



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANA CAROLINA SANTI GADELHA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS
LECTINAS DE *Dioclea virgata*, *Canavalia maritima* E *Canavalia brasiliensis* EM
CULTURAS DE FUNGOS DERMATÓFITOS E *Malassezia***

AREIA

2023

ANA CAROLINA SANTI GADELHA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS
LECTINAS DE *Dioclea virgata*, *Canavalia maritima* E *Canavalia brasiliensis* EM
CULTURAS DE FUNGOS DERMATÓFITOS E *Malassezia***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto de
Oliveira Júnior.

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G124c Gadelha, Ana Carolina Santi.

Caracterização e avaliação da atividade antifúngica das lectinas de *Dioclea virgata*, *Canavalia maritima* e *Canavalia brasiliensis* em culturas de fungos dermatófitos e *Malassezia* / Ana Carolina Santi Gadelha.

- Areia:UFPB/CCA, 2023.

45 f. : il.

Orientação: Carlos Augusto de Oliveira Júnior.

TCC (Graduação) - UFPB/CCA - Areia.

1. Medicina Veterinária. 2. Dermatomicose. 3. Micologia. 4. Plantas. 5. Quitina. I. Oliveira Júnior, Carlos Augusto de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09 (02)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS II – AREIA - PB**

DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Aprovada em 10/11/2023.

“Caracterização e avaliação inicial da atividade antifúngica das lecitinas de *Dioclea virgata*, *Canavalia maritima* e *Canavalia brasiliensis* em culturas de fungos dermatófitos e *Malassezia*”

Autor: Ana Carolina Santi Gadelha

Banca Examinadora:

Carlos Augusto de Oliveira Jr

Prof^ª. Dr^ª. Carlos Augusto de Oliveira Júnior
Orientador(a) – UFPB

Loise Araujo Costa

Prof^ª. Dr^ª. Loise Araujo Costa
Examinador(a) – UFPB

Edinaldo Leite Filho

Me. Edinaldo Leite Filho
Examinador(a) – UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Tatiane, pois sem seu apoio e dedicação eu seria incapaz de aguentar sozinha tantos desafios e adversidades ao longo da elaboração deste trabalho, sem contar os inúmeros conselhos ao longo do curso, sempre reforçando, que mesmo longe, estaria disponível sempre que eu precisasse, amo você de coração, você é o motivo de eu seguir em frente quando tudo parece perdido.

Ao meu orientador, Carlos Oliveira, por ter aceitado me orientar e topado o desafio que foi esse TCC, mesmo sem nunca ter sido meu professor em alguma disciplina ou sequer me conhecer, abraçou a ideia e me apoiou durante todo trajeto, sem contar nas horas infindáveis no laboratório me ajudando com a pesquisa, obrigada pela paciência e compreensão.

Ao meu pai, Carlos Gadelha, por me sustentar financeiramente ao longo do curso, sanado minhas dúvidas quando precisei e me consolado nos momentos de desespero, apesar da casca grossa, você tem um bom coração, te amo.

À minha gata, Lilith, que entrou na minha vida nos primeiros períodos do curso como “lar temporário” e que ficou comigo até o fim dele, minha companheira que não me deixava me sentir só, meu motivo de seguir em frente e me apaixonar por gatos, eu busquei salvar a sua vida quando te conheci e você salvou a minha.

À minha melhor amiga, Lorena Monteiro, irmã de consideração, demorou alguns períodos para que nos aproximássemos, mas depois que nos conhecemos, não nos desgradamos mais, obrigada pelo apoio, por vir ao meu encontro sempre que precisava ao longo do curso, pelas conversas aleatórias e pelos filmes e séries assistidos comendo pizza com cream cheese, você é uma amizade que quero levar para vida.

À minha amiga Renalle Aragão, pela amizade que começou desde o ensino médio, foi muito bom te reencontrar no mesmo curso e compartilhar momentos juntas.

Aos técnicos do laboratório de microbiologia, Edinaldo e Gêneses, por me ensinarem praticamente todas as práticas do laboratório, vocês foram essenciais para realização desse trabalho, obrigada pela paciência e bom humor.

RESUMO

Com o aumento dos casos de dermatomicose e limitadas opções de antifúngicos, faz-se necessárias novas pesquisas voltadas para o tratamento de fungos na veterinária. O presente trabalho teve como objetivo averiguar se as lectinas purificadas em quitina dos extratos produzidos pelas sementes das plantas *Canavalia brasiliensis*, *C. maritima* e *Dioclea virgata* possuíam atividade antifúngica contra os fungos *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Malassezia*. Para tal, utilizou-se de discos estéreis de papel filtro contendo os extratos purificados das referidas plantas nas quantidades de 5, 10, 20 e 40 µg de proteínas para os testes e Clotrimazol a 5 e 10 µg como controle, distribuídos sobre meios de Ágar Sabouraud contendo os fungos supracitados. Como resultado, nenhum dos extratos testados apresentou inibição do crescimento fúngico nas concentrações testadas. Entretanto, testes adicionais com maiores concentrações de proteínas, além de novos repiques para verificar se houve danos a colônias futuras são recomendados para averiguar a possível atividade antifúngica das lectinas em questão.

Palavras-Chave: dermatomicose; micologia; veterinária; plantas; quitina.

ABSTRACT

With the increase in cases of dermatomycosis and limited antifungal options, new specific research into the treatment of fungi in veterinary medicine is needed. The present work aimed to determine whether the lectins purified in chitin from extracts produced by the seeds of the plants *Canavalia brasiliensis*, *C. maritima* and *Dioclea virgata* had antifungal activity against the fungi *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Malassezia*. For that, sterile filter paper discs containing with purified extracts of the aforementioned plants were used in amounts of 5, 10, 20 and 40 µg of proteins for the tests and Clotrimazole at 5 and 10 µg as control, distributed on Sabouraud agar medium containing the aforementioned fungi. As a result, none of the extracts tested showed inhibition of fungal growth at the concentrations tested. However, additional tests with higher concentrations of proteins, in addition to new subcultures to check whether there was damage to future colonies, are recommended to investigate the possible antifungal activity of the lectins in question.

Keywords: dermatomycosis; mycology; veterinary; plants; chitin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura molecular plana do Colesterol (1), presente na membrana plasmática de animais e Ergosterol (2), presente na membrana plasmática dos fungos.....	20
Figura 2 –	<i>Canavalia maritima</i> em seu habitat natural: (a) esteiras densas crescendo na praia, (b) inflorescência, (c) vagem verde e (d) sementes ejetadas das vagens.....	22
Figura 3 –	Vagens, sementes e flor de <i>Canavalia brasiliensis</i>	24
Figura 4 –	Flores de <i>Dioclea virgata</i>	25
Figura 5 –	Representação dos Picos I e II da cromatografia de Dvir em coluna de Quitina.....	30
Figura 6 –	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas obtidas de colunas de Sephadex e Quitina respectivamente. A: Dvir, B: ConM, C: ConBr , D: Dvir II, E: ConBr II, F: ConM II e M: Marcador de Peso Molecular.....	32
Figura 7 –	Teste em meio DTM fungos UFPB.....	33
Figura 8 –	Teste em meio DTM fungos UFPEL.....	34
Figura 9 –	Macroconídio de <i>M. canis</i> retirado de placa de DTM.....	34
Figura 10 –	Cultura de <i>Malassezia</i>	35
Figura 11 –	Teste da lectina Dvir II em suas diferentes concentrações contra <i>T. mentagrophytes</i>	36
Figura 12 –	Teste do Clotrimazol em suas diferentes concentrações contra <i>T. mentagrophytes</i>	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características morfológicas de macroconídios de <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum. gypseum</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	16
Quadro 2 - Aparência colonial e características micromorfológicas dos principais dermatófitos.....	18
Quadro 3 - Diâmetro dos halos de inibição em milímetros do Clotrimazol e suas diferentes concentrações em seus respectivos fungos teste após 5 dias.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de Proteína Solúvel das lectinas ConBr II, ConM II e Dvir II.....	31
Tabela 2 - Percentual de Solubilidade das Lectinas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> do pico retido de Sephadex
ConBr II	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> do pico retido de Quitina
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> do pico retido de Sephadex
ConM II	Lectina de <i>Canavalia maritima</i> do pico retido de Quitina
DTM	Dermatophyte Teste Medium
Dvir	Lectina de <i>Dioclea virgata</i> do pico retido de Sephadex
Dvir II	Lectina de <i>Dioclea virgata</i> do pico retido de Quitina
µg	Micrograma
mg/kg	Miligrama por quilograma
pH	Potencial hidrogeniônico
Pico I	Pico não retido
Pico II	Pico retido
°C	Graus Celsius

