redução de 82% na viabilidade celular e de 80% na formação de biofilme. As inflorescências de *Alpinia purpurata* contêm uma lectina (ApuL) que foi avaliada contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, apresentando CMI de 200 e 400 µg/mL, respectivamente (FERREIRA et al., 2018). Gomes et al. (2013) avaliaram a ação da lectina de folha de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) contra *C. albicans* encontrando uma CMI de 6,5 µg/mL e uma CMF de 26 µg/mL. Lectinas de sementes de *Cicer arietinum* (C-25) foram avaliadas contra *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, apresentando valores de CMI entre 1,56 e 12,5 µg/mL. Após 30 min de incubação com C-25, foi observada a ruptura da parede celular e o vazamento citoplasmático (KUMAR et al., 2014). Torres et al. (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana de sementes de *Dypsis decaryi*, denominada DdeL, contra *Candida albicans*, detectando uma CMI de 2,06 µg/mL.

Fonseca et al. (2013) avaliaram os efeitos do bloqueio do principal componente capsular do *Cryptococcus neoformans*, o quitoooligômero glucuronoxilomanano, pela lectina de germen de trigo (WGA). O estudo sugeriu que as células de leveduras tratadas com WGA tiveram um atraso de 3 a 5 dias na promoção dos sintomas da criptococose, quando comparado ao controle. Também observou-se que o tratamento com WGA foi associado com uma deficiência severa na capacidade das células de levedura colonizarem o cérebro dos animais, sugerindo que as estruturas bloqueadas pela WGA possam estar envolvidas na disseminação desses fungos. Além disso, as determinações visuais e quantitativas demonstraram que WGA causou uma clara inibição na formação da cápsula.

Lectinas extraídas de outros organismos diferentes de plantas também apresentaram atividade antifúngica. Jayanthi et al. (2017) demonstraram a atividade antibiofilme contra *C. albicans* de uma lectina purificada a partir da hemolinfa do caranguejo nadador (*Portunus pelagicus*) revestida com nanopartículas de prata metálica. Jones et al. (2017) avaliaram uma lectina extraída de cianobactérias denominada citovirina, a qual se mostrou eficaz contra *C. neoformans* sorotipos A e D (com valores de CMF de 1 mM para o sorotipo D e entre 50 e 20

mM para o sorotipo A) e *C. gattii* (CMF de 500 nM). Também observou-se que para o sorotipo D, a citovirina inibiu a liberação de polissacarídeos capsulares.

## CONCLUSÃO

Lectinas têm se mostrado como importante alternativa para o combate de infecções causadas por leveduras, sendo o maior número de estudos realizados frente a espécies do gênero *Candida*. Atualmente, constitui um desafio para os pesquisadores a realização de mais estudos visando a avaliação das atividades em modelos *in vivo*. A disseminação da resistência a antifúngicos tem aumentado nas últimas décadas o que torna mais urgente o desenvolvimento de alternativas para uso nas terapias contra infecções causadas por esses microrganismos.

## AGRADECIMENTOS

Leilane Santos agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de Financiamento 001) pela concessão de bolsa de Doutorado. Thiago Napoleão agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa (309701/2019-8).

## REFERÊNCIAS

- ACHKA, J. M., FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253–273, 2010.
- ALMEIDA-JUNIOR, J. N. et al. Evaluating and improving Vitek MS for identification of clinically relevant species of *Trichosporon* and the closely related genera *Cutaneotrichosporon* and *Apiotrichum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55 n. 8, p. 2439-2444, 2017.
- ALMEIDA-JUNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 1629, 2016.

- BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, artigo 377, 2014.
- BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290–297, 2018.
- BROWN H. E. ; ESHER, S. K. ; ALSPAUGH, J. A. Chitin: a “hidden figure” in the fungal cell wall. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 425, p. 83-111, 2020.
- BUUL, V. J.; BROUNS F. J. P. H.. Health effects of wheat lectins: a review. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 2, p. 112-117, 2014.
- BUZZINI, P. et al. Yeasts in polar and subpolar habitats. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. **Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity**. Springer International Publishing, 2017, p. 331–365.
- CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of treatment approaches for fungal infections **Clinics in Chest Medicine** v. 38, n. 3, p. 393-402, 2017.
- CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus Neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822-831, 2019.
- CASTANHEIRA, M., et al. Monitoring antifungal resistance in a global collection of invasive yeasts and molds: Application of CLSI epidemiological cutoff values and whole-genome sequencing analysis for detection of azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, artigo e00906-17, 2017.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, artigo 28, 2018.
- CHARUNGCHITRAK, S. et al. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry** v. 126, n. 3, p. 1025–1032, 2011.
- COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 524–535, 2018.
- COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.
- COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harb Perspect Medicine**, v. 5, artigo a019752, 2015.
- COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.

- DEL-RIO, M. et al. Effects of the binding of a *Helianthus annuus* lectin to *Candida albicans* cell wall on biofilm development and adhesion to host cells. **Phytomedicine**, v. 58, artigo 152875, 2019.
- DIAS, R. O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.
- DUARTE-OLIVEIRA, C. et al. The cell biology of the *Trichosporon*-host interaction. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 7, artigo 118, 2017.
- EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 93, n.3, p. 931–940, 2012.
- EL-ARABY, M. M. et al. Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds. **AMB Express**, v. 10, artigo 90, 2020.
- ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, artigo e180057, 2018.
- FERREIRA, G. R. S. et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 152–162, 2018.
- FONSECA, F. L. et al. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chitoooligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 60, p. 64–73, 2013.
- GOMES, D. et al. A new lectin from the floral capitula of *Egletes viscosa* (EgviL): Biochemical and biophysical characterization and cytotoxicity to human cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules* n. 168 p. 676–685, 2021
- GOMES, B. S. et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 770-778, 2012.
- GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2013.
- GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, artigo FUNK-0035-2016, 2017.
- GUARRO, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 1, p. 33–39, 2012.
- GUBBINS, P. O.; HELDENBRAND, S. Clinically relevant drug interactions of current antifungal agents. **Mycoses** v. 53, n. 2, p. 95–113, 2010.

- JAYANTHI, S. et al. Growth inhibition and antibiofilm potential of Ag nanoparticles coated with lectin, an invertebrate immune molecule. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 170, p. 208-216, 2017.
- JONES, T. H. et al. Novel antifungal activity for the lectin scytovirin: inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, artigo 755, 2017.
- KAMESWARAN, M., RAGHUNANDHAN, S. Saprophytic mycotic infections of the nose and paranasal sinuses. **Otorhinolaryngology Clinics: An International Journal**, v. 1, n. 1, p. 25-31, 2009.
- KLAFKE, G. B. et al. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, v. 175, p. 147-151, 2013.
- KONTOYIANNIS, D. P. Antifungal resistance: an emerging reality and a global challenge. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216 n. 3, p. 431–435, 2017.
- KUMAR, S. et al. Antifungal and antiproliferative protein from *Cicer arietinum*: a bioactive compound against emerging pathogens. **BioMed Research International**, v. 2014, artigo 387203, 2014.
- LEONG, C. et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1883-1893, 2017.
- LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86 n. 8, p. 805-817, 2011.
- MADA P. K.; JAMIL, R. T.; ALAM, M. U. **Cryptococcus (Cryptococcosis)**. In: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island, 2020.
- MARINÉ M. et al. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species. **PLoS Pathogens**, v. 11, e1004982, 2015.
- MAYER, F. L., DUNCAN W.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.
- MAYR, A.; LASS-FLÖRL, C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p. 153-157, 2011.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011.

- MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 599-606, 2017.
- MORIS, D. V. et al. Oral *Candida* spp. Colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. 224-257, 2008.
- MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: a review of the antifungal arsenal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, artigo e170391, 2018.
- NAPOLEÃO, T.H. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins **Pest Management Science**, v. 75, p. 1212-1222, 2019.
- NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51. n. 5, p. 561-570, 2010.
- PADDA I. S.; PARMAR, M. **Flucytosine**. In: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island, 2020.
- PERLIN, D. S.. Echinocandin resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 616, n. 6, p. 612–617, 2015.
- PESSOA, C. C. B.; GOMES, F. S.; SILVA, S. H. M. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59-65, 2012.
- PRISTOV, K E., GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7 p. 792-798, 2019.
- PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 98, p. 419–429, 2017.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.
- RAMOS, D. B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, n. 6, p. 148-157, 2019.
- SADAMOTO, S. et al. Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue autopsy sections by in situ hybridization with peptide nucleic acid probe. **Medical Mycology**, v. 58, n. 4, p. 460–468, 2020.

- SAMAREI, R.; GHAREBAGHI, N.; ZAYER, S. Evaluation of 30 cases of mucormycosis at a university hospital in Iran. **Mycoses**, v. 60, n. 7, p. 426-432, 2017.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, B. C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 2–13, 2015.
- SANTOS, C. O. et al. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, artigo 148, 2016.
- SANTOS, L. M. M. et al. Anti-*Candida* activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). **Journal de Mycologie Médicale**, artigo 101074, doi: 10.1016/j.mycmed.2020.101074, 2021.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10–24, 2013.
- SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. Savastano. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 367–372, 2016.
- SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **Journal Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010.
- SILVA, J. D. F. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.
- SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108 p. 391–400, 2018.
- SUBRAMANIAM, G.; BATCHA A. T. M.; WADHWANI, A. In vitro antiviral activity of BanLec against herpes simplex viruses type 1 and 2. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 11-18, 2020.
- TAN, G. S. E.; HSU, L. Y. Overview of fungal infections. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2018, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98320-X>
- TAVERNA, C. G. et al. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356–366, 2014.

- TORRES, M. E. L. M. et al. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 169–176, 2019.
- VIEIRA, F; NASCIMENTO, T. Resistência a fármacos antifúngicos por *Candida* e abordagem terapêutica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 9, p. 161-168, 2017.
- WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 2173, 2017.
- WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v. 29, n. 10, p. 249–259, 2017.
- WONG, K. H. Vaccatides: Antifungal Glutamine-Rich Hevein-Like Peptides from *Vaccaria hispanica*. *Front Plant Sci*, v. 8, n. 1100, 2017;
- ZAFAR, H. et al. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 158–164, 2019.
- ZUZA-ALVES D. L, SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M.. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, artigo 1927, 2017.

## 4.2. Artigo Experimental 1

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica de WSMoL sobre fungos do gênero *Candida* foram incluídos em artigo publicado no periódico *Journal of Medical Mycology* (*Journal de Mycologie Médicale*), podendo ser acessado pelo link: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101074>.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Medical Mycology

journal homepage: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

## Research Paper

Anti-*Candida* activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL)

L.M.M. Santos<sup>a</sup>, P.M. Silva<sup>a</sup>, M.C. Moura<sup>a</sup>, A.R. Carvalho Junior<sup>b</sup>, P.K. Amorim<sup>a</sup>,  
 T.F. Procópio<sup>a</sup>, L.C.B.B. Coelho<sup>a</sup>, L.C.N. Silva<sup>b</sup>, P.M.G. Paiva<sup>a</sup>, N.D.L. Santos<sup>a</sup>,  
 T.H. Napoleão<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 April 2020

Received in revised form 22 October 2020

Accepted 22 October 2020

Available online xxx

## Keywords:

Lectin

Pathogenic yeast

Antimicrobial activity

Cell death

## ABSTRACT

This work reports the effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on growth and survival of *Candida* species. In addition, cellular alterations linked to the antifungal effect were investigated. The minimal inhibitory (MIC) and fungicidal (MFC) concentrations were determined and 24-h growth curves in absence and presence of lectin were established. Flow cytometry was used to evaluate the induction of apoptosis/necrosis, alterations in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), and occurrence of lysosomal damage. WSMoL inhibited the growth of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* with MIC of 20  $\mu\text{g/mL}$ . The lowest MFC (20  $\mu\text{g/mL}$ ) was detected for *C. glabrata* and the highest (80  $\mu\text{g/mL}$ ) for *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The inhibitory effect started from the ninth to nineteenth hour of incubation depending on the fungal species. Incubation with the lectin at the MIC for 24 h increased the number of cells undergoing apoptosis and necrosis. Hyperpolarization of the mitochondrial membrane was detected after 12-h treatment, followed by reduction of  $\Delta\Psi_m$  or depolarization after 24 h. No lysosomal damage was detected in treated cells. In conclusion, WSMoL is a fungistatic and fungicide agent against *Candida* with differential effects depending on the species.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

Lectins are proteins that bind to free carbohydrates or to glycoconjugates attached on cell surfaces. This property confers to these proteins the ability of triggering cellular responses, resulting in several biological activities [1]. Plant lectins play an important role in defense mechanisms against the attack of microorganisms [2]. Thus, many studies have been performed to evaluate the biotechnological and biomedical potentials linked to the antimicrobial action of these proteins [3,4].