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FUNGOS.....	15
2.1.1	Parede Celular Fúngica.....	15
2.1.2	Dermatófitos.....	16
2.1.3	<i>Malassezia</i>	18
2.1.4	Opções Terapêuticas.....	19
2.2	LECTINAS E SUAS PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS.....	21
2.2.1	<i>Canavalia maritima</i>	22
2.2.2	<i>Canavalia brasiliensis</i>	24
2.2.3	<i>Dioclea virgata</i>	25
3	METODOLOGIA	25
3.1	PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	26
3.2	OBTENÇÃO DAS LECTINAS.....	26
3.2.1	Cromatografia da Lectina em Quitina.....	26
3.2.2	Teor de proteínas solúveis.....	27
3.2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	27
3.3	TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM FUNGOS DERMATÓFITOS E <i>Malassezia</i>	28
3.3.1	Preparo das soluções de lectinas.....	28
3.3.2	Preparo dos discos.....	28
3.3.3	Preparo dos inóculos.....	28
3.3.4	Ensaio da Atividade Antifúngica.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LECTINAS <i>C. brasiliensis</i> , <i>C. maritima</i> E <i>D. virgata</i>	29
4.1.1	Cromatografia de afinidade	29
4.1.2	Dosagem de proteínas solúveis das lectinas obtidas do pico II da coluna de Quitina.....	30
4.1.3	Eletroforese PAGE-SDS.....	31

4.2	TESTE DE VIABILIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS RECEBIDOS.....	33
4.2.1	Teste fungos dermatófitos em meio DTM.....	33
4.2.1.1	Observação de fungos dermatófitos pós positivamente em meio DTM.....	34
4.2.2	Viabilidade e Identificação <i>Malassezia</i>.....	35
4.3	TESTE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS LECTINAS EM DERMATÓFITOS E <i>Malassezia</i>	35
5	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucariontes que podem ser unicelulares, quando em forma de levedura, ou multicelulares, no caso dos filamentosos, com sua parede celular composta de quitina e α -glucano (Molinaro, Caputo e Amendoeira, 2009). Nas últimas décadas, as dermatomicoses vêm ganhando espaço na clínica de pequenos animais, especialmente os causados pelos chamados dermatófitos, devido à utilização crescente de terapias imunossupressoras, além do surgimento de infecções retrovirais que debilitam o sistema imune. Isso ocorre tanto em humanos como animais, o que permite que doenças oportunistas, sobretudo as fúngicas, tenham maior incidência (Gomes *et al.*, 2012).

A maioria dos casos clínicos de dermatofitose em cães e gatos é causada pelas espécies *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, com *M. canis* sendo o principal deles (Medeiros *et al.*, 2009). Os felinos são os mais predisponentes a carrear de forma assintomática *M. canis* devido à convivência com outros animais, acesso as ruas e fatores socioeconômicos (Ribeiro *et al.*, 2021). No geral, os principais reservatórios dos dermatófitos são: *M. canis* – gato infectado, *M. gypseum* – escavação do solo em áreas contaminadas, *T. mentagrophytes* – contato direto ou indireto com roedores (Rhodes e Werner, 2014).

Apesar dos dermatófitos serem os principais agentes das dermatomicoses, outros fungos também podem vir a desempenhar este papel. Leveduras do gênero *Malassezia* compõem a microbiota natural da pele e do conduto auditivo externo do animal, mas podem se tornar agentes da doença quando o animal apresentar hipersensibilidade à levedura, realizar um tratamento prolongado com antibiótico ou haja um crescimento excessivo, em virtude de uma doença primária (Chaves, 2007).

Atualmente existe um número de antifúngicos no mercado farmacêutico bem inferior aos antibacterianos, além disso, seu alvo celular é limitado devido à semelhança entre as células fúngicas e animais. Com a crescente necessidade por opções terapêuticas mais seguras e eficazes, a pesquisa por novas biomoléculas se torna imprescindível para o avanço da medicina como um todo, somado a isso, o Brasil detém a maior biodiversidade vegetal do mundo, com várias plantas ainda não investigadas sobre seu potencial medicinal (Soares *et al.*, 2016). À vista disto, temos

a possibilidade de utilização de lectinas presentes em extratos de plantas, como uma possível alternativa no tratamento de dermatomicoses.

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, encontradas em maior abundância em grãos de leguminosas e gramíneas, de origem não imune que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos específicos sem alterar sua estrutura (Peumans e Van Damme, 1995; Siqueira, 2008). Lectinas ligantes de quitina apresentam um maior índice de interferência contra os fungos, tendo em vista que prejudicam na síntese e/ou deposição desse carboidrato na parede celular fúngica causando deformações e instabilidade osmótica (Araújo, 2015). Uma vez que há essa interação, ela pode passar a interferir em vários eventos biológicos, como infecção, diferenciação celular, interação patógeno-hospedeiro, metástases e reconhecimento de células (Klafke, 2013).

Em vista disso, autores constataram atividades antifúngicas que lectinas purificadas em Sephadex-G50 de *Canavalia maritima*, *C. brasiliensis* e *Dioclea virgata* podem vir a desempenhar. Como a redução na produção de esporos, inibição do crescimento fúngico, diminuição da dosagem de efeito do antifúngico e dano as hifas que prejudique a formação de novas colônias (Farias, 2013; Fonseca *et al.*, 2022; Gomes, 2009; Klafke, 2013). Com isso em evidência, espera-se que ao purificar essas lectinas em quitina, possa haver efeitos semelhantes e mais eficazes aos descritos em Sephadex por ser mais específica ao carboidrato presente nos fungos, como também seja mais seguro para uso em animais, uma vez que este carboidrato não é comum nas células animais.

Dessa forma, faz-se necessário uma pesquisa para investigar se lectinas ligantes de quitina presentes nos extratos de *C. maritima*, *C. brasiliensis* e *D. virgata* possuem atividade antifúngica contra dermatófitos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, além de fungos do gênero *Malassezia*. O que poderá permitir um futuro desenvolvimento de um tratamento tópico e/ou sistêmico, além de contribuir com o enriquecimento científico a respeito das citadas lectinas, sua purificação com quitina e possíveis propriedades antifúngicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS

Tradicionalmente os fungos foram divididos em cinco filos, sendo eles Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota (Santos, 2015). Entretanto, com os recentes estudos filogenéticos utilizando técnicas moleculares que dão mais importância as características genéticas que morfológicas, houveram modificações na classificação taxonômica dos fungos, sendo descritos pelo menos 20 filos de fungos em listas internacionais de classificação (<https://nmdc.cn/fungalnames/>) (Wang *et al.*, 2022). Ainda assim, a identificação morfológica mantém sua importância, sobretudo para grupos mais comuns e tradicionais, sendo uma importante ferramenta de diagnóstico (Molinaro, Caputo e Amendoeira, 2009).

2.1.1 Parede Celular Fúngica

A parede celular fúngica é composta principalmente por polissacarídeos, possui uma camada interna mais conservada, formada por β -(1,3)-glucana, β -(1,6)-glucana ramificadas e quitina na maioria dos fungos, e uma camada externa mais heterogênea e espécie-específica devido aos componentes que se ligam as moléculas dessa camada (Rochetti, 2019). A quitina é um constituinte comum da parede celular de fungos responsável pela integridade celular, é um homopolímero linear, longo, formado por resíduos de N-acetilglucosamina β -(1 $\rightarrow$ 4) ligados. Em leveduras compõe em torno de 1 a 2% de sua parede celular, enquanto que em fungos filamentosos pode chegar de 10 a 20% (Fukuda *et al.*, 2009).

Deve-se ressaltar que a parede celular fúngica confere rigidez e participa de vários processos biológicos essenciais à célula como estabilidade osmótica, sinalização celular, adesão e reprodução, sendo essencial para seu crescimento e desenvolvimento no ambiente (Klafke, 2013; Quinn, 2007). Sua composição química é bastante complexa e variada entre as diferentes espécies, sendo a quitina, glucanas, galactomananas e proteínas os compostos mais frequentes (Adams, 2004).

2.1.2 Dermatófitos

Os dermatófitos pertencem ao filo Ascomycota e possuem como principais representantes os gêneros anamorfos, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, e teleomorfo *Arthroderma* (Oliveira, T., 2018). O filo Ascomycota é o maior do Reino Fungi, nele estão inclusos fungos septados e algumas leveduras, sua principal característica é a produção de ascósporos, esporos sexuais, durante sua reprodução sexuada em sua fase não parasítica. Também podem ter reprodução assexuada pela produção de macroconídios e microconídios a partir de conidióforos nessa fase, sendo os macroconídios os mais comumente utilizados para classificação dos dermatófitos (Quadro 1) (Mcvey, Kennedy e Chengappa, 2017; Molinaro, Caputo e Amendoeira, 2009; Tortora, Funke e Case, 2017). Quando passam a parasitar, sua forma de reprodução passa a ser assexuada com produção de artrósporos ou artroconídios que são as formas infecciosas mais comumente associadas à invasão tecidual (Quinn, 2007). Os artrósporos são esporos formados pela desarticulação da hifa de fungos filamentosos ou leveduras, através desses esporos tem-se a infecção dos tecidos queratinizados, unhas, pelo e extrato córneo (ANVISA, 2013; Xavier *et al.*, 2008).

Quadro 1: Características morfológicas de macroconídios de *Microsporum canis*, *Microsporum. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*

Dermatófitos	Características morfológicas dos macroconídios
<i>M. canis</i>	Fusiforme, rugoso, parede grossa, até 15 septos.
<i>M. gypseum</i>	Forma de canoa, rugoso, paredes finas, até 6 septos.
<i>T. mentagrophytes</i>	Forma de charuto, liso, parede fina, até 7 septos.

Fonte: adaptado de Quinn, 2007.

Dermatomicose são as dermatoses causadas por qualquer fungo, enquanto que dermatofitose são as dermatoses causadas por fungos dermatófitos. A dermatofitose é uma enfermidade zoonótica, altamente contagiosa, que se dissemina por meio do contato direto com animais infectados, ou através da exposição aos esporos fúngicos em descamações cutâneas, pelos de animais infectados, no ambiente e em fômites contaminados. Animais assintomáticos são um importante fator na ocorrência das dermatofitoses em humanos, uma vez que não

possuem lesões aparentes, mas ainda assim podem disseminar a micose, atuando como fontes constantes de infecção e contaminação ambiental (Andrade e Rossi, 2019).

Os sinais clínicos dessa enfermidade são evidenciados principalmente nas áreas de face, orelhas, patas e cauda com o aparecimento de uma área circular com perda de pelo de borda externa alta e avermelhada e pele escurecida como resultado da reação inflamatória ao fungo. No geral são lesões secas, não pruriginosas que se distribuem focalmente na superfície cutânea, sem causar transtornos gerais aos animais afetados (Cardoso, Frias e Andreani, 2013). Algumas de suas principais características clínicas são a alopecia circular multifocal, descamação, eritema e lesões de distintas configurações (Chaves, 2007; Nogueira *et al.*, 2013).

O diagnóstico é baseado na suspeita clínica e exame laboratorial do pelo para detecção de hifas e artrósporos no microscópico com hidróxido de potássio a 10%, também pode ser utilizada a Lâmpada de Wood, porém ela apenas detecta a presença de *M. canis* não descartando outros dermatófitos, o confirmatório se dá por meio de cultura fúngica dos pelos (Cardoso, Frias e Andreani, 2013; Ribeiro *et al.*, 2021).

Por serem aeróbios estritos a maioria dos dermatófitos cresce lentamente em ágar dextrose Sabouraud padronizado, poucos necessitam de fatores de crescimento especiais, podendo ser supridos com adição de extrato de levedura ao meio de cultura. O meio de cultura ideal para o diagnóstico de dermatófitos é o Dermatophyte Teste Medium (DTM), composto de Ágar Sabouraud, antimicrobianos, para inibir o crescimento de bactérias e fungos saprófitos, e de vermelho fenol como indicador de pH (Macedo, Silva e Junior, 2021; Soares e Sérvio, 2022). As culturas levam em torno de 5 a 7 dias para serem visualizadas e a identificação microscópica dos agentes responsáveis pela infecção pode ser feita nesse momento, porém a observação é facilitada a partir de 3 semanas de incubação, devido a maior produção de estruturas reprodutivas (Macedo, Silva e Junior, 2021; Quinn, 2007). Para sua identificação em meio não específico são utilizados o tipo de macroconídio produzido e morfologia colonial (Quadro 2).

Quadro 2: Aparência colonial e características micromorfológicas dos principais dermatófitos em ágar dextrose Sabouraud

Dermatófitos	Aparência colonial em ágar dextrose Sabouraud	Micromorfologia
<i>M. canis</i>	<u>Anverso</u> : branco a amarelado, com periferia laranja-claro; <u>reverso</u> : laranja-amarelado ou marrom-alaranjado.	Macroconídios fusiformes, multisseptados de paredes rugosas e mais espessas que a dos septos, poucos microconídios
<i>M. gypseum</i>	<u>Anverso</u> : amarelo a castanho, com bordas brancas e friáveis; <u>reverso</u> : amarelado a marrom-avermelhado.	Numerosos macroconídios fusiformes, multisseptados, de paredes rugosas e finas, poucos microconídios
<i>T. mentagrophytes</i>	<u>Anverso</u> : castanho-claro a amarelo e pulverulento; <u>reverso</u> : castanho-claro a marrom-escuro.	Macroconídios do gênero, microconídios redondos numerosos

Fonte: adaptado de Molinaro, Caputo e Amendoeira, 2009; Quinn, 2007.

2.1.3 *Malassezia*

Malassezia é uma levedura pertencente ao filo Basidiomycota que possui como principal característica a produção de basídios contendo geralmente 4 basidósporos por reprodução sexuada. A diferenciação das espécies do gênero *Malassezia* se dá por critérios morfofisiológicos, sendo cultivadas em meio Dixon modificado a 32 °C durante 7 dias (Schlottfeldt *et al.*, 2002). Suas colônias em Ágar Sabouraud são foscas, com aspecto cremoso e textura macia ou friável, na microscopia apresenta-se na forma de células ovais pequenas e possui o maior broto dentre as espécies de *Malassezia*, geralmente apresentando um colarinho ou cicatriz devido a sucessivos brotamentos (Schlottfeldt *et al.*, 2002).

A malasseziose é uma micose superficial não zoonótica, comum em cães e gatos, causada por leveduras lipofílicas do gênero *Malassezia*. Essa infecção, em contraste com as dermatofitoses, é comumente secundária a uma condição preexistente (Wilkinson e Harvey, 1997). Dessa forma, para que haja dermatite por

Malassezia, é necessária uma reação de hipersensibilidade ao fungo ou crescimento excessivo sobre a superfície cutânea, em consequência de doenças primárias como dermatite alérgica atópica, hipersensibilidade alimentar, endocrinopatias e distúrbios da queratinização (Chaves, 2007).

Malassezia pachydermatis é a espécie mais frequentemente isolada em cães e gatos saudáveis ou com lesões dermatológicas, é considerado um microrganismo comensal da pele, das orelhas e áreas mucocutâneas do animal, além de patógeno oportunista do conduto auditivo externo, ao seu proliferar pode causar dermatite, queilite e otite externa (Rhodes e Werner, 2014). Um aumento de sua prevalência pode estar associado à antibioticoterapia prévia prolongada e terapia por glicocorticoide (Wilkinson e Harvey, 1997).

As principais regiões afetadas por esse fungo são as dobras faciais, pavilhões auriculares, região ventral do pescoço e extremidade dos membros. Os sinais clínicos causados por essa dermatite incluem áreas de eritema, alopecia e descamação gordurosa, associadas a prurido moderado ou intenso resistente a glicocorticoides, podendo em casos crônicos apresentar hiperqueratose, hiperpigmentação e liquenificação, com odor desagradável característico (Chaves, 2007).

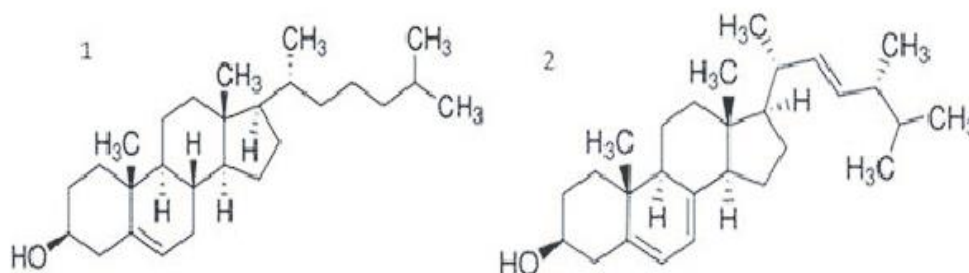
Para diagnóstico podem ser feitas a cultura fúngica, em ágar de Sabouraud incubada entre 32 e 37 °C por 3 a 7 dias, com as características das colônias sendo a coloração amarelo creme, passando a marrom alaranjada quando envelhecidas, opacas, aspecto seco, friável, granulosa e de superfície lisa; ou citologia cutânea, coradas com azul de metileno que evidenciam leveduras em forma de pegadas ou moringa, resultante de brotos em avançado desenvolvimento ainda ligados a célula mãe (Quinn, 2007; Rhodes e Werner, 2014).