*Moringa oleifera* Lamarck is a plant native to Northeast India, Pakistan and Afghanistan, widely cultivated in tropical and subtropical regions; in Brazil, it is distributed throughout the semi-arid region [5]. This plant is considered a multipurpose tree due to a variety of uses in Medicine and Biotechnology. For example, the seeds can be employed for water treatment and biofuel production while leaves, seeds and flowers are used as food and with medicinal purposes [6]. *M. oleifera* seeds contain a

water-soluble lectin (WSMoL) that has antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus pumillus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* [7–9]. In addition, nematicidal, insecticidal, and immunomodulatory properties of WSMoL have been reported [10–12].

Yeasts of the genus *Candida* are able to cause infections (called candidiasis) in different tissues of human body, such as mouth, eyes, and genital mucosa [13]. Candidiasis is the most common fungal infection and is usually associated to an imbalance of the natural microbiota or an impairment of the immune system; in this last case, it can become a systemic infection (candidemia), whose incidence has increased substantially in hospitals [14]. Increased resistance to the currently available antifungal agents and the toxicity of these drugs have reduced the effectiveness of the treatments; in this scenario, natural products have been evaluated as alternative therapy for the treatment of candidiasis [15].

The anti-*Candida* activity of lectins has been studied and some insights into their mechanisms of action have been reported. For example, the lectin from *Calliandra surinamensis* pinnulae (CasuL) showed antifungal activity on *Candida krusei*, causing cytoplasm

\* Corresponding author.

E-mail address: [thiago.napoleao@ufpe.br](mailto:thiago.napoleao@ufpe.br) (T.H. Napoleão).

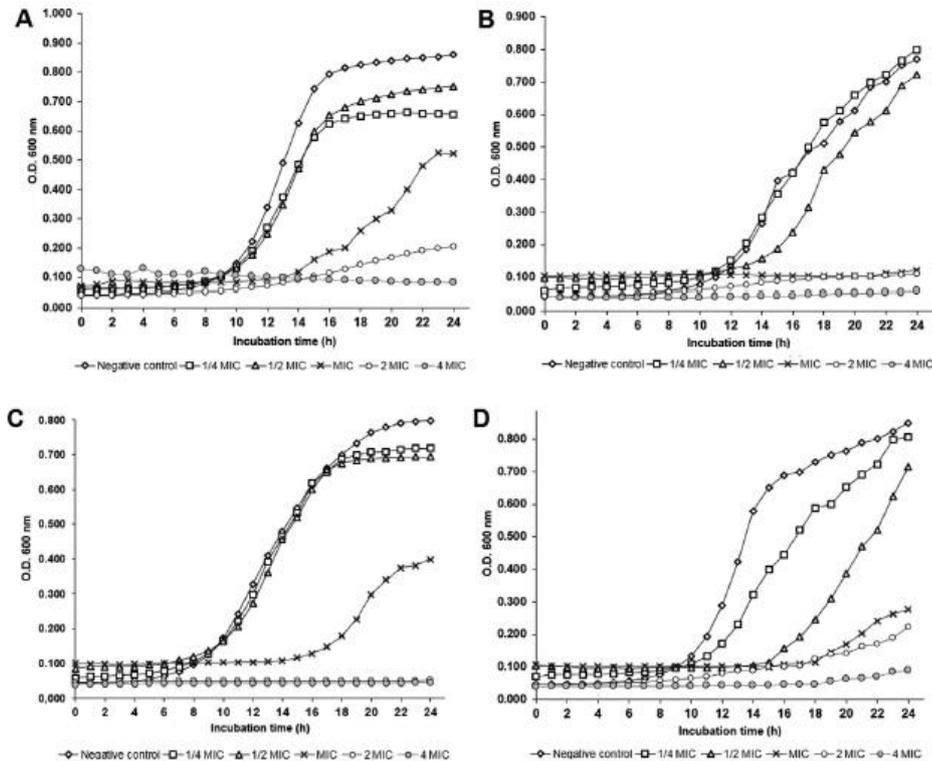


Fig. 1. Effects of WSMoL on growth of *Candida* species. Growth curves of *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. krusei* (C) and *C. parapsilosis* (D) in absence or presence of WSMoL at 4 × MIC, 2 × MIC, MIC, ½MIC, or ¼MIC. The optical density (O.D.) at 600 nm was determined every hour during 24 h. Negative control cells were cultured in a lectin-free medium. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). MIC: minimal inhibitory concentration.

Table 1

Evaluation of the viability of *Candida* cells treated with the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL).

Treatment	Cells	Fungi			
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Control	Viable (%)	89.60 ± 0.52	99.63 ± 0.41	98.43 ± 0.51	94.70 ± 1.12
	Apoptotic (%)	6.20 ± 0.78	0.03 ± 0.05	0.10 ± 0.10	1.20 ± 0.34
	Necrotic (%)	1.93 ± 0.51	0.30 ± 0.36	1.33 ± 0.31	2.80 ± 0.40
	Late apoptosis/necrosis (%)	2.23 ± 0.51	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.23	1.33 ± 0.81
WSMoL (MIC)	Viable (%)	81.03 ± 1.00 <sup>a</sup>	58.06 ± 2.68 <sup>a</sup>	70.33 ± 2.01 <sup>a</sup>	82.53 ± 2.2 <sup>a</sup>
	Apoptotic (%)	9.40 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.90 ± 1.10 <sup>a</sup>	12.75 ± 0.75 <sup>a</sup>	9.90 ± 0.60 <sup>a</sup>
	Necrotic (%)	4.70 ± 0.34 <sup>a</sup>	30.22 ± 2.51 <sup>a</sup>	9.16 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.61 <sup>a</sup>
	Late apoptosis/necrosis (%)	4.90 ± 1.25 <sup>a</sup>	7.86 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.93 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.83 ± 1.15

MIC: minimal inhibitory concentration.

<sup>a</sup> Indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison with control.

retraction and cell rupture, with damage or even complete disintegration of the cell wall [16]. In turn, the lectin from *Punica granatum* fruit sarcotesta (PgTeL) inhibited the growth and induced the death of *Candida albicans* and *C. krusei* cells. It was observed loss of cell wall integrity, shrinkage of cell body, lipid peroxidation and energetic collapse in *C. albicans* and *C. krusei* cells treated with PgTeL [17].

In this work, we aimed to evaluate the effects of WSMoL on growth and survival of *Candida* species, as well as to investigate cellular events involved in the antifungal activity of this protein.

## Materials and methods

### Obtention of WSMoL

*Moringa oleifera* seeds were collected in Recife, Brazil and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . A voucher specimen (no. 73,345) is archived at the herbarium Dárdano de Andrade Lima (*Instituto Agronômico de*

*Pernambuco*, Recife, Brazil). The plant collection was performed with authorization (no. 36301) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) and the access was recorded (A97CBDF) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado*.

WSMoL was isolated following the procedure described by Coelho et al. [18]. The seed powder (10 g) was suspended in distilled water (100 mL) and homogenized for 16 h at  $25^{\circ}\text{C}$ . After filtration and centrifugation, the extract was treated with ammonium sulphate (60% saturation) and the precipitated fraction was collected, dialyzed against 0.15 M NaCl, and loaded (2 mL; 80 mg of protein) onto a chitin column previously equilibrated with 0.15 M NaCl. WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid. The yield of the chromatography step is about 3.5 mg of WSMoL per column.

Protein concentration was determined according to Lowry et al. [19]. The sample (0.2 mL) was incubated (10 min) with 1 mL of an alkaline copper solution [1 mL of 0.5% (w/v) copper sulfate in 1% (w/v) sodium citrate added to 50 mL of 2% (w/v) sodium carbonate

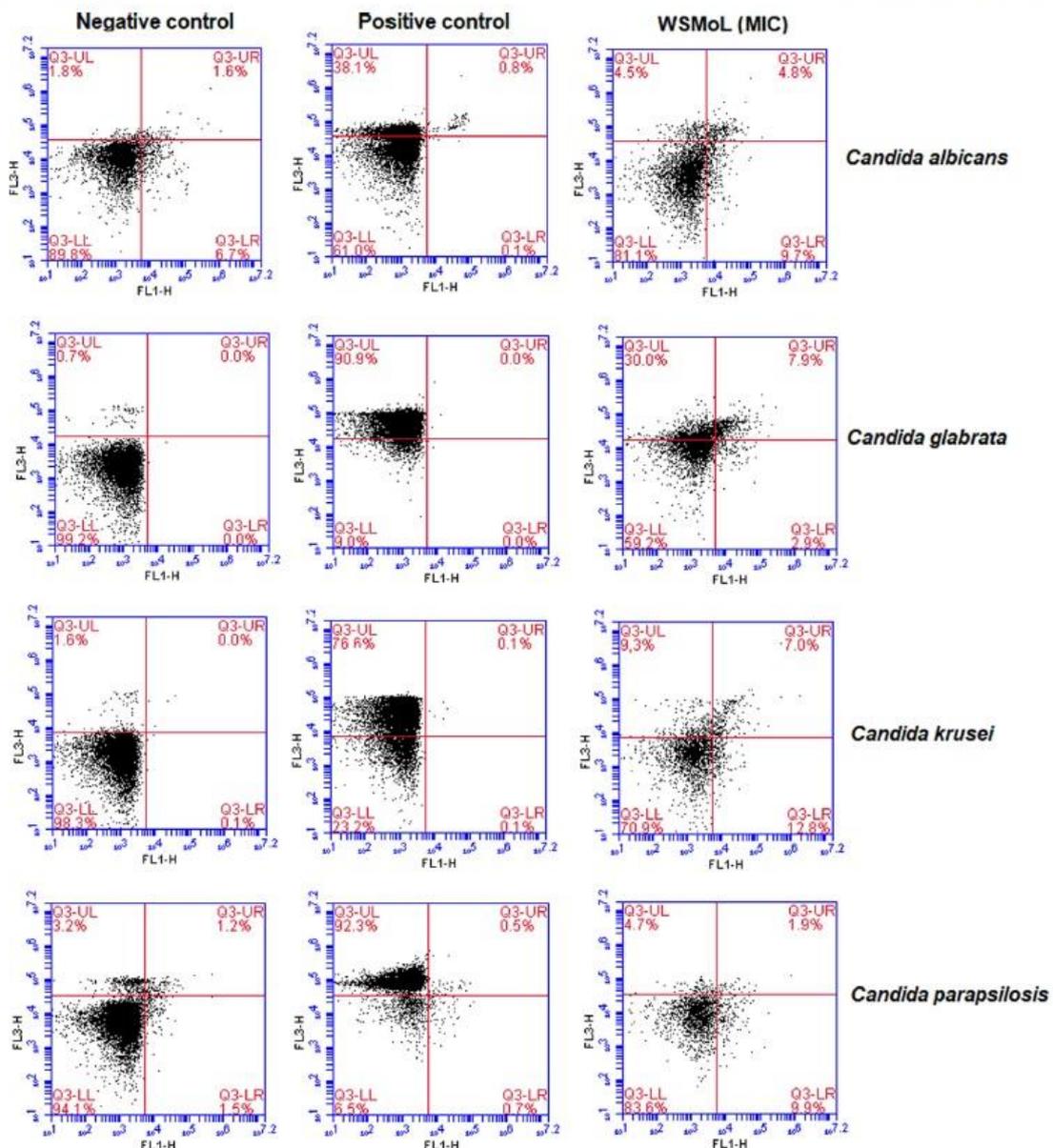


Fig. 2. Investigation of cell death induced by WSMoL on *Candida* isolates after incubation for 24 h at the minimal inhibitory concentration (MIC). Cell death was assessed by flow cytometry using annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). In the representative FL1 vs. FL3 dot plots, events corresponding to apoptotic (Ann+) and necrotic cells (PI+) can be seen in the quadrants LR and UL, respectively. Cells in late apoptosis or necrosis (AnnV+/PI+) are represented in quadrant UR. Viable cells are in the quadrant LL. Isopropyl alcohol was used as positive control.

solution in 0.1% (w/v) sodium hydroxide]. After incubation, 0.1 mL of the Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:1 in water) was added and, after 30 min, the absorbance was measured at 720 nm. A standard curve was established using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL).