2.1.4 Opções Terapêuticas

Um dos principais alvos dos antifúngicos é o ergosterol, um análogo do colesterol que está presente na membrana plasmática dos fungos (Figura 1). A maioria dos antifúngicos atuam diretamente na síntese ou na estrutura desse lipídeo fúngico, podendo ocorrer um efeito citotóxico às células animais como consequência

de sua similaridade molecular com o colesterol (Rossi, Peres e Rossi, 2008). Outros antifúngicos agem inibindo a síntese de glucanas na parede celular fúngica, inibindo a síntese de ácidos nucleicos ou a divisão celular. Ainda assim, devido à similaridade entre células fúngicas e animais, a possibilidade de toxicidade dessas drogas não deve ser descartada (Berto e Hermes, 2023).

Figura 1 - Estrutura molecular plana do Colesterol (1), presente na membrana plasmática de animais e Ergosterol (2), presente na membrana plasmática dos fungos



Fonte: Andrade e Coutinho, 2016.

O tratamento das dermatomicoses é relativamente difícil, devido aos fungos estarem protegidos pelas hastes e folículos pilosos, dessa forma, o ideal é associar a terapia tópica, para remover os esporos fúngicos da haste dos pelos, e terapia sistêmica, em casos graves e reincidentes, para agir no folículo piloso (Andrade e Rossi, 2019). Alguns medicamentos utilizados na terapia tópica incluem: terbinafina 1%, clorexidine, clotrimazol 1%, cetoconazol 2% ou miconazol 1 a 2%, a tosa também é indicada para reduzir a liberação de pelos infectados e de esporos no ambiente. No caso de otites o clotrimazol a 1% é o tratamento de escolha para *Malazessia* (Gomes *et al.*, 2012).

Já na terapia sistêmica o itraconazol na dose de 10 mg/kg/dia é o mais indicado por ter menos efeitos adversos e poder ser utilizado em gatos com imunodeficiência felina (FIV). Quando combinadas as terapias tópica e sistêmica deve-se prolongar o tratamento de 2 a 4 semanas após cura clínica e após confirmar duas ou mais culturas fúngicas negativas. A desinfecção do ambiente deve ser feita com desinfetantes à base de iodo, cloro ou fenóis (Macedo, Silva e Junior, 2021).

O uso irracional de antifúngicos propicia o aparecimento de dermatófitos resistentes a essas classes de medicamento, sendo um problema de Saúde Pública (Coelho *et al.*, 2020). Além disso, os antifúngicos utilizados na veterinária acabam por ficar restritos aos aprovados para uso humano pela falta de pesquisas voltadas exclusivamente para veterinária, sendo os mesmos utilizados ao longo das últimas décadas, dessa forma evidenciando a necessidade de pesquisas de novas substâncias com atividade antifúngica (Gomes *et al.*, 2012).

2.2 LECTINAS E SUAS PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS

Lectinas são todas as proteínas de plantas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se ligue de forma reversível a carboidratos específicos. Já foram encontradas em diferentes partes de plantas, como folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas, bulbos, cascas, caules, tendo sua predominância nas sementes. Elas fazem parte de compostos metabólicos secundários, sendo utilizadas pelas plantas como defesa contra ataques de bactérias, fungos e insetos, podendo ser encontradas principalmente em leguminosas, como soja, feijão e amendoim (Barbosa, 2014). Algumas vantagens que essas proteínas possuem são sua estabilidade em condições desfavoráveis como manter-se viável em amplas faixas de pH, elevadas temperaturas e sob proteases animais e de insetos (Siqueira, 2008).

As lectinas podem ser subdivididas em três classes levando em consideração sua estrutura e função biológica: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas possuem apenas um domínio ligante a carboidratos e são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, já as hololectinas também possuem domínios ligantes a açúcares contendo pelo menos um ou dois de tais domínios idênticos ou homólogos, além de possuírem múltiplos sítios de ligação, sendo, portanto, capazes de aglutinar células ou precipitar conjugados, a maioria das lectinas de plantas pertencem a essa classe; por fim, temos as quimerolectinas que além de possuírem o domínio ligante a carboidratos, possuem um segundo domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, não dependendo do domínio carboidrato ligante para exercer sua função (Povineli e Filho, 2002).

As lectinas são capazes de interagir com glicoconjugados na superfície de organismos invasores, dessa forma, interferindo em seu pleno funcionamento. Apesar dos efeitos antifúngicos das lectinas serem encontrados em menor número quando comparado aos efeitos antibacterianos, lectinas como Dviol, DRL, ConBr e CasuL se mostraram promissoras contra cepas de *Candida* (Oliveira, J. 2018).

A lectina de germe de trigo ligou-se a hifa de *Trichoderma viride* e inibiu o crescimento e germinação dos esporos do fungo, aparentemente pela interferência na síntese de quitina de sua parede celular (Povineli e Filho, 2002). Já a lectina de *Cladonia verticillaris* (ClaveLL) foi testada contra alguns dermatófitos e apenas inibiu o crescimento de *Tricophyton rubrum* em torno de 35% na concentração de 170 µg (Ramos *et al.*, 2014). Supõe-se que essa inibição ocorreu pela ligação da lectina à parede celular do fungo, resultando em sua ruptura, ou pela ligação da lectina as hifas resultando em uma má absorção de nutrientes e interferência no processo de germinação de esporos.

Dessa forma, ao testar as lectinas ligantes de quitina das sementes de *C. maritima*, *C. brasiliensis* e *D. virgata* espera-se que elas possam inibir o crescimento fúngico, interferir no processo de geração de esporos ou prejudicar a síntese e/ou deposição de quitina na parede celular fúngica, que possa vir a comprometer colônias futuras.

2.2.1 *Canavalia maritima*

Canavalia maritima (sinônima de *Canavalia rosea*) é popularmente conhecida como “feijão de praia” no Brasil, uma planta rasteira, perene de ampla distribuição nas linhas costeiras tropicais (Figura 2). Suas folhas são compostas, trifoliadas alternadas e de formas circulares e pecíolos curtos, com flores pequenas, róseas, zigomorfas e com uma pétala mais larga do que as outras dispostas em cachos. Seus frutos são vagens robustas contendo de 3 a 7 sementes de cor marrom marmorizado, e são resistentes a altas salinidades, temperatura, enterro na areia e podem sobreviver mesmo com poucos nutrientes (Araújo, 2015).

Figura 2 – *Canavalia maritima* em seu habitat natural: (a) esteiras densas crescendo na praia, (b) inflorescência, (c) vagem verde e (d) sementes ejetadas das vagens



Fonte: Sousa, 2022.

Suas folhas, caules e sementes possuem um alto teor proteico e outros ingredientes bioativos, sendo utilizada na medicina popular (Mendoza-González, Martínez e Lightgow, 2014). As lectinas da *C. maritima* são isoladas a partir de sua semente e são denominadas Concanavalia M ou apenas ConM, possuindo afinidade por glicose e manose (Delatorre *et al.*, 2013).

A lectina de sementes de *C. maritima* inibiu o crescimento de leveduras encapsuladas de *Candida neoformans* na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, como também ao ser associada com fluconazol reduziu a dosagem necessária do fármaco pela metade para inibir o crescimento de *C. albicans* (Farias, 2013; Fonseca *et al.*, 2022). Dessa forma, demonstrando seu potencial em ser utilizado associado a outros antifúngicos potencializando seus efeitos e consequentemente necessitando de menores doses do antifúngico.

2.2.2 *Canavalia brasiliensis*

Canavalia brasiliensis é popularmente conhecida como “feijão bravo do Ceará”, é uma planta trepadeira, caracterizada por ser uma leguminosa herbácea frágil, perene e prostrada com folhas trifolioladas, folíolos ovados com ápice agudo, além de possuir flores roxas e sementes castanho claro a castanho (Figura 3) (Santos, 2018).

Figura 3 – Vagens, sementes e flor de *Canavalia brasiliensis*



Fonte: Tropical Forages.

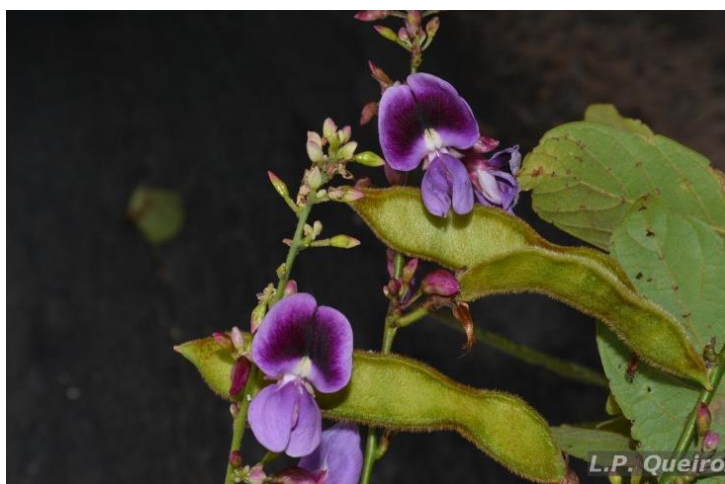
A lectina isolada da *C. brasiliensis* denomina-se ConBr e possui afinidade para manose/glicose. Alguns efeitos biológicos relatados sobre a lectina ConBr são: estimula a liberação de histamina pelos mastócitos, estimula a produção de óxido nítrico em macrófagos, ativa apoptose em linfócitos, efeito anti-tumoral, efeito neuroprotetor contra excitotoxicidade do glutamato, efeito antidepressivo, atividade antifúngica, dentre outros (Pereira e Silva, 2019).

Lectinas de *C. brasiliensis* apresentaram um efeito fungicida promissor contra *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Trichosporon cutaneum*, dentre outros fungos do gênero *Candida*, necessitando de baixas concentrações para ter seu efeito (Gomes, 2009; Klafke, 2013).

2.2.3 *Dioclea virgata*

Dioclea virgata é uma trepadeira baixa conhecida popularmente como “cipópixuma”, encontrada na região Nordeste, possui sementes oblongas, fortemente compressas, lisas e de cor marrom escura de onde é extraída sua lectina, denominada Dvir (Figura 4) (Nóbrega *et al.*, 2012).

Figura 4 – Flores de *Dioclea virgata*



Fonte: Queiroz, 2020.

Sua lectina é dependente de Ca^{+2} e Mn^{+2} para exercer sua atividade, além de possuir especificidade pela glicose, atividades imunológicas, inseticida e mostra ser eficiente na produção de óxido nítrico, molécula esta que pode modular o relaxamento vascular dependente do endotélio, induzir a citotoxicidade mediada por macrófagos, inibir a ativação, adesão e agregação plaquetária, bem como regular a pressão sanguínea basal (Cavada *et al.*, 1996; Nóbrega *et al.*, 2012; Nóbrega, 2011).

3 METODOLOGIA

A obtenção das lectinas e de seus hidrolisados foi realizada no Laboratório de Proteômica (LAPROTE) e no Laboratório de Química de Proteínas e Peptídeos (LQPP), a produção dos discos de papel filtro contendo as proteínas teste foi realizada no Laboratório de Microbiologia (LGM), todos situados no Departamento de Biologia Molecular (DBM)/CCEN da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus I – João Pessoa.

A cultura dos fungos dermatófitos e *Malassezia* foi previamente isolada e cedida pelo orientador desse projeto e professores da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), sendo repicados em meio específico DTM e Ágar Sabouraud, respectivamente. Em caso de resultado positivo, eram reavaliados microscopicamente em objetiva de 4, 10 e 40, a fim de avaliar se estavam condizentes com as características do gênero e espécie necessárias. Os testes confirmatórios e de propriedade antifúngica contra os fungos citados foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biociências da UFPB, campus II - Areia.

3.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

No presente estudo foram utilizadas sementes das leguminosas *C. brasiliensis*, *C. maritima* e *D. virgata*, que foram trituradas em moinho elétrico do tipo Willey, obtendo-se uma farinha fina que foi estocada em recipientes hermeticamente vedados. As farinhas foram cedidas pelo LQPP e processadas posteriormente.

3.2 OBTENÇÃO DAS LECTINAS

A coleta e processamento do material vegetal até o pico não retido da Sephadex-G50 foi realizado e cedido pelo LQPP através de outros projetos em andamento.

3.2.1 Cromatografia da Lectina em Quitina

Cada pico não retido na matriz Sephadex G-50 de cada planta do trabalho, em torno de 150 a 200 mL, foi recromatografado em coluna de afinidade em matriz de quitina - polímero natural de N-acetilglicosamina-GlcNAc (23 cm x 3,6 cm), equilibrada com NaCl 0,15 M. A amostra foi colocada em refluxo por 3h. O pico não retido foi eluído com a mesma solução de equilíbrio da coluna e o pico retido, com glicina 0,1 M com NaCl 0,15 M - pH 2,6 (Farias, 2013).

O pico retido eluído de cada extrato foi coletado em pelo menos 40 tubos com 3 mL cada e analisados quanto a absorbância medida a 280 nm. Os tubos que

possuísssem absorvência maior que 0.250 foram dialisados contra água destilada e liofilizada para conservação até seu posterior uso.

3.2.2 Teor de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis presentes nos extratos da farinha de sementes de *C. brasiliensis*, *C. maritima* e *D. virgata* foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), 100 µL de amostra diluída em diferentes concentrações de NaCl 0,15 M, foi adicionado 2,5 mL de reagente de BRADFORD. Após a homogeneização e repouso por 10 minutos, a leitura foi feita a 595 nm em espectrofotômetro. Como padrão, utilizou-se Albumina Sérica Bovina (BSA).

3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para verificar o grau de pureza e estimar o peso molecular das lectinas realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970). O gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação à 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras oriundas dos extratos proteicos e dos picos cromatográficos foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e b-mercaptoetanol 5% e aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 min., centrifugadas por 5 min, e em seguida adicionado 10 mL de azul de bromofenol 0,02%. A corrida foi sob amperagem constante (25 mA) e ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado em TCA 12,5% por 1h, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v).

3.3 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM FUNGOS DERMATÓFITOS E *Malassezia*

3.3.1 Preparo das soluções de lectina

As lectinas quitina específicas semi purificadas das sementes de *C. maritima*, *D. virgata* e *C. brasiliensis* foram pesadas em balança analógica e diluídas em água destilada estéril para a obtenção de uma solução contendo 1000 µg/mL de cada uma das proteínas. Posteriormente, as soluções contendo as lectinas foram filtradas em filtros bacteriológicos de 0,22 µm e submetidas a uma diluição seriada em água destilada estéril originando quatro concentrações de soluções, sendo elas 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. As soluções foram mantidas congeladas até o momento do uso.

3.3.2 Preparo dos discos

Foram cortados discos de papel de filtro de aproximadamente 5 mm, os quais foram esterilizados a 121 °C por 15 min. Posteriormente os discos foram embebidos com 40 µL de cada uma das soluções de lectina produzidas anteriormente. Os discos foram alocados em placas de Petri estéreis e mantidos em estufa a 37 °C até a completa absorção do volume, resultando em discos contendo 5, 10, 20 e 40 µg de proteínas. Posteriormente os discos foram refrigerados até o momento do uso. Para o controle, discos de 5 mm foram embebidos com 5 ou 10 µL de uma solução de Clotrimazol a 1000 µg/mL, gerando discos com 5 e 10 µg de antifúngico.

3.3.3 Preparo dos inóculos

Os fungos foram plaqueados em ágar Sabouraud e deixados a 37 °C por 7 a 14 dias. Posteriormente, foi realizada a observação microscópica das colônias nas objetivas de 10 e 40 vezes para avaliar a presença de esporos. As colônias foram coletadas através de um swab umedecido e diluídas em 3 mL de solução salina estéril. As soluções remanescentes foram submetidas a contagem de esporos através da câmara de Neubauer e, posteriormente, as concentrações finais foram ajustadas entre 1 e 5 x 10⁶ esporos/mL (Nweze, Mukherjee e Ghannoum, 2010). As soluções foram mantidas refrigeradas até o momento do uso.

3.3.4 Ensaio da Atividade Antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado conforme o preconizado por Nweze, Mukherjee e Ghannoum (2010) com algumas adaptações. Para o teste, foram utilizados meios de cultura Sabouraud, os quais receberam 100 µL do inóculo das soluções fúngicas, que foi espalhado na placa com o auxílio de swabs estéreis. Posteriormente, cada placa recebeu quatro discos de papel de filtro distribuídos de maneira equidistante com diferentes quantidades de cada uma das proteínas a serem testadas. Como controle, foram utilizadas placas contendo dois discos de diferentes concentrações de Clotrimazol. As placas ficaram incubadas durante 120 horas a 35 °C em BOD. A cada intervalo de 24h, foi avaliado o crescimento fúngico e se houve formação de halo de inibição do crescimento fúngico. Os halos obtidos pelos extratos foram comparados com o halo obtido pela substância controle.