The carbohydrate-binding ability of WSMoL was checked by the hemagglutinating activity (HA) assay [16] using rabbit erythrocytes. The Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Pernambuco approved the method that was used to collect erythrocytes (process 23076.033782/2015-70). The sample (50 µL) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl in a row of a 96-well microtiter plate and 50 µL of the erythrocyte suspension were added to each well. Erythrocytes incubated only in 0.15 M NaCl were used as control. The HA was determined as the reciprocal of

the highest dilution of the lectin that promoted full agglutination of rabbit erythrocytes. The specific HA was calculated as the ratio between the HA and the protein concentration (mg/mL). WSMoL showed a specific hemagglutinating activity of 3202, assuring the functionality of the carbohydrate-binding sites.

#### Fungal isolates

Stored cultures of *Candida albicans* (URM 5901), *Candida parapsilosis* (URM 6345), *Candida glabrata* (URM 4246) and *Candida krusei* (URM 6391) were obtained from the University Recife Mycologia (URM) culture collection, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil). The fungi were cultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) at 28 °C overnight. For

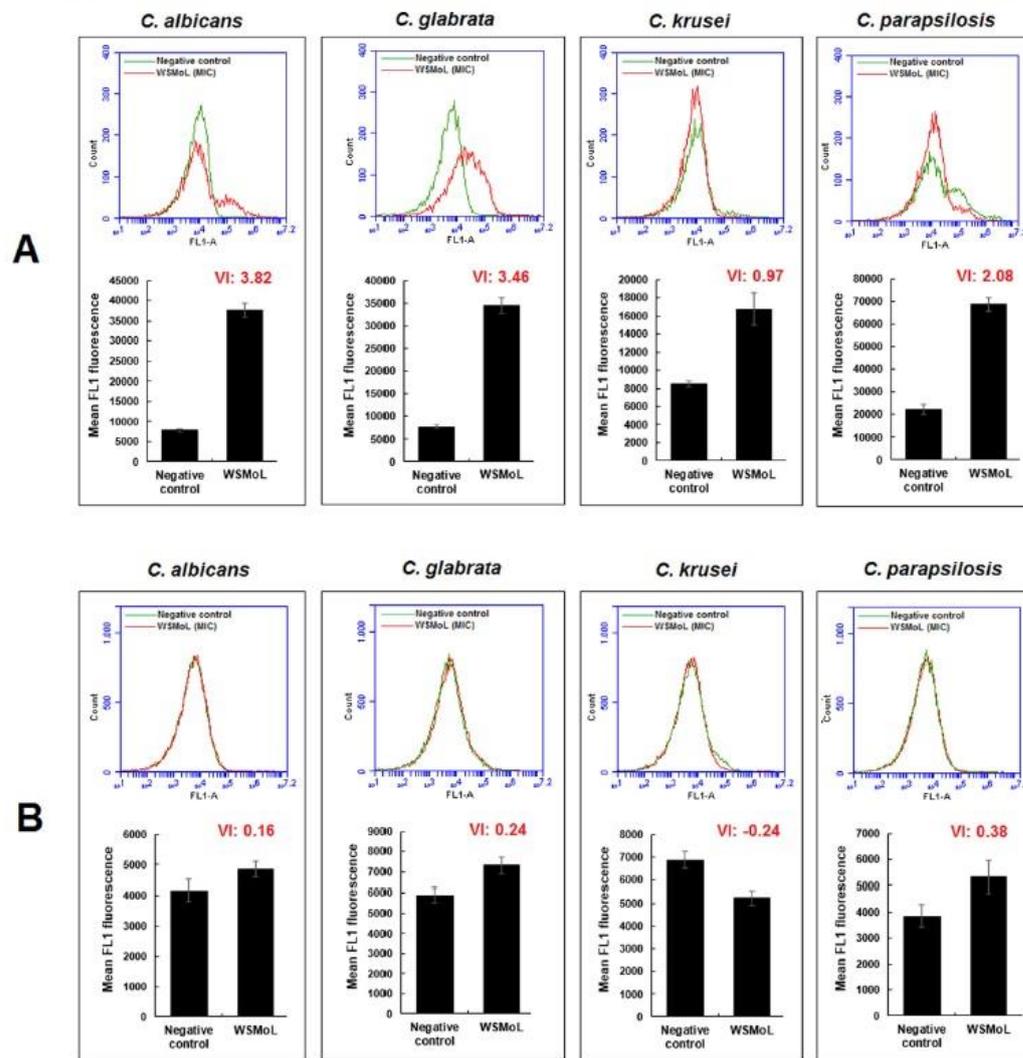


Fig. 3. Evaluation of the effects of WSMoL on the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of *Candida* isolates after incubation for 12 h (A) or 24 h (B) with the minimal inhibitory concentration (MIC) of the lectin. The overlay histograms shows the fluorescence of rhodamine 123 in FL1 channel. VI: variation index.

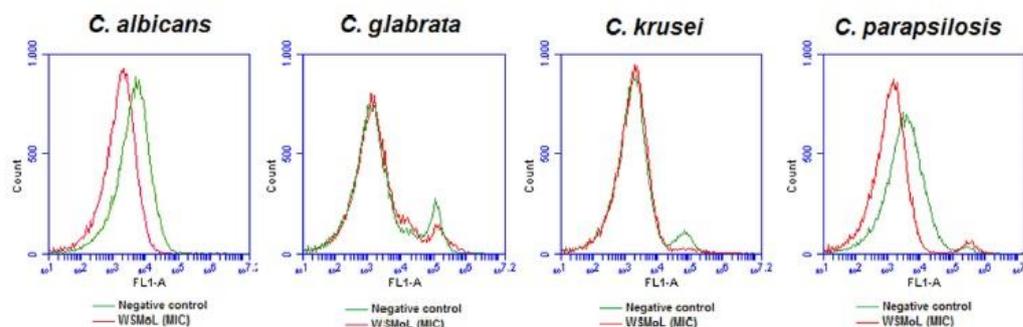


Fig. 4. Evaluation of the effect of WSMoL on lysosome integrity of *Candida* isolates after incubation for 24 h with the minimal inhibitory concentration (MIC) of the lectin. The curves show the fluorescence of acridine orange in FL1 channel.

use in the assays, the density of the cultures was adjusted turbidimetrically (optical density at 600 nm, OD<sub>600</sub>) to  $5 \times 10^5$  colony forming units (CFU) per mL in sterile saline solution (150 mM NaCl).

#### Determination of minimal inhibitory (MIC) and fungicidal (MFC) concentrations

Each antifungal assay corresponded to a row of a flat-bottomed 96-well microtiter plate. First, 90  $\mu$ L of Sabouraud Dextrose Broth (SDB) were added to each well and then WSMoL (90  $\mu$ L in distilled water) was added to the third until the twelfth well in order to reach final lectin concentrations between 640.0 and 1.25  $\mu$ g/mL after addition of the microorganism. Next, all wells (except the first) were inoculated with 20  $\mu$ L of the fungal culture. In the second well (100% growth control), sterile distilled water (90  $\mu$ L) was added instead of WSMoL. The first well received 110  $\mu$ L of distilled water and corresponded to the sterility control. The OD<sub>600</sub> was measured (time zero) and the assay was incubated at 28 °C for 24 h. After this period, the OD<sub>600</sub> was recorded again. Fluconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as positive control. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest WSMoL concentration able to promote a reduction of OD<sub>600</sub> higher or equal to 50% in comparison with the 100% growth control. Each assay was performed in triplicate and two independent experiments were carried out. To determine the minimal fungicidal concentration (MFC), inoculations (10  $\mu$ L) from the wells containing WSMoL at concentrations higher or equal to the MIC were transferred to SDA plates, which were incubated at 28 °C for 48 h. The MFC corresponded to the lowest WSMoL concentration able to reduce the number of CFU in 99.9% in comparison with the initial inoculum.

#### Growth curves

Growth curves of the yeasts incubated with WSMoL at  $4 \times$  MIC,  $2 \times$  MIC, MIC,  $\frac{1}{2}$ MIC, and  $\frac{1}{4}$ MIC were established. The assay was performed in 96-well microtiter plates as described in section 2.4. The first well corresponded to the sterility control; the second well corresponded to the 100% growth control; the third to seventh wells corresponded to treatments with WSMoL at final concentrations corresponding to  $4 \times$  MIC,  $2 \times$  MIC, MIC,  $\frac{1}{2}$ MIC, and  $\frac{1}{4}$ MIC. The microtiter plate was incubated for 24 h at 28 °C and the OD<sub>600</sub> was determined every hour. Each assay was performed in triplicate and two independent experiments were carried out.

#### Cell death evaluation

The yeasts were cultured for 24 h in absence (control) or presence of WSMoL at the MIC and cell death was evaluated using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Isopropyl alcohol (20%, v/v) was used as positive control. The data were acquired in the BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). A minimum of 20,000 events was collected per sample. Cells stained only with annexin were considered apoptotic; those stained only with propidium iodide were recorded as necrotic cells; those stained with both probes were considered to be in late apoptosis or undergoing necrosis; unstained cells were considered viable. Each assay was performed in triplicate and two independent experiments were carried out.

#### Evaluation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

The effects of WSMoL (MIC) on the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of *Candida* cells were also evaluated. The untreated and WSMoL-treated cells (12-h and 24-h incubation)

were washed with PBS and stained with 250  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/mL rhodamine 123 in the dark for 10 min. After incubation, yeast cells were washed and analyzed by flow cytometry (FL1 channel). A minimum of 20,000 events were analyzed. Changes in the fluorescent intensity of rhodamine 123 were quantified using the variation index (VI) obtained by the formula:  $VI = \frac{MT - MC}{MC}$

where MC is the mean fluorescent intensity in control and MT the mean in test. Negative values of VI correspond to membrane depolarization of mitochondria, while positive values indicate membrane hyperpolarization. Each assay was performed in triplicate and two independent experiments were carried out.

#### Evaluation of lysosomal membrane damage

The cells were treated for 24 h with WSMoL at MIC. Next, the cells were washed with PBS and stained with 1  $\mu$ g/mL acridine orange (lysosomal dye) in the dark for 20 min. After the incubation, yeast cells were washed and analyzed by flow cytometry (FL3 channel). A minimum of 20,000 events were collected. Each assay was performed in triplicate and two independent experiments were carried out.

#### Statistical analysis

The data were expressed as the mean or the percent mean  $\pm$  standard deviation (SD) and statistical differences were determined using Tukey's range test; a *P*-value  $< 0.05$  was considered statistically significant. In the growth kinetic assay, the statistical analysis was carried out for every time point and the comparison was made regarding the negative control.

## Results and discussion

WSMoL is one of the lectins found in *M. oleifera* seeds and can be distinguished by the following characteristics: pI 5.5, molecular mass of 60 kDa and ability to bind chitin, glucose, and fructose [20]. This lectin showed inhibitory effect on *Candida* growth with a MIC of 20  $\mu$ g/mL for all the species tested. The lectin also showed fungicidal activity and the MFC values were 80, 20, 40, and 80  $\mu$ g/mL for *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, respectively.

The *C. surinamensis* leaf lectin (CasuL) was active against *C. krusei* with MIC and MFC values of 125 and 250  $\mu$ g/mL, respectively [16], higher than those detected for WSMoL. Regente et al. [21] reported that a lectin from *Helianthus annuus* (Helja), at 200  $\mu$ g/mL, inhibited in 50%, 45% and 98% the growth of *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*, respectively. The *P. granatum* sarcotesta lectin (PgTel) showed a higher efficacy than WSMoL against *C. albicans* (MIC: 25  $\mu$ g/mL; MFC: 50  $\mu$ g/mL) and *C. krusei* (MIC and MFC: 12.5  $\mu$ g/mL) [17]. On the other hand, the lectins from *Abelmoschus esculentus*, *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna pruriens*, *Clitoria fairchildiana*, and *Dioclea virgata* showed to be remarkably more active than WSMoL on *C. parapsilosis* since they showed MIC values ranging from 0.97 to 3.9  $\mu$ g/mL [22].