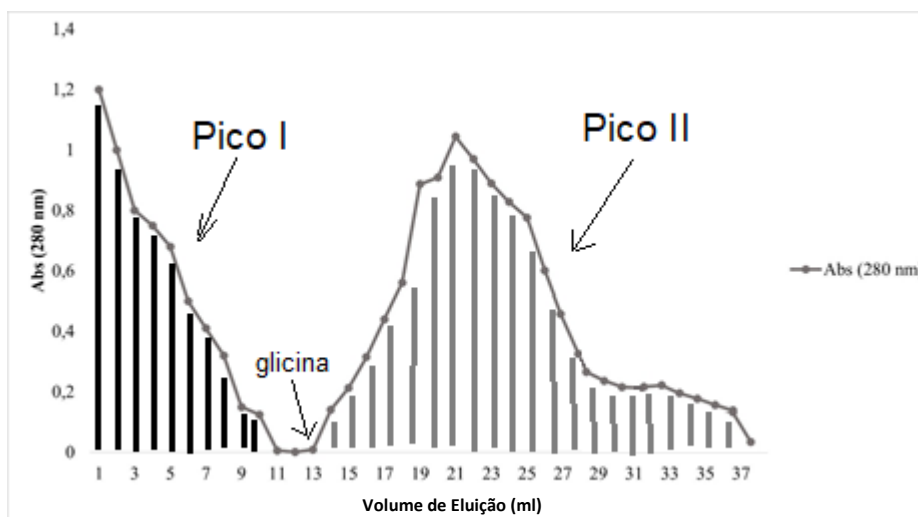
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LECTINAS *C. brasiliensis*, *C. maritima* E *D. virgata*

4.1.1 Cromatografia de afinidade

A fim de averiguar se as lectinas utilizadas nos testes diferiam das comumente encontradas na literatura em coluna de Sephadex, foi realizado o gráfico cromatográfico das colunas de quitina. Sendo assim, confirmou a existência de uma segunda lectina com afinidade por N-acetil-D-glicosamina, nos extratos de proteínas de sementes de *C. brasiliensis* e *C. maritima*, conforme descritas previamente por Barbosa (2013) e Farias (2013) respectivamente; bem como, de uma segunda nova lectina com afinidade a quitina de *D. virgata* (Figura 5) que não havia sido reportada na literatura científica. Dessa forma, com a análise do gráfico cromatográfico da coluna de quitina (Figura 5) evidencia-se um padrão típico de cromatografia de afinidade, uma vez que possui pico não retido (PI) e pico retido (PII), sendo este último eluído com solução Glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. Esses resultados diferem daqueles descritos anteriormente em coluna de Sephadex G-50 por Moreira *et al.* (1993), Cavada *et al.* (1990) e Cavada *et al.* (1996).

Figura 5 - Representação dos Picos I e II da cromatografia de Dvir em coluna de Quitina



Fonte: autoral.

As lectinas de ConBr, ConM e Dvir são lectinas isoladas de sementes de *C. brasiliensis*, *C. maritima* e *D. virgata*, respectivamente, essas que compartilham entre si e com outras lectinas de plantas leguminosas do gênero *Canavalia* e *Dioclea*, muitas características, dentre elas a especificidade pelos açúcares D-Glicose e D-Manose, característica marcante das lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae (Gondim, 2014).

4.1.2 Dosagem de proteínas solúveis das lectinas obtidas do pico II da coluna de Quitina

Foi verificada em qual solução as lectinas apresentavam melhor solubilidade, e consequentemente, maior teor de proteínas ativas, em NaCl 0,15 M ou água destilada, com o intuito de determinar a solução de diluição para o teste de atividade antifúngica.

De acordo com as Tabelas 1 e 2, nota-se teor de proteínas e a solubilidade da ConM II e Dvir II foram maiores em água destilada, podendo observar que isso também ocorreu com a lectina ConBr II. Com intuito de manter um padrão e como as diluições em água da ConBr II e ConM II estavam parecidas, não foi realizada a estimativa de solubilidade em NaCl 0,15 M da ConBr II. Podemos observar que a

ConM II apresenta 60,1% de solubilidade em água destilada, enquanto que a Dvir II somente 24,1% sendo, portanto, aproximadamente 1/3 da solubilidade da ConM II. A solubilidade das proteínas depende de seu método de extração, purificação e meio de diluição.

Tabela 1 – Teor de Proteína Solúvel das lectinas ConBr II, ConM II e Dvir II

Lectina / Quitina	Solução NaCl 0,15 M	Água destilada
ConBr II	Não realizado	0,572 mgP/mL
ConM II	0,225 mgP/mL	0,601 mgP/mL
Dvir II	0,107 mgP/mL	0,241 mgP/mL

Fonte: autoral.

Tabela 2 – Percentual de Solubilidade das Lectinas

Lectina / Quitina	Solução NaCl 0,15M	Água destilada
ConBr II	Não realizado	57,2%
ConM II	22,5%	60,1%
Dvir II	10,7%	24,1%

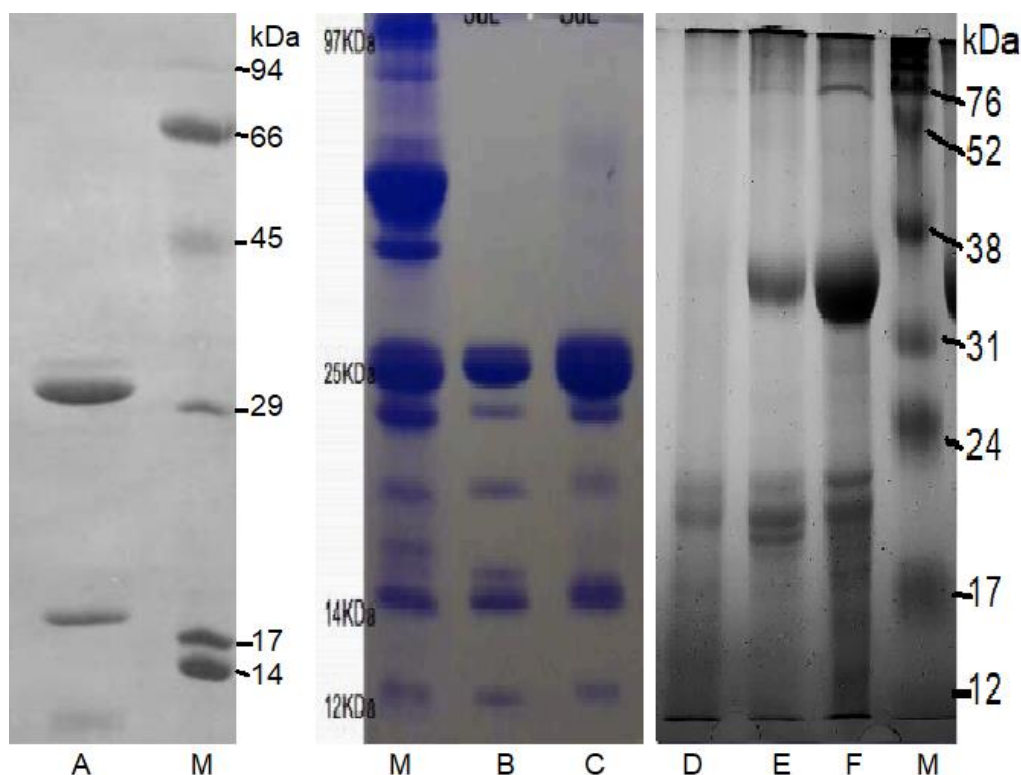
Fonte: autoral.

4.1.3 Eletroforese PAGE-SDS

Outro método utilizado para constatar a diferença entre as lectinas presentes na coluna de quitina entre si e as de coluna de Sephadex, foi a eletroforese PAGE-SDS, que busca estimar a massa molecular das moléculas testadas.

De acordo com a Figura 6, nota-se que a Dvir II (Fig. 6 D) possui uma massa molecular em torno de 20 kDa em sua banda maior, não evidenciando outras subunidades. Já a ConBr II (Fig. 6 E) mostrou um padrão de banda maior em torno de 35 kDa e subunidades entre 20 e 24 kDa, e a ConM II (Fig. 6 F) possuía entre 32 a 36 kDa em sua banda maior e em torno de 20 kDa suas subunidades menores.

Figura 6 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas obtidas de colunas de Sephadex e Quitina respectivamente. A: DVir, B: ConM, C: ConBr , D: DVir II, E: ConBr II, F: ConM II e M: Marcador de Peso Molecular.



Fonte: A – Cavada *et al.*, 1996; B e C – Gondim, 2014; D, E, F – autoral.

Conforme a literatura, a lectina Dvir (Fig. 6 A) apresenta três subunidades com 30, 16 e 1 kDa (Cavada *et al.* 1996), já a ConBr (Fig. 6 C) apresenta três subunidades com 30, 16 e 12 kDa (Grangeiro *et al.*, 1997), e a ConM (Fig. 6 B) possui em torno de 25, 14 e 12 kDa (Gondim, 2014).

Dessa forma, ao serem comparadas as massas moleculares das lectinas encontradas em coluna de Sephadex com as de quitina, confirmam que as frações proteicas trabalhadas no presente estudo são diferentes daquelas estudadas em estudos prévios por Cavada *et al.* (1996), Farias (2013) e Grangeiro *et al.* (1997) com essas plantas.

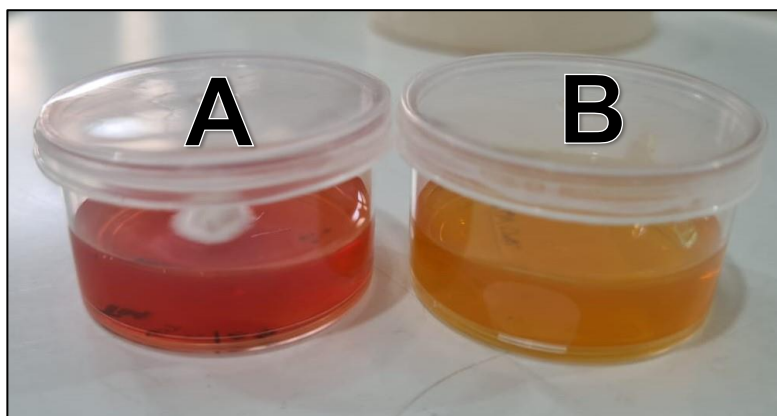
4.2 TESTE DE VIABILIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS RECEBIDOS

4.2.1 Teste fungos dermatófitos em meio DTM

Os fungos enviados pela UFPB foram recebidos identificados como *T. mentagrophytes* e *M. canis*, e os da UFPel recebidos e identificados como *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum*. Cada amostra foi repicada e submetida ao meio DTM, mantidos a 28 °C por no mínimo 5 dias como instruído pelo fabricante.

Os resultados das amostras advindas da UFPB testaram como positivo para *T. mentagrophytes*, evidenciada pela mudança na coloração para avermelhada do meio e colônia branca (Fig. 7 A), e negativa para *M. canis* uma vez que a colônia não cresceu e o meio não mudou de cor permanecendo amarelado (Fig. 7 B).

Figura 7 – Teste em meio DTM fungos UFPB



Fonte: autoral.

Já as amostras advindas da UFPel tiveram como resultado, positivo para *M. canis* e *M. gypseum*, pela presença de colônias esbranquiçadas e mudança da cor do meio para avermelhada, e negativo para *T. mentagrophytes* que apesar do crescimento colonial ter sido esbranquiçado, também possuía pontos esverdeados na colônia e não houve mudança de cor do meio (Figura 8).

Figura 8 – Teste em meio DTM fungos UFPEL



Fonte: autoral.

Dessa forma, foram utilizadas as colônias de *T. mentagrophytes* da UFPB e *M. canis* e *M. gypseum* da UFPEL.

4.2.1.1 Observação de fungos dermatófitos pós positivamente em meio DTM

Após os repiques e crescimento das colônias dos fungos positivados em meio Ágar Sabouraud, *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, foram feitas lâminas pelo método de fita adesiva para observação em microscópio.

Ao serem observados sob a óptica de 4, 10 e 40, os achados microscópicos corroboravam com as características microscópicas descritas por Quinn (2007), como macroconídeos fusiformes presentes nas lâminas de *M. canis* (Figura 9), macroconídeos em forma de canoa presentes nas lâminas de *M. gypseum* e macroconídeos em forma de charuto presentes nas lâminas de *T. mentagrophytes*.

Figura 9 – Macroconídio de *M. canis* retirado de placa de DTM

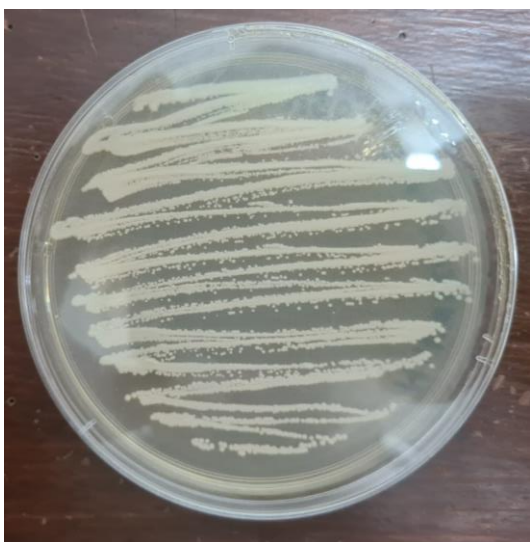


Fonte: autoral.

4.2.2 Viabilidade e Identificação *Malassezia*

Malassezia foi previamente identificada por MALDI-TOF estava preservada e, após repique, apresentou bom desenvolvimento em Ágar Sabouraud, comprovando sua viabilidade para utilização nos testes. Com características macro e microscópicas que corroboravam com as descrições de Quinn (2007) e Rhodes e Werner (2014) do gênero. Possuindo colônias de coloração amarelo creme (Figura 10) e microscopia contendo leveduras em formato de “pegada” ou moringa.

Figura 10 – Cultura de *Malassezia*



Fonte: autoral.

4.3 TESTE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS LECTINAS EM DERMATÓFITOS E *Malassezia*

Apesar dos testes realizados contra os fungos dermatófitos, *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, e *Malassezia*, utilizando as lectinas ConBr II, ConM II e DvirI II não resultarem em halo de inibição em nenhuma das concentrações mesmo após 5 dias de observação (Fig. 11), não se pode confirmar sua falta de atividade antifúngica.

Figura 11 – Teste da lectina Dvir II em suas diferentes concentrações contra *T. mentagrophytes*



Fonte: autoral.

Algumas hipóteses foram levantadas, como pela lectina testada ser uma hololectina, pode ter se ligado a algum carboidrato análogo a quitina e não desempenhado a função esperada, devendo ser feito um teste de afinidade à quitina com fluoresceína para verificar se a ligação foi mesmo a quitina. Sua concentração foi insuficiente para desencadear o efeito antifúngico necessitando ser testada em maiores concentrações até definir a concentração inibitória mínima. Além disso, não foram feitas lâminas e nem repiques para constatar se houve dano significativo às hifas, ou interferência na produção de esporos e/ou síntese de quitina na parede celular que pudesse vir a comprometer colônias futuras e reduzir sua contaminação.

Sendo assim, mesmo sem a formação dos halos de inibição nos testes, não se pode concluir com certeza de que não causaram alguma alteração nas estruturas fúngicas que podem vir a comprometer colônias futuras. Segundo Cardoso *et al.* (2013), a depender da fase de crescimento do fungo não há hidratos de carbono, a nível micelar, que a lectina possa reconhecer. Mas que lectinas ligantes de quitina possuem o potencial de afetar o desenvolvimento e crescimento fúngico uma vez que podem interferir na síntese e deposição de quitina na parede celular do fungo, interagir com as hifas dos fungos causando uma má absorção de nutrientes, bem como causar alterações morfológicas que tornam o fungo susceptível a condições de estresse, como aumento da sensibilidade ao choque térmico (Cruz, 2023).

O Clotrimazol, antifúngico de controle para os testes, nas concentrações de 5 µg e 10 µg apresentou formação de halos após 48h, que também foi o tempo mínimo para o crescimento das primeiras colônias de todos os fungos testados. Após os 5 dias de teste (Fig. 12), o diâmetro dos halos de inibição referente ao antifúngico de controle e os fungos teste foram os constatados no Quadro 3, com o halo do *M. canis* na concentração de 10 µg sendo o maior possuindo 75 mm de diâmetro e *Malassezia* na concentração de 5 µg o menor, possuindo 42 mm de diâmetro.

Figura 12 – Teste do Clotrimazol em suas diferentes concentrações contra *T. mentagrophytes*



Fonte: autoral.

Quadro 3 – Diâmetro dos halos de inibição em milímetros do Clotrimazol e suas diferentes concentrações em seus respectivos fungos teste após 5 dias

Fungos Teste	10 µg	5 µg
<i>M. canis</i>	75 mm	65 mm
<i>M. gypseum</i>	52 mm	45 mm
<i>T. mentagrophytes</i>	60 mm	52 mm
<i>Malassezia</i>	50 mm	42 mm

Fonte: autoral.

No trabalho de Nweze, Mukherjee e Ghannoum (2010) os halos de inibição de antifúngicos da classe dos azóis contra *M. canis* e *T. mentagrophytes* variou entre 0 e 68 mm, compatível com os resultados encontrados no presente estudo contra Clotrimazol. Há de se ressaltar, que não há um ponto de corte definido para determinar a sensibilidade ao antifúngico nesse teste, não sendo o método adequado para definir a sensibilidade antifúngica pelos institutos internacionais de testagem antimicrobiana, como CLSI e EUCAST (Dogra *et al.*, 2019). Entretanto, é um ótimo teste para a triagem de substâncias com potencial antifúngico, por ser simples, barato e possuir alguma correlação com os testes oficiais (Dogra *et al.*, 2019; Nweze, Mukherjee e Ghannoum 2010). O presente estudo demonstra que, nas concentrações testadas, as lectinas não possuem efeito inibitório no crescimento dos dermatófitos testados e de *Malassezia*.