The growth curves of the *Candida* species in absence and presence of WSMoL were established in order to follow the kinetics of the inhibitory and fungicidal effects. The fungal growth in negative controls (absence of lectin) started between 8–10 h of incubation for all species. At 24 h, no significant reduction ( $P > 0.05$ ) in OD<sub>600</sub> was detected in the treatments of *C. glabrata* (Fig. 1B) at sub-inhibitory concentrations ( $\frac{1}{4} \times$  MIC and  $\frac{1}{2} \times$  MIC). On the other hand, no growth was detected during all the period evaluated in the assays at concentrations  $\geq$  MIC, corroborating the results of the microdilution assay (MIC = MFC). For *C. albicans* (Fig. 1A), *C. krusei* (Fig. 1C), and *C. parapsilosis* (Fig. 1D), significant

inhibitory effect at 24 h ( $P < 0.05$ ) was detected since the treatment at  $\frac{1}{4} \times \text{MIC}$ . At the MIC, the inhibitory effect ( $P < 0.05$ ) started since the ninth, fifteenth, and nineteenth hour for *C. krusei*, *C. albicans*, and *C. parapsilosis*, respectively; absence of growth was detected at  $4 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$ , and  $4 \times \text{MIC}$  for these species, respectively, values that corresponded to the MFC values.

Flow cytometry analysis showed that incubation of all yeasts with WSMoL at MIC reduced the cell viability ( $P < 0.05$ ) in comparison with control (Table 1 and Fig. 2). Highest reduction was observed for *C. glabrata* while lowest reductions were found for *C. albicans* and *C. parapsilosis*, which is in line with the MFC results and confirms that WSMoL has different effects on the *Candida* isolates. This lectin induced necrosis in cells of all isolates, but the effect was more pronounced on *C. glabrata* (Table 1). Apoptotic cells were also higher among those treated with WSMoL than in controls, being the highest value detected for *C. krusei*. The number of double stained cells (late apoptosis or necrosis) was also higher than in control for all isolates except *C. parapsilosis* (Table 1) indicating the presence of strongly damaged cells.

The induction of apoptosis may be linked to mitochondrial dysfunction, involving depolarization of the transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), release of apoptogenic factors and impairment of oxidative phosphorylation. The results described above stimulated us to verify the occurrence of changes in mitochondrial function induced by WSMoL (at the MIC), which was evaluated through mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). The  $\Delta\Psi_m$  was checked after 12-h incubation, since the inhibitory effects of WSMoL started around this time point for all the *Candida* species (Fig. 1), and at the end of the assay (24 h). The data obtained for a 12-h incubation period (Fig. 3A) showed that the fluorescence of rhodamine 123 was higher when incubated with the cells treated with WSMoL, in comparison with control, resulting in positive VI values and indicating a hyperpolarization of the mitochondrial membrane; the highest VI was detected for *C. albicans*, followed by *C. glabrata*. When cells incubated for 24 h were analyzed (Fig. 3B), depolarization was detected in *C. krusei* cells and hyperpolarization was still detected for *C. glabrata*, *C. albicans* and *C. parapsilosis* cells, but in very lower degree than for 12 h, as indicated by VI values. This datum indicates that the inhibitory effects of WSMoL treatment initially leads to a hyperpolarization and then there is a reduction in the  $\Delta\Psi_m$ , reaching values similar to those in control cells.

The  $\Delta\Psi_m$  results from redox transformations associated with Krebs cycle activity and serves as an intermediate form of energy storage that is used by ATP synthase to produce ATP [23]. According to Perl et al. [24], studying T lymphocytes, mitochondrial hyperpolarization is an early step in apoptosis, occurring before activation of caspases and phosphatidylserine externalization, and then  $\Delta\Psi_m$  disruption. Curcumin (a polyphenol from *Curcuma longa* roots) caused an increase in  $\Delta\Psi_m$  of HepG2 cells challenged with this compound for 1 h, increasing respiration and oxygen consumption. This response was transient and followed by cytochrome c release into the cytosol and loss of  $\Delta\Psi_m$  after 6 h exposure. The authors suggested that mitochondrial hyperpolarization is a prerequisite for curcumin-induced apoptosis [25]. The increase of  $\Delta\Psi_m$  was also demonstrated to be an event that precedes the apoptosis of Jurkat human cells induced by camptothecin [26].

It has been demonstrated that mitochondrial dysfunction also disrupts the structure and function of lysosomes [27]. The acridine orange dye was used to evaluate possible damages caused by WSMoL in the lysosome of the *Candida* cells (Fig. 4). However, control and treated cells showed similar fluorescence emission in the case of *C. glabrata* and *C. krusei*, suggesting intact lysosomes. In the cells of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, there were shifts in the staining peaks regarding controls, but the mean fluorescence

values were not significantly different ( $P > 0.05$ ), which also indicates no lysosomal damage.

## Conclusion

WSMoL is a fungistatic and fungicide agent against *Candida* by inducing apoptosis, necrosis, and alteration in the mitochondrial membrane potential, acting differently on the species evaluated. The results correspond to the first report of antifungal activity of this lectin (which is already known for its antibacterial properties) and stimulate more studies on the cellular alterations caused by this lectin on *Candida* cells.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (407192/2018-2) and investigator research grants (LCBBC, PMGP, THN). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (Finance Code 001) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. LMMS would like to thank CAPES for graduate scholarship. NDLS would like to thank CAPES and FACEPE (BCT-0148-2.08/18) for post-doctoral scholarship.

## References

- [1] Paiva PMG, Pontual EV, Napoleão TH, Coelho LCBB. Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. 1st ed. Nova Science Publishers Inc: New York; 2013.
- [2] Procópio TF, Moura MC, Albuquerque LP, Gomes FS, Santos NDL, Coelho LCBB, et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In: Collins E, editor. Antibacterials: synthesis, properties and biological activities. Nova Science Publishers Inc; 2017. p. 69–89.
- [3] Dias RO, Machado LS, Migliolo L, Franco OL. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* 2015;20:519–41.
- [4] Coelho LCBB, Silva PMS, Oliveira WF, Moura MC, Pontual EV, Gomes FS, et al. Lectins as antimicrobial agents. *J Appl Microbiol* 2018;125:1238–52.
- [5] Napoleão TH, Santos AFS, Luz LA, Pontual EV, Paiva PMG, Coelho LCBB. Moringa oleifera: a powerful source of environmentally, medicinally and biotechnologically relevant compounds. In: Teodor R, editor. *Advances in Applied Science and Technology* vol. 5. West Bengal: Book Publisher International; 2019. p. 58–77.
- [6] Santos AFS, Luz LA, Pontual EV, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB. Moringa oleifera: resource management and multiuse life tree. *Advances in Research* 2015;4:388–402.
- [7] Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AFS, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Morais MMC, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:186–92.
- [8] Moura MC, Napoleão TH, Coriolano MC, Paiva PMG, Figueiredo RCBQ, Coelho LCBB. Water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 2015;119:666–76.
- [9] Moura MC, Trentin DS, Napoleão TH, Primon-Barros M, Xavier AS, Carneiro NP, et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J Appl Microbiol* 2017;123:861–74.
- [10] Santos NDL, Napoleão TH, Benevides CA, Albuquerque LP, Pontual EV, Oliveira AFS, et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. *South Afr J Bot* 2020;29:3–8.
- [11] Coriolano MC, Brito JS, Patriota LLS, Soares AKA, Lorena VMB, Paiva PMG, et al. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Protein Pept Lett* 2018;25:295–301.
- [12] Medeiros MLS, Moura MC, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB, Bezerra ACDS, et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. *Int J Biol Macromol* 2018;108:782–9.
- [13] Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res* 2014;139:195–204.
- [14] Talattof Z, Azad A, Zahed M, Shahradian N. Antifungal activity of xyliol against *Candida albicans*: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract* 2018;19:125–9.

- [15] Soliman S, Alnajdy D, El-Keblawy AA, Mosa KA, Khoder G, Noreddin AM. Plants' natural products as alternative promising anti-Candida drugs. *Pharmacogn Rev* 2017;11:104–22.
- [16] Procópio TF, Patriota LLS, Moura MC, Silva PM, Oliveira APS, Carvalho LVN, et al. A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effects. *Int J Biol Macromol* 2017;97:419–29.
- [17] Silva PM, Moura MC, Gomes FS, Trentin DS, Oliveira APS, Mello GSV, et al. PgTel, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Int J Biol Macromol* 2018;108:391–400.
- [18] Coelho JS, Santos NDL, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, Zingali RB, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 2009;77:934–8.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [20] Moura KS, Silva HRC, Dornelles LP, Coelho LCBB, Napoleão TH, Oliveira MDL, et al. Coagulant activity of water-soluble *Moringa oleifera* lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. *Appl Biochem Biotechnol* 2016;180:1361–71.
- [21] Regente M, Taveira GB, Pinedo M, Elizalde MM, Ticchi AJ, Diz MSS, et al. A sunflower lectin with antifungal properties and putative Medical Mycology applications. *Curr Microbiol* 2014;69:88–95.
- [22] Klafke GB, Moreira GMSG, Monte LG, Pereira JL, Brandolt TM, Xavier MO, et al. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in Medical Mycology. *Mycopathologia* 2013;175:147–51.
- [23] Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner DN, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 2018;552:50–9.
- [24] Perl A, Gergely Jr P, Nagy G, Koncz A, Banki K. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol* 2004;25:360–7.
- [25] Cao J, Liu Y, Jia L, Zhou H-M, Kong Y, Yang G, et al. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. *Free Rad Biol Med* 2007;43:968–75.
- [26] Sánchez-Alcázar JA, Ault JG, Khodjakov A, Schneider E. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell Death Differ* 2000;7:1090–100.
- [27] Demers-Lamarche J, Guillebaud G, Tlili M, Todkar K, Bélanger N, Grondin M, et al. Loss of mitochondrial function impairs lysosomes. *J Biol Chem* 2016;291:10263–76.

### 4.3. Artigo Experimental 2

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica de WSMoL sobre fungos do gênero *Cryptococcus* estão apresentados no artigo a seguir, a ser submetido para publicação.

#### **Atividade antifúngica de lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) sobre *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

Leilane Marina Moraes dos Santos<sup>a</sup>, Nataly Diniz de Lima Santos<sup>a</sup>, Wesley Felix de Oliveira<sup>a</sup>, Gustavo Ramos Salles Ferreira<sup>a</sup>, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho<sup>a</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>a</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>a</sup>, Augusto Schrank<sup>c</sup>, Adriana Fontes<sup>b</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>c</sup>, Paulo Euzébio Cabral Filho<sup>b</sup>, Pollyanna Michelle da Silva<sup>a</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

<sup>c</sup>*Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.*

\*Autor para correspondência. E-mail: [thiago.napoleao@ufpe.br](mailto:thiago.napoleao@ufpe.br)

#### **Resumo**

As sementes de *Moringa oleifera* contêm uma lectina solúvel em água chamada WSMoL com potencial antimicrobiano. Neste trabalho foi avaliada a atividade de WSMoL contra três linhagens dos microrganismos patogênicos *Cryptococcus neoformans* (B3501 e H99) e *Cryptococcus gattii* (R265). A atividade antifúngica foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Através de citometria de fluxo utilizando sondas fluorescentes apropriadas, foram investigadas a ocorrência de morte celular por apoptose ou necrose, alterações no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e influência na integridade lisossomal. Adicionalmente, foi avaliada a atividade antibiofilme de WSMoL sobre o isolado *Cryptococcus neoformans* B3501. WSMoL apresentou CMI de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para todas as

linhagens, porém não foi detectada ação fungicida. Foi observado que na CMI a cepa H99 apresentou um maior número de células necróticas (9,9% das células em comparação com somente 3,8% no controle negativo). O tratamento com a lectina resultou em danos na integridade dos lisossomos de células de *C. neoformans* B3501 e *C. gattii* R265, bem como redução do potencial de membrana mitocondrial de *C. neoformans* B3501. WSMoL, nas concentrações entre 25 e 400 µg/mL, inibiu a formação de biofilme por *C. neoformans* B3501, único isolado que se mostrou capaz de produzir biofilme. Em conclusão, WSMoL apresenta potencial antifúngico contra *Cryptococcus* por inibir o crescimento e a formação de biofilme.

## **Introdução**

A criptococose é uma infecção fúngica invasiva distribuída globalmente causada por espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*. Apesar de sua transmissão natural não ocorrer por entre humanos, apresenta desafios terapêuticos substanciais, uma vez que está relacionada com múltiplos mecanismos de virulência que permitem infectar e causar a morte do hospedeiro humano (MAY et al., 2015).

Criptococos estão frequentemente presentes no solo e infectam o hospedeiro através da inalação de esporos, com disseminação subsequente dos pulmões para o cérebro. A disseminação para o sistema nervoso central, que causa a meningoencefalite, é a forma mais comum de criptococose humana (VELA-DUARTE e HENAO-MARTÍNEZ, 2018). Sua capacidade de se estabelecer no Sistema Nervoso Central, em indivíduos imunossuprimidos, causa uma infecção de meninges avassaladora bem como do tecido cerebral, que é frequentemente acompanhada por pressão intracraniana elevada; sem tratamento rápido e eficaz, infecção do SNC é invariavelmente fatal (MAY et al., 2015). *C. neoformans* e *C. gattii* são os dois agentes etiológicos da criptococose, pertencentes ao filo Basidiomycota, podendo ser facilmente distinguidos de outras leveduras patogênicas pela presença de uma cápsula de polissacarídeo, capacidade de produção de melanina e atividade da urease (OLIVEIRA et al., 2011).

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos de forma específica e reversível. Podem se ligar a açúcares simples (mono ou dissacarídeos) e complexos (oligossacarídeos, presentes em glicoconjugados e polissacarídeos) (GHAZARIAN et al., 2011; SINGH et al., 2012). As lectinas podem ser encontradas em microrganismos, animais e plantas. Nas plantas são mais comumente encontradas nas

sementes (LAGARDA-DIAZ et al., 2017). A atividade de lectinas de plantas contra fungos tem sido relatada. Os mecanismos antimicrobianos das lectinas incluem a capacidade de formação de poros, seguida de alterações na permeabilidade celular, por exemplo. Além disso, a atividade antifúngica das lectinas está associada à propriedade de ligação da quitina, resultando na desintegração da parede celular do fungo (COELHO et al., 2018).

*Moringa oleifera* é uma planta da família Moringaceae, nativa do Nordeste da Índia, Paquistão e Afeganistão e atualmente cultivada em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo (ROLIM et al., 2016). Dentre vários estudos, foi descrita a atividade antioxidante de extrato alcóolico de folhas de *M. oleifera* (WANG et al., 2017) e atividade imunomoduladora de extrato metanólico de folhas em ratos albinos Wistar (NFAMBI et al., 2015). Extrato de semente de *M. oleifera* também foi avaliado como possível alternativa para tratamento de água potável, demonstrando potencial antimicrobiano contra bactérias (DASGUPTA et al., 2016).

As sementes de *M. oleifera* contêm uma lectina solúvel em água chamada WSMoL, que é uma proteína ligadora de quitina, com massa molecular de 60 kDa e ponto isoelétrico (pI) 5,5, sendo uma das proteínas das sementes de moringa com ação coagulante, reduzindo a turbidez da água (MOURA et al., 2016). WSMoL também é capaz de remover metais da água e apresenta atividade inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012; FREITAS et al., 2016; ALVES et al., 2020). A atividade antibacteriana de WSMoL já foi relatada contra bactérias patogênicas e corrosivas (MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017; CORIOLANO et al., 2020). Recentemente, foram descritos os efeitos de WSMoL no crescimento e sobrevivência de espécies de *Candida*. WSMoL inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, sendo capaz de induzir apoptose e necrose nas células fúngicas e causar hiperpolarização da membrana mitocondrial (SANTOS et al., 2021). Esses resultados estimularam a realização do presente trabalho, que teve como objetivo avaliar os efeitos de WSMoL no crescimento e sobrevivência de espécies de leveduras patogênicas de *Cryptococcus* bem como investigar os modos de ação envolvidos.

## **Materiais e métodos**

### *Purificação de WSMoL*

Sementes de *Moringa oleifera* foram coletadas em Recife e estocadas a -20 °C. Um exemplar está arquivado (nº 73.345) no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto

Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil). A coleta da planta foi realizada com autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e o acesso foi registrado (A97CBDF) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado. WSMoL foi isolada seguindo o procedimento descrito por Coelho et al. (2009). A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) e a capacidade de ligação de carboidratos de WSMoL foi verificada pelo ensaio de atividade hemaglutinante (PAIVA e COELHO, 1992) usando eritrócitos de coelho. O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) aprovou o método de coleta de eritrócitos (processo 23076.033782 / 2015-70).

### *Fungos*

As linhagens H99 (sorotipo A) e B3501 (sorotipo D) de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* (sorotipo B) foram cultivadas em meio Saboraud-Dextrose, incubadas a 30 °C por 48 h. Ágar a 1,5% (p/v) foi adicionado quando foi necessário o uso do meio sólido.

### *Teste de microdiluição*

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada utilizando o método proposto pelo Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST). WSMoL foi diluída em água destilada estéril em placas de 96 poços. As culturas de *C. neoformans* (cepas H99 e B3501) e *C. gattii* (cepa R265) foram ajustadas turbidimetricamente ( $DO_{600}$ ) para  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) em NaCl 0,15 M, sendo adicionadas em todos os poços da placa. As placas foram incubadas a sob agitação durante 48 h. A densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) foi determinada no tempo zero e no tempo final e os valores de concentração mínima inibitória (CMI) foram definidos como a menor concentração da lectina capaz de inibir em no mínimo 50% o crescimento fúngico em comparação com o controle. Para determinação da concentração mínima fungicida (CMF), inóculos (10  $\mu$ L) dos poços contendo WSMoL em concentrações maiores ou equivalentes a CMI foram transferidos para placas de Sabouraud Dextrose Ágar as quais foram incubadas a 28 °C por 24 h. A CMF corresponde à menor concentração capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônia em 99,9% em comparação com o inóculo inicial.

### *Curvas de crescimento*

As curvas de crescimento das leveduras incubadas com WSMoL a  $4 \times$  CMI,  $2 \times$  CMI, CMI,  $\frac{1}{2}$  CMI e  $\frac{1}{4}$  CMI foram estabelecidas. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, conforme descrito na seção anterior. O primeiro poço correspondia ao controle de esterilidade; o segundo poço correspondeu ao controle 100% de crescimento; o terceiro ao sétimo poços corresponderam a tratamentos com WSMoL. A microplaca foi incubada por 36 h a 28 °C e a  $DO_{600}$  determinada a cada hora. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### *Avaliação da morte celular*

As leveduras foram cultivadas por 36 h na ausência (controle) ou na presença de WSMoL na CMI e a morte celular foi avaliada usando o *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Álcool isopropílico (20%, v/v) foi usado como controle positivo. Os dados foram adquiridos no citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences). Um mínimo de 20.000 eventos foram coletados por amostra. As células coradas apenas com anexina foram consideradas apoptóticas; aquelas coradas apenas com iodeto de propídeo foram registradas como células necróticas; aquelas coradas com ambas as sondas foram consideradas em apoptose tardia ou em necrose; células não coradas foram consideradas viáveis. Cada ensaio foi realizado em triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

#### *Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )*

Os efeitos do WSMoL (CMI) no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de células de *Cryptococcus* também foram avaliados. As células não tratadas e tratadas com WSMoL (incubação por 36 h) foram lavadas com PBS e coradas com 250  $\mu$ L de 10  $\mu$ g/mL de rodamina 123 no escuro por 10 min. Após a incubação, as células de levedura foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo (canal FL1). Um mínimo de 20.000 eventos foram analisados. Mudanças na intensidade fluorescente da rodamina 123 foram quantificadas usando o índice de variação (VI) obtido pela fórmula:

$$IV = \frac{MT - MC}{MC}$$

onde MC é a média da intensidade da fluorescência no controle e MT a média no teste. Valores negativos de VI correspondem à despolarização da membrana da mitocôndria, enquanto valores positivos indicam hiperpolarização. Cada ensaio foi realizado em triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

#### *Avaliação da ocorrência de dano lisossomal*

As células foram tratadas por 24 h com WSMoL em concentrações correspondentes a CMI e  $2 \times$  CMI. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com laranja de acridina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (corante lisossomal) no escuro por 20 min. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Um mínimo de 20.000 eventos foi coletado. Cada ensaio foi realizado em triplicata e dois experimentos independentes foram realizados.

#### *Atividade antibiofilme*

Os fungos foram cultivados em meio YPD (2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura) por 24 h a 30 °C com agitação. As células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 3 min, lavadas três vezes com PBS, suspensas em Meio Mínimo e ajustadas para uma densidade de  $10^7$  células/mL. Os ensaios foram realizados em quadruplicata na presença ou ausência das lectinas (em concentrações na faixa de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em placas de poliestireno de 96 poços. Anfotericina B (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi utilizada como controle antifúngico. Nos controles negativos, os poços continham apenas meio. Após incubação a 37 °C durante 48 h, os poços foram lavados três vezes com PBS. A formação de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (2%) e a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil amino) carbonila]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT) + menadiona (MESHULAM et al., 1995).

#### *Análise estatística*

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de intervalo de Tukey; um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

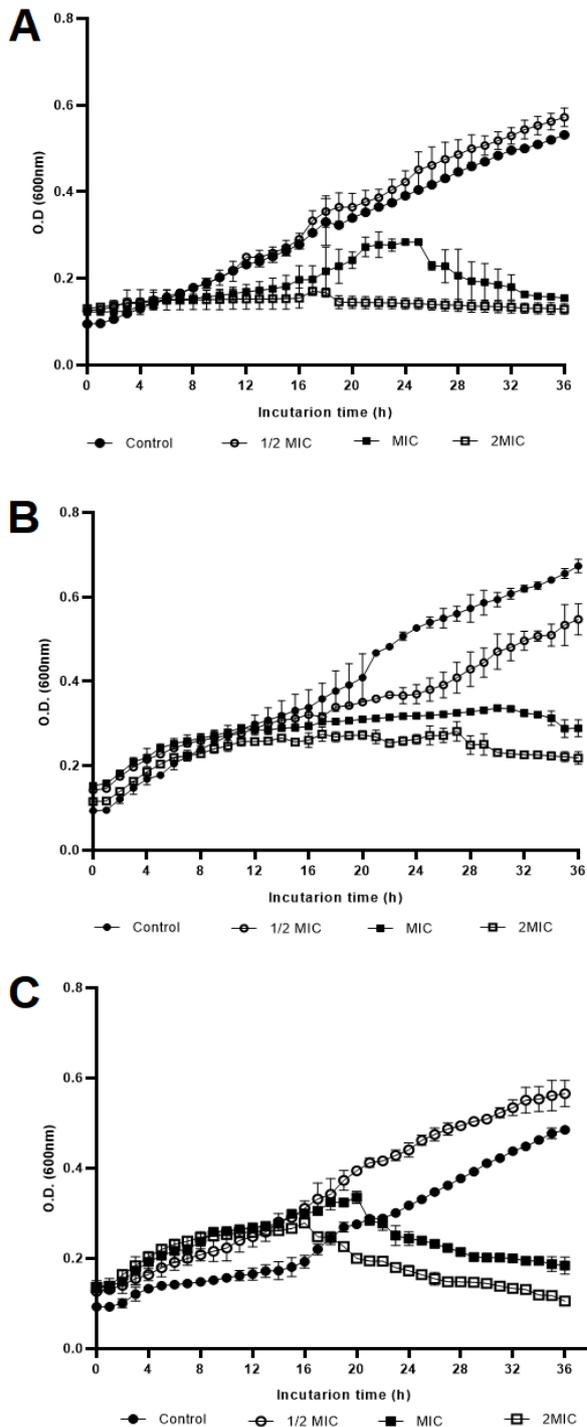
### **Resultados e discussão**

WSMoL apresentou atividade inibitória sobre o crescimento das três cepas de *Cryptococcus* com CMI de 6,25 µg/mL. WSMoL foi mais eficiente quando comparado às lectinas de folhas de *Abelmoschus esculentus* e de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr II), que apresentaram CMI > 500 µg/mL contra *C. neoformans e gattii* (KLAFKE et al., 2012). Por outro lado, WSMoL não apresentou efeito fungicida nas concentrações testadas, não sendo possível determinar valores de CMF. Jones et al. (2017) avaliaram uma lectina denominada citovirina, extraída da cianobactéria *Scytonema varium*, contra *C. neoformans* de sorotipos A e D e *C. gattii*. A citovirina apresentou valores de CMF de até 1 mM para o sorotipo D, sendo o sorotipo A mais fracamente inibido, com CMF entre 50 e 20 mM. Já para *C. gattii*, apresentou CMF de 500 mM.

Lectinas, incluindo WSMoL, têm apresentado ação antifúngica contra outras leveduras patogênicas. Os valores de CMI de WSMoL para *Cryptococcus* foram menores que os encontrados no estudo de Santos et al., 2021, que avaliaram WSMoL contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (CMI = 20 µg/mL para todas as espécies). Porém, conforme os mesmos autores, WSMoL teve ação fungicida contra *Candida* (CMF entre 20 e 80 µg/mL), o que não foi observado para os isolados de *Cryptococcus* neste estudo. Essas diferenças podem estar relacionadas com a composição da parede celular entre esses gêneros de leveduras. A quitina está presente em todas as leveduras, geralmente representando de 1 a 2% da matéria seca da parede celular, assim, tanto a parede celular de *Candida* quanto a de *Cryptococcus* são estruturas em bicamadas. Porém, sabe-se que a quitina está presente em quantidades menores na parede de *C. neoformans* em comparação com outras leveduras. Ainda, β-1,6-glucana é o componente mais abundante e β-1,3-glucana é o menos abundante na parede celular de *Cryptococcus*, ao contrário de outras leveduras (GARCIA-RUBIO et al., 2020).

A cinética da ação fungistática de WSMoL sobre os isolados de *Cryptococcus* foi acompanhada e os resultados podem ser vistos na Figura 1. Para *C. neoformans* B3501 (Figura 1A), observou-se que não houve efeito inibitório na concentração de ½ CMI. No tratamento com a CMI, o efeito fungistático foi observado até por volta de 24 horas de incubação, quando então começou a haver um declínio da densidade óptica. Na concentração de 2 × CMI, não foi observado crescimento da colônia, permanecendo a mesma DO<sub>600</sub> média ao longo do ensaio. Efeito inibitório foi observado para a *C. neoformans* H99 nas três concentrações (Figura 1B). Na concentração de ½ CMI, observou-se que apesar do crescimento ser menor que no controle, houve uma tendência de as células continuarem se

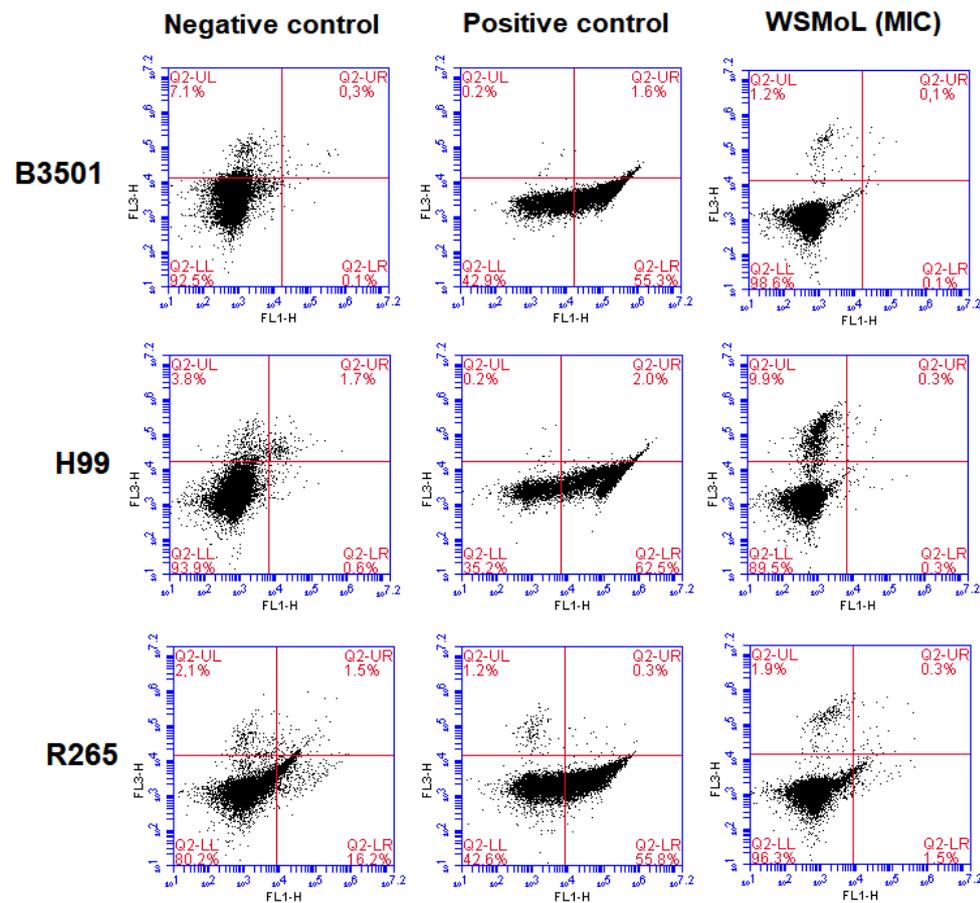
multiplicando. Com relação a CMI e  $2 \times$  CMI, o crescimento da colônia parou por volta de 12 horas. Por fim, para *C. gattii* R265 (Figura 1C), observou-se a ausência do efeito inibitório no tratamento a  $\frac{1}{2}$  CMI, ocorrendo inclusive maior crescimento que no controle negativo. Na CMI e  $2 \times$  CMI, o efeito inibitório da WSMoL se tornou aparente a partir de 16 h e 20 h de incubação, respectivamente, quando então começou a haver o declínio da densidade óptica.



**Figura 1.** Crescimento de *Cryptococcus neoformans* B5301 (A) e H99 (B) e de *Cryptococcus gattii* R265 (C) na ausência ou presença de WSMoL na  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI ou  $2 \times$  CMI. A densidade óptica (O.D.) a 600 nm foi determinada a cada hora durante 36 h. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. CMI: concentração mínima inibitória.

A viabilidade das células de

*Cryptococcus* incubadas com WSMoL na CMI por 36 horas foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 2). Com relação ao controle negativo, não foi detectada indução de apoptose para nenhum dos três isolados, indicando que a lectina não ativou mecanismos desencadeadores de morte celular programada. Para *C. neoformans* H99, foi detectado um número significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de células em necrose no tratamento com WSMoL (9,9%) que no controle negativo (3,8%), o que pode estar relacionado com danos na parede e membrana celulares.

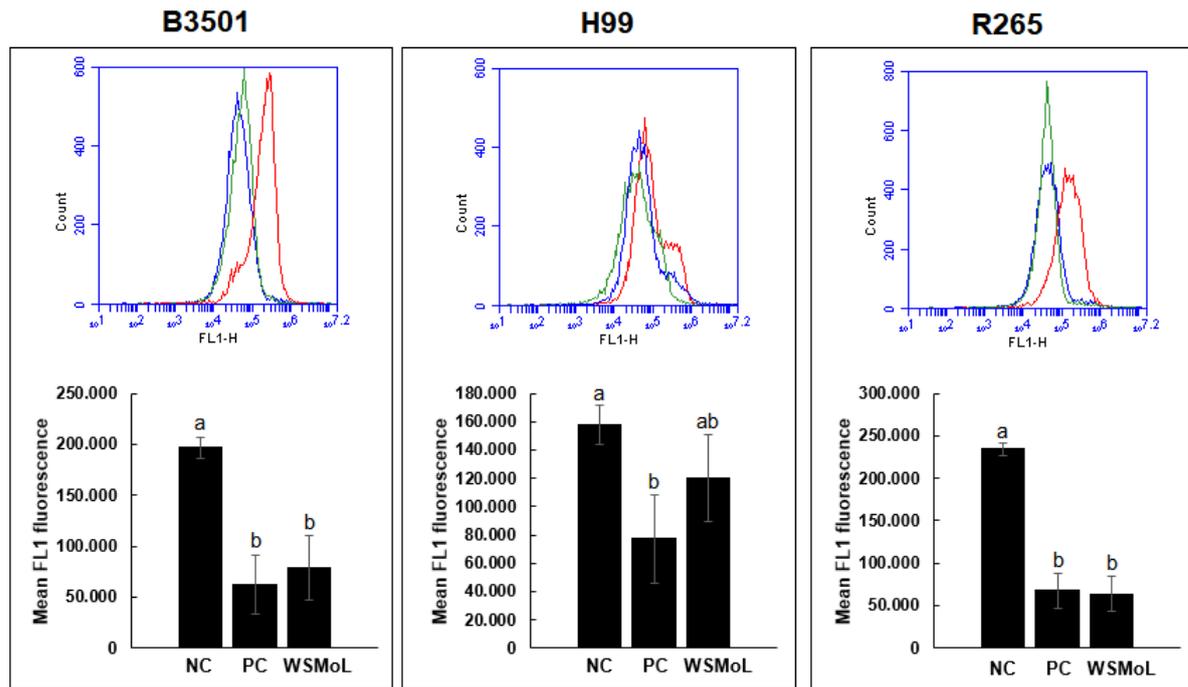


**Figura 2.** Investigação da morte celular em *Cryptococcus neoformans* B5301 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-tratadas (controle negativo) ou tratadas com WSMoL por 36 h na concentração inibitória mínima (CMI) ou álcool isopropílico a 20% (controle positivo). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo usando anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI). Nos gráficos representativos FL1 vs. FL3, eventos correspondentes a células apoptóticas (Ann+) e necróticas (PI+) podem ser vistos nos quadrantes LR e UL, respectivamente. As células em apoptose tardia ou necrose (AnnV+/PI+) são representadas no quadrante UR. As células viáveis estão no quadrante LL.

Os resultados descritos acima estão de acordo com as demais evidências de que WSMoL tem efeito fungistático, mas não fungicida sobre os isolados de *Cryptococcus* nas concentrações testadas. O declínio da densidade óptica observado no ensaio de cinética de crescimento em alguns dos tratamentos com WSMoL provavelmente se deve à ausência de replicação celular suficiente para repor a morte celular de células que ocorre normalmente, inclusive no controle negativo. Santos et al. (2020), avaliando o efeito da WSMoL sobre espécies de *Candida*, observaram que esta lectina induziu apoptose e necrose nas células de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, diferentemente do observado com as células de *Cryptococcus*, em mais uma indicação de modos de ação diferentes sobre leveduras desses dois gêneros.

No presente estudo, também foi avaliado a integridade dos lisossomos das células de *Cryptococcus* quando incubadas com WSMoL. Para *C. neoformans* B3501 e *C. gattii* R265, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da fluorescência média no controle positivo e no tratamento com WSMoL, indicando danos à integridade dos lisossomos (Figura 3). Já para *C. neoformans* H99, não foi observada redução significativa da fluorescência quando comparada ao controle negativo.

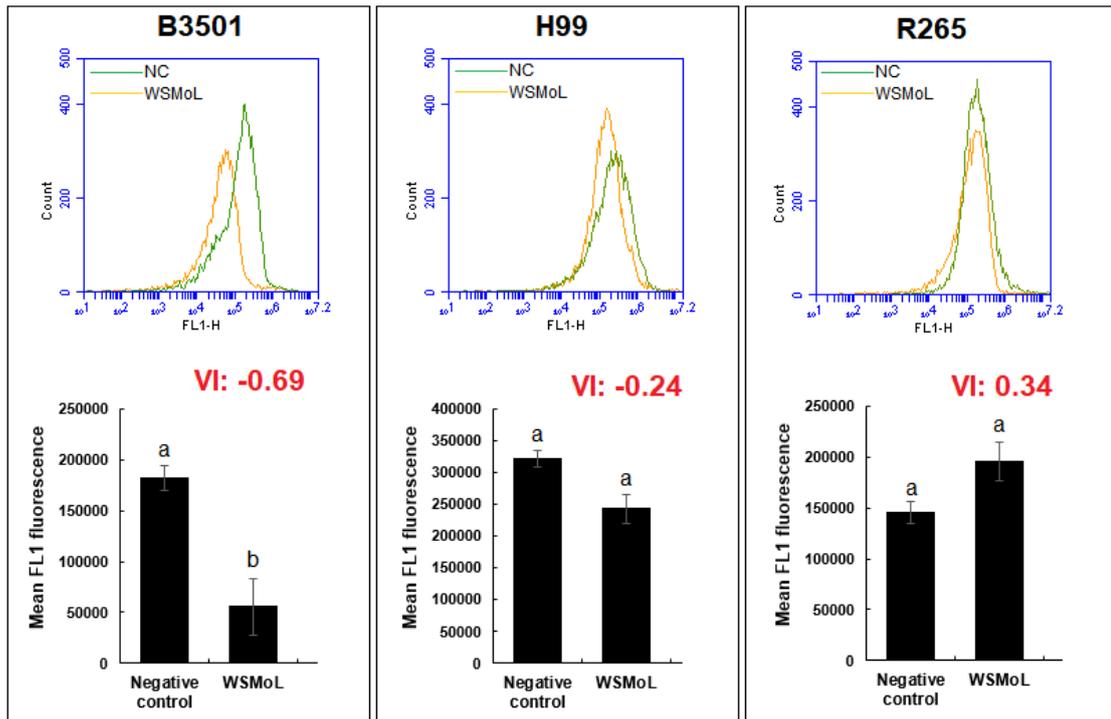
Os lisossomos, também denominados como vacúolos em células de leveduras e plantas, são conhecidos como estações terminais de degradação. São também centros de sinalização sofisticados que governam o crescimento, divisão e diferenciação celular. Eles fazem interface física com outras organelas e permitem a autofagia (LAWRENCE e ZONCU, 2019). Manter a integridade e função lisossomal é, portanto, crucial para a homeostase celular. Diferentes formas de estresse podem induzir a permeabilização da membrana lisossomal (LMP), resultando na translocação para o citoplasma de componentes intralisossomais, como catepsinas, induzindo a morte celular dependente de lisossoma (WANG et al., 2018).



**Figura 3.** Avaliação do efeito de WSMoL na integridade de lisossomos de *Cryptococcus neoformans* B3501 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 após incubação por 36 h com a concentração inibitória mínima (CMI) da lectina. As curvas mostram a fluorescência do laranja de acridina no canal FL1. As linhas vermelha, verde e azul correspondem a controle negativo (NC), WSMoL e controle positivo (PC), respectivamente.

Alterações a nível mitocondrial também foram analisadas. WSMoL foi capaz de causar despolarização da membrana mitocondrial de células de *C. neoformans* B3501 (Figura 4), como indicado pelo negativo de IV. Tanto as células de *C. neoformans* H99 quanto de *C. gattii* R265 não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle.

A viabilidade celular está relacionada com a atividade mitocondrial, danos ao DNA e excesso de espécies reativas de oxigênio. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) gerado pelas bombas de prótons (complexos I, III e IV) é um componente essencial no processo de armazenamento de energia durante a fosforilação oxidativa. A produção de ATP é realizada a partir do potencial transmembrana juntamente com o gradiente de prótons. Entretanto a queda ou o aumento nos níveis do  $\Delta\Psi_m$  pode induzir a perda da viabilidade celular (ZOROVA et al., 2018).



**Figura 4.** Avaliação dos efeitos de WSMoL no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de isolados de células de *Cryptococcus neoformans* B3501 ou H99 e *Cryptococcus gattii* R265 após incubação por 36 h com a concentração inibitória mínima (CMI) da lectina. Os histogramas de sobreposição mostram a fluorescência da rodamina 123 no canal FL1. VI: índice de variação.

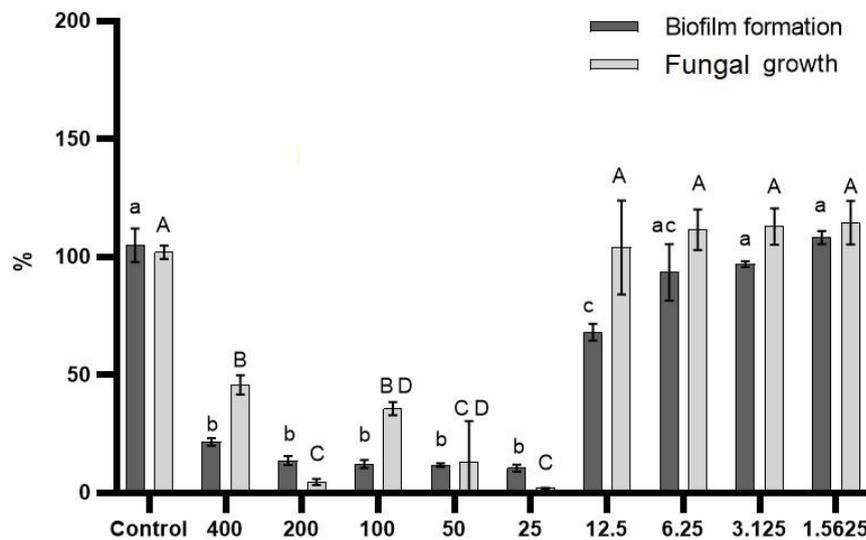
A despolarização indicada pela redução da fluorescência média da rodamina observada no tratamento de *C. neoformans* B3501 parece não ter sido suficiente para induzir a morte das células, mas pode estar relacionada com a ação fungistática da lectina. As mitocôndrias têm um papel central na regulação da proliferação celular, uma vez que as células “tomam” a decisão de se dividir somente quando preparadas metabolicamente para suportar a demanda energética imposta pela proliferação (ARCIUCH et al., 2012).

Biofilmes são comunidades multimicrobianas encerradas em matrizes poliméricas auto-sintetizadas e que se fixam em superfícies bióticas ou abióticas. O estado de biofilme, composto de células sésseis, é predominantemente encontrado na natureza e corresponde a 80% da biomassa microbiana mundial (MIQUEL et al., 2016). Várias moléculas antimicrobianas são incapazes de penetrar profundamente no biofilme ficando aprisionadas na matriz polimérica extracelular. Além disso, sob pressão antibiótica, as células no biofilme podem expressar mecanismos de resistência, tornando-as recalcitrantes a um número

considerável de antibióticos (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2017). Compostos naturais, como as lectinas, têm sido avaliadas devido a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes por microrganismos patogênicos (HASAN et al., 2014).

Dentre os isolados de *Cryptococcus* avaliados, somente *C. neoformans* B3501 se mostrou capaz de formar biofilme. WSMoL foi capaz de inibir a formação de biofilme nas concentrações entre 25 e 400 µg/ml (Figura 5). Abaixo de 12,5 µg/mL, houve um acréscimo significativo na formação de biofilme pelos isolados de *Cryptococcus*.

Ferreira et al. (2018) avaliaram a capacidade de ApuL em prejudicar o desenvolvimento do biofilme por *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Para *C. albicans*, o desenvolvimento do biofilme foi inibido em todas as concentrações avaliadas (12,5 a 200 µg/ml), obtendo uma inibição de até 70%. Para *C. parapsilosis* a atividade inibitória foi mínima, não ultrapassando 25% de inibição após o tratamento com ApuL. Silva et al. (2018) observaram o efeito de PgTeL sobre a formação de biofilme por *C. albicans*; esta lectina apresentou atividade antibiofilme apenas quando estava em baixas concentrações (0,195 e 0,39 µg/mL).



**Figura 5.** Formação de biofilme e crescimento de *Cryptococcus neoformans* B3501 na ausência (controle) e presença de WSMoL em diferentes concentrações. O crescimento foi avaliado pela densidade óptica a 600 nm). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Letras minúsculas foram usadas para comparação de formação de biofilme e letras maiúsculas para crescimento.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou que WSMoL apresenta potencial antifúngico contra *Cryptococcus* apresentando efeito fungistático, que pode estar associado a alterações celulares a níveis lisossomal e/ou mitocondrial. A lectina também induziu a inibição da formação de biofilme por *C. neoformans* B3501.

## Referências

- ALVES, R. R. V. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, V. 76, P. 730-736
- ARCIUCH. V. G. A. et al. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation, **Antioxidants & Redox Signaling** v. 16, n. 10, 2012
- COELHO J. S, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**. 2009 Nov; v. 77, n. 7, p. 934-938.
- COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 524–535, 2018.
- CORIOLOANO, M. C. et al., 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**, v. 129, p. 198-205, 2020.
- DASGUPTA, S. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of *Moringa oleifera* seed extract as a sustainable solution for potable water. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 25918–25926, 2016.
- FERREIRA, G. R. S. et al., 2018. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124 p. 152–162, 2018.
- FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, p. 645-649, 2016.
- FUENTE-NÚÑEZ, C. et al., Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies, *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, Issue 5, p. 580-589, 2013.

- GARCIA-RUBIO, R. et al., The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* **Species. Front Microbiol**, v. 10, n. 2993, 2020
- GHAZARIN, H. et al. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem**, v.113, n. 3, p. 236-247, 2011
- HASAN, I. OZEKI, Y. KABIR, S.R. Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*), **Indian Journal Biochemistry Biophysical**, v.51, p.142–148, 2014.
- LARGARDA-DIAZ, I., et al. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 6, 2017.
- JONES, T. H. et al. Novel antifungal activity for the lectin scytovirin: inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, artigo 755, 2017.
- JONES, E. B. G.; SUETRONG S.; SAKAYAROJ J.; BAHKALI ALI H.; ABDEL-WAHAB M. A. ; BOEKHOUT T.; PANG, KA-LAI. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*. V. 73, N. 1, p. 1–72; Ano. 2015
- KLAFKE, G. B. et al. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, v. 175, p. 147-151, 2013.
- LARGARDA-DIAZ, I., et al. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 6, 2017.
- LAWRENCE, R.E., ZONCU, R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. **Nature Cellular Biology**, n. 21, v. 2, p.133–142, 2019.
- MAY, R. C.; et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, n. 6, p. 1-12, 2015.
- MESHULAM, T.; LEVITZ, S.M.; CHRISTIN, L.; DIAMOND, R.D. A Simplified New Assay for Assessment of Fungal Cell Damage with the Tetrazolium Dye, (2,3)-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphenyl)-(2H)-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1153–1156, 1995.
- MIQUEL, S. et al. Anti-biofilm Activity as a Health issue. **Frontiers Microbiology**, v. 7, n. 592. p. 1-14, 2016.
- MOURA., M. C. et al. 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; n. 4, p. 861-874, 2017.

- MOURA, K.S., et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. *Appl Biochemistry Biotechnology* v. 180, p. 1361–1371, 2016.
- NFAMBI, J., et al. Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in Wistar albino rats, **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n.6, p. 603-611, 2015.
- OLIVEIRA, L. I.; et al., Criptococose pulmonar associada à infecção sistêmica por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cabra (*Capra hircus*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.7, p.1262-1265, 2011.
- PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol** 36, P. 113–118, 1992.
- PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 98, p. 419–429, 2017.
- ROLIM, J. C. et al. Hiperplasia miointimal na artéria ilíaca em coelhos submetidos à angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**; V. 43 n. 1, p. 028-034, 2016.
- SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **Plos One**, v. 7, p. e. 44840, 2012.
- SANTOS., L.M.M. et al. Anti-*Candida* activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). **Journal de Mycologie Médical**, 2021.
- SILVA, P. M. et al., PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, 2018.
- SINGH, H., Sarathi, S. P..Insight of Lectins- A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, V. 3, n. 4, 2012.
- WANG, Y. et al. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. **Food Chem**, V. 1, n. 218, p. 152-158, 2017.
- WANG, F. et al., Lysosomal membrane permeabilization and cell death. **Traffic**, v.19, p. 918–931, 2018.
- ZOROVA, L. D et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical biochemistry**, v. 552 P. 50-59, 2018

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ Leveduras patogênicas do Gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* são de grande relevância clínica visto que espécies desse gênero tem apresentado grande número de infecção e/ ou mortalidade, bem como resistência à antifúngicos.
- ✓ A ação antifúngica das lectinas ainda esta sendo pouco explorada, sendo estas mais avaliadas sobre o gênero *Candida*.
- ✓ WSMoL apresentou efeito inibitório sobre o crescimento e ação fungicida sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.
- ✓ A lectina induziu apoptose, necrose e alteração do potencial de membrana da mitocôndria das espécies de *Candida* avaliadas.
- ✓ WSMoL apresentou potencial inibitório sobre o crescimento das linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, porém não foi detectada ação fungicida.
- ✓ O tratamento com a lectina resultou em indução de necrose em *C. neoformans* H99, danos na integridade dos lisossomos de células de *C. neoformans* B3501 e *C. gattii* R265, bem como redução do potencial de membrana mitocondrial de *C. neoformans* B3501.
- ✓ WSMoL foi capaz de inibir a formação de biofilme pela cepa de *C. neoformans* B3501.
- ✓ WSMoL apresenta potencial antifúngico contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* por induzir eventos que comprometem a homeostase celular, o que estimula futuros estudos para a caracterização detalhada do mecanismo de ação dessa proteína.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. A. D. F. et al., The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v. 59, e13, p. 1-9, 2017.
- AKKOUH, O. 1, NG T. B.; SINGH S. S. 3, YIN C. 2, DAN X., CHAN Y. S., PAN W. CHEUNG R. C. F. Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. **Molecules**, v. 20, p. 648-668, 2015.
- ALVES, R. R. V. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- ANWAR, F., et al. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17–25, 2007.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 82, n. 1, p. 45-51, 2005.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, p. 45-51, 2005.
- AYERZA, R. Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) growing in the Arid Chaco of Argentina. **Industrial Crops and Products** v. 33 n. 2 p. 389–394, 2011.
- BUETER, C. L. CHARLES A. Specht, Stuart M. Levitz. Innate Sensing of Chitin and Chitosan. **Plos pathogens**, v. 9, n.1, p. 1-3, 2013.
- CATANZARO E. et al. Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Mar Drugs**. v. 18, n.1, p 1-40, 2019.
- CHANG M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER P. C. N.; PALHARES D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J. C.; MACHADO, V. E.

Candida blood stream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil.

- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere (Oxford)**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- COELHO, L. C. B. B.; P SILVA. M. S.; LIMA V. L. M.; PONTUAL E. V.,2 PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO,T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2017, p. 22, 2017.
- CORIOLO M. C, et al. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Protein Peptide Letters**, v. 25, n. 3, p. 295-301, 2018.
- CORIOLO, M. C. et al., 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**, v. 129, p. 198-205, 2020.
- CORIOLO, M. C. et al. 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**, v. 129, p. 198-205, 2020.
- CORIOLO, M. C. et al. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein and Peptide Letters**, v. 25, p. 295-301, 2018.
- DAN, X. et al. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**. V. 36; N. 2; p. 221–247, 2016.
- DIAS, R. O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.
- DIXIT, S. et al. Medicinal Properties of *Moringa oleifera*: a review. **International Journal of Education and Science Research** v. 3, n. 2, 2016.
- FARES, A.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. **Phytotherapy Research** 21 v. 4; n. 2; p. 17–25, 2013.
- FARMAKIOTIS, D. KONTOYIANNIS, D. P. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: Current viewpoint and practical recommendations for management. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. :318-324, 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.
- FITRIANA, W. D., ERSAM, T., SHIMIZU, K., & FATMAWATI, S. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, V. 16; N. 3; p. 297-301; Ano. 2016
- FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, p. 645-649, 2016.
- FRITIANA, W. D. et al. Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Extracts. **Indonesian Journal Chemistry**, v. 16, n.3, p. 297 – 301, 2016.
- FUENTEFRIA, A.M. et al., Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Applied microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.
- GAGO, S. et al. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. **Mycoses**, v. 60, p. 40-50, 2017,
- GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2013.
- GUARANA D. M. et al., Cryptococcosis in Patients with Hematologic Diseases  
Cryptococcosis in Patients with Hematologic
- HAMED, E. et al., Antimicrobial Activities of Lectins Extracted from Some Cultivars of *Phaseolus vulgaris* Seeds. **Journal Microb Biochem Technol**, 2017, v. 9, n. 3
- HAMID R., et al. Lectins: Proteins with Diverse Applications *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (4 Suppl 1), pp. S93-S103, May, 2013.
- ITAKURA Y, et al. Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, 2017.
- JIANG, Q.-L. et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Prolif.**, v. 48, p. 17–28, 2015.
- KALPANA,S.; MOORTHY, S.; KUMARI, S. Antimicrobial activity of different extracts of leaf of *Moringa oleifera* (Lam) against gram positive and gram negative bacteria **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**, v. 2, n. 12, p. 514-518, 2013.
- KINI, S. G., et al. Studies on the chitin-binding property of novel cysteine-rich peptides from *Alternanthera sessilis*. **Biochemistry**, v. 3, p. 6639–6649, 2015.

- KUMAR K. K., CHANDRA L. P. K., SUMANTHI J.; REDDY S. G.; SHEKAR C. P.; REDDY B. V. R. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences** v. 4, 2012.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89 p. 45–55, 2011.
- LEONE A.; BATTEZZATI, A.; SPADA A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL J.; BERTOLIS. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human International Journal Of Molecular Sciences; N. 17; V. 12, 2016.
- LEONE A.; et al *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human **International Journal of Molecular Sciences**; N. 17; V. 12. Ano. 2016
- LINDBERG, E. et al. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.
- LUZ, L.A., et al., Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological**, v. p. , 2013.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. L. et al., *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 87; p. 482-488, 2017.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. L. et al., *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, V. 87; p. 482-488. Ano. 2017
- MBIKAY, M. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. v. 3 A. 24; 2012.
- MEDEIROS, D. S. et al. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella* apion: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B v. 155, p. 211–216, 2010.
- MEDEIROS, D. S. et al. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella* apion: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B v. 155, p. 211–216, 2010.
- 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, p. 1- 8, 2020

- MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.
- MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.
- MOURA, M. C. et al. Water-soluble lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 666-676, 2015.
- MOURA, M.C. et al. 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.
- MOURA., M. C. et al. 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; n. 4, p. 861-874, 2017.
- NAEEM A.; et al.. Purification and characterization of a novel beta-D-galactosides-specific lectin from *Clitoria ternatea*. **Protein Journal** 2007, v. 26, n. 6, p. 403-413.
- NETO, J. B. A., et al., Antifungal activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **Plos one**, v. 9; n. 5, 2014.
- NOGUEIRA M. F. et al. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. **Journal of Microbiology and Modern Techniques**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- OLIVEIRA, A. P. S. et al Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, 2016.
- OLIVEIRA, A. P. S. et al. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, p. 101615, 2020.
- PAIVA, P. M. G. et al. EFFECTS OF PLANT LECTINS AND TRYPSIN INHIBITORS ON DEVELOPMENT, MORPHOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF INSECT LARVAE. ISBN: 978-1-61942-662-7 Editors: Kia Pourali and Vafa Niroomand Raad, **Nova Science Publishers, Inc.** ISBN: 978-1-61942-662-7, 2012

- PAIVA, P. M. G. et al. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.
- PAIVA, P. M. G., et al., Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A Mendez-vilas (Ed), 2010.
- PERLIN D. S. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management **Lancetious Infect Disease**, v. 17, n. 12, p. 383-392, 2017.
- POMPEU, D. G. et al., Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. **Food Science technology Campinas**, v. 35, n. 4 p. 696-703, 2015.
- POMPEU, D. G. et al., Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. **Food Science technology Campinas**, v. 35, n. 4 p. 696-703, 2015.
- PONTUAL, E. V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural Product Research. Abingdon: Taylor & Francis Ltd**, v. 32, n. 24, p. 2940-2944, 2018.
- PREECHASUTH, K., et al. Cell wall protection by the *Candida albicans* class I chitin synthases. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82; p. 264–276, 2015.
- 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 Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.
- QADIR, S., et al. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 999-1006, 2013.
- QADIR, S., et al. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 999-1006, 2013.
- QADIR, S., et al. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 999-1006, 2013.
- RAMOS A. D, Cryptococcal fungemia and probable histoplasmosis in a patient infected with HIV. Case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 704, 2018.

- ROLIM, J. C. et al. Iliac artery myointimal hyperplasia in rabbits submitted to angioplasty and treated with *Moringa oleifera*. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.43, n. 1, p. 028-034, 2016.
- ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. T53-T58, 2011.
- SAINI, R. K.; SIVANESAN I.; KEUM Y. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 **Biotech** v. 6; n. 2; p. 1-14, 2016.
- SAINI, R. K.; SIVANESAN I.; KEUM Y. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 **Biotech** v. 6; n. 2; p. 1-14, 2016.
- SANTOS A. F. S., LUZ, L. A.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H., PAIVA P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree V. 4; N. 6; p. 388-402, 2015.
- SANTOS, A. F.S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44 p. 504–508, 2009.
- SANTOS, L.M.M. et al. Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). **Journal de Mycologie Médicale**, xxx (xxxx) xxx, p. 1-7.
- SANTOS, N. D. L. Efeito da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) sobre a oviposição de *Aedes aegypti* e avaliação da atividade ovicida. Teses de Doutorado Programa de pós graduação em Bioquímica e Fisiologia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- SANTOS, N. D. L. et al. 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, p. 3-8, 2020.
- SANTOS, N. D. L. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitology Research** , v. 113, p. 1837-1842, 2014.
- SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **Plos One**, v. 7, p. e. 44840, 2012.
- SHARIFUDIN, S. A.; FAKURAZI S.; HIDAYAT M. T.; HAIRUSZAH I.; MOKLAS M. A. M.; ARULSELVAN, P. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* extracts against

- acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pharmaceutical Biology**; N. 51; V. 3; p. 279–288, 2013.
- SHARON, N.; Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** v. 14 n. 11 p. 53–62, 2004.
- SILVA, J. A., et al. Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* candida (BvcL) seeds. **The Protein Journal**, v. 26 n. 3, p. 193-201, 2007.
- SILVA, L. L. S. et al. Investigation of the ability of the oviposition-stimulant lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) to bind with membrane proteins present in the legs of *Aedes aegypti*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 657-662, 2020.
- SILVA, L. L. S. et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, p. 109583, 2019.
- SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108 p. 391–400, 2018.
- SINGH R. S, Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity. **Plos One**, v. 9 n. 10, p. 1-9, 2014.
- SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on Artin M properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30 p. 641–657, 2013.
- TALATTOF Z, AZAD A, ZAHED M, SHAHRADNIA N. Antifungal Activity of Xylitol against *Candida albicans*: An in vitro Study. **Journal of contemporary dental practice author guidelines**, v. 19 N. 1; p. 125-129; 2018.
- TILOKE, C. et al. *Moringa oleifera* Gold Nanoparticles Modulate Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and Caspase-9 Splice Variants in A549 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 117, p. 2302–2314, 2016.
- TILOKE, C. et al. *Moringa oleifera* Gold Nanoparticles Modulate Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and Caspase-9 Splice Variants in A549 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 117, p. 2302–2314, 2016.

- VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, V. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- WANG R. Y, et al. Cryptococcosis in patients with hematological diseases: a 14-year retrospective clinical analysis in a Chinese tertiary hospital. **BMC Infectious Disease**, v. 17, n. 1 p. 1-9, 2017.
- WIEDERHOLD N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infect Drug Resist**, v. 10, p. 249-259, 2017. .
- YURRE, A. R. Evaluation of the Cardiac Effects of a Water-Soluble Lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* Seeds. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 114, p. 1029-1037, 2020.
- ZAFFER M.; AHMAD S.; SHARMA R.; MAHAJAN S.; GUPTA A.; AGNIHOT. R. I. R. K. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutica Sciences**, n. 27; v.6; p.1857-1862, 2014.
- ZAFFER M.; AHMAD S.; SHARMA R.; MAHAJAN S.; GUPTA A.; AGNIHOT. R. I. R. K. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutica Sciences**, n. 27; v.6; p.1857-1862, 2014.
- ZIATABARA, S., et al. Chitin, chitinases, and chitin lectins: Emerging roles in humanpathophysiology. **Pathophysiology** v. 25, p. 253–262, 2018.
- ZUBČEVIĆ, N.; FOČAK, M. e D. SULJEVIĆ,. Highly specific hemagglutination activity of plant lectins in specific species: case of Fabaceae and Solanaceae. **Bulgaria Journal of Agricultural Science**, v. 24, n. 3, p. 391–397, 2018.