5 CONCLUSÃO

Sugere-se que as lectinas ConBr II, ConM II e Dvir II obtidas por cromatografia de Quitina, diferem das lectinas obtidas por coluna de Sephadex-G50. Dentre as lectinas estudadas, ConM II foi a que apresentou o maior teor de proteínas solúveis com 60,1% de solubilidade em água. As lectinas testadas não apresentaram atividade contra as linhagens de fungos nas concentrações testadas. Novos testes devem ser realizados para verificar se em concentrações maiores podem vir a apresentar atividade. Além disso, o crescimento do fungo pode ter ocorrido, porém as lectinas podem tê-los danificado ao ponto de prejudicar a formação de novas colônias após os repiques.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology Reading*, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação *In Vitro* do Potencial Modulador das Vitaminas Lipossolúveis: Atividade Antimicrobiana e Resistência Microbiana. Novas Edições Acadêmicas, 7 de janeiro de 2016.

ANDRADE, V.; ROSSI, A. G. M. Dermatofitose em animais de companhia e sua importância para a Saúde Pública – Revisão de Literatura, *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.13, n.1, p. 142– 155, mar. 2019.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em: [modulo-8---deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica.pdf \(saude.go.gov.br\)](https://www.saude.gov.br/images/stories/pdf/20130618/Modulo-8---deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica.pdf) Acessado em: 8 mar.2023.

ARAÚJO, J. N. Atividade citotóxica, bacteriostática e aglutinante para leishmania de ConM: uma lectina isolada das sementes do feijão de praia – *Canavalia maritima* (Aubl.) Thou. (1813). 2015. 86f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

BARBOSA, N. C. UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS FATORES ANTINUTRICIONAIS: TANINOS, INIBIDORES DE PROTEASES E LECTINAS. TCC (Licenciatura em Química), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Anápolis, 86 p., novembro de 2014.

BARBOSA, P. P. de S. Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 74p., maio de 2013.

BERTO, C.; HERMES, D. M. BASES DA RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA: UMA REVISÃO COMENTADA. Ciências Biológicas e da Saúde: integrando saberes em diferentes contextos, Editora Científica Digital, vol. 3, p. 52-72, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

CARDOSO, G. *et al.* AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE *Bauhinia variegata* SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Bipolaris oryzae*. In: Encontro de Pós-Graduação UFPEL, XV, 2013, Pelotas.

CARDOSO, N. T.; FRIAS, D. F. R.; ANDREANI, D. I. K., Isolamento e Identificação de Fungos Presentes em Pelos de Cães Hígidos e com Sintomas de Dermatofitose, do Município de Araçatuba, São Paulo, Archives of Veterinary Science, v.18, n.3, p.46-51, jul. 2013.

CAVADA, B. S. *et al.*, Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. Braz. J. Veg. Fis., vol. 8, p. 37–42, 1996.

CAVADA, B. S. *et al.* Comportamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* mart. Durante a germinação em presença de luz. **Acta bot. bras**, v. 4, n. 2, p. 13, 1990.

COELHO, J. L. G. *et al.*, Dermatofito: resistência a antifúngicos, Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.6, n.10, p. 74675-74686, out. 2020.

CHAVES, L. J. Q., Dermatomicoses Em Cães E Gatos: Avaliação Do Diagnóstico Clínico-Laboratorial E Dos Aspectos Epidemiológicos Em Uma População De Portadores De Lesões Alopecicas Circulares, Dissertação (título de Mestre em Ciências Veterinárias), Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, p. 88, 2007.

CRUZ, F. V. R. da. Bioprospecção de lectinas em sementes de *Vataireopsis araroba* (Aguiar) Ducke. 2023. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

DELATORRE, P. *et al.*, Interactions between índole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new fuction for lectins in plant physiology. *Biochimie*, v.95, n.9, p.1697-703, set. 2013.

DOGRA, S. *et al.* Antifungal Drug Susceptibility Testing of Dermatophytes: Laboratory Findings to Clinical Implications. *Indian Dermatology Online Journal*, v. 10, n. 3, p. 225-233, jun. de 2019. Disponível em: [IDOJ-10-225.pdf \(nih.gov\)](https://doi.org/10.2225/idoj.2019.10.3.225) Acesso em: 01/11/23

FARIAS, D. L., Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia maritima*). 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

FONSECA, V. J. A. *et al.*, Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, *Archives of Microbiology*, n. 204, v. 6, pg. 346, maio 2022.

FUKUDA, E. K. *et al.*, Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização Semina: Ciências Agrárias, vol. 30, núm. 1, pp. 117-133, 2009.

GONDIM, A. C. S. Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DScLrL. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

GOMES, A. R. *et al.* Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.4, p.272-284, 2012.

GOMES, B. S., Morfotipagem, caracterização fisiológica de leveduras isoladas de secreção vaginal e sensibilidade a própolis e lectinas. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur J. Biochem.* 248. p. 43-48. 1997. Disponível em: [Molecular Cloning and Characterization of ConBr, the Lectin of Canavalia Brasiliensis Seeds \(wiley.com\)](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.18110043.x) Acesso em: 23 de outubro de 2023.

KLAFKE, G. B., Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology. *Mycopathologia*, v.173, p.147-151, 2013.

QUEIROZ, L.P. *Dioclea* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22948>. Acesso em: 18 out. 2020.

QUINN, P. J. *et al.*, Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas, 1 edi., Porto Alegre: Artmed, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MACEDO, C. M.; SILVA, W. C.; JUNIOR, R. N. C. C., Dermatofitose em cães e gatos: Aspectos clínicos, Diagnóstico e tratamento, *Veterinária e Zootecnia*, v. 28, nov. 2021.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.M. Microbiologia Veterinária, 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MEDEIROS, F. *et al.*, DERMATÓFITOS - REVISÃO DE LITERATURA, *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Ano VII, n. 12, jan. 2009.

MENDOZA-GONZÁLEZ, G.; MARTÍNEZ, M. L.; LIGHTGOW, D., Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. *Journal of Coastal Research*, v.30, p. 697-713, 2014.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org). Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.

MOREIRA, R. de A. *et al.* PLANT SEED LECTINS. A POSSIBLE MARKER FOR CHEMOTAXONOMY OF THE GENUS *Canavalia*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, Fortaleza – Ceará. p. 127-132, abril de 1993. Disponível em: [PLANT-SEED-LECTINS-A-POSSIBLE-MARKER-FOR-CHEMOTAXONOMY-OF-THE-GENUS-Canavalia.pdf \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/325444444-PLANT-SEED-LECTINS-A-POSSIBLE-MARKER-FOR-CHEMOTAXONOMY-OF-THE-GENUS-Canavalia) Acesso em: 22 de outubro de 2023.

NÓBREGA, R. B., Análise estrutural do domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina Dvirl de *Dioclea virgata* e sua correlação na indução da produção de óxido

nítrico, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 64, 2011.

NÓBREGA, R. B. *et al.*, Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production, *Biochimie*, vol. 94, n. 3, p. 900-906, 2012.

NOGUEIRA, M. A. A. *et al.* Diagnóstico das Dermatites Fúngicas em Cães e Gatos, *In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO –JEPEX*, Recife, UFRPE, 2013.

NWEZE, E. I., MUKHERJEE, P. K., GHANNOUM, M. A. Agar-Based Disk Diffusion Assay for Susceptibility Testing of Dermatophytes. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, v. 48, n. 10, p. 3750-3752, out. de 2010.

OLIVEIRA, J. F. C. de. Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

OLIVEIRA, T. F. de. ABORDAGEM POLIFÁSICA NA ATUALIZAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DE *Trichophyton* MANTIDAS NA MICOTECA URM. 2018. 57 f. Dissertação (Mestre em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

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

PEREIRA, R.; SILVA, A. L. C. da. UMA REVISÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LECTINAS DO GÊNERO *Canavalia* e *Dioclea*. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 15, n. 3, jul/set 2019. Disponível em: [Vista do UMA REVISÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LECTINAS DO GÊNERO Canavalia e Dioclea \(uepb.edu.br\)](https://uepb.edu.br) Acesso em: 01/11/23.

POVINELI, K. L., FILHO, F. F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. *Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. , v.24, p.135-156, dez. de 2002.

RAMOS, D. de B. M. *et al.* Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. Chinese Journal of Biology, v. 2014, 7 páginas. 2014. Disponível em: [219392.pdf \(hindawi.com\)](#) Acesso em: 01/11/23.

RIBEIRO, S. M. M. *et al.* Estudo retrospectivo da casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia, Research, Society and Development, v. 10, n. 5, maio 2021.

ROCHETTI, V. P. Caracterização química e papel biológico de glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*. Monografia (Título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia), Ciências Biológicas, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 72, 2019.

ROSSI, N. M. M; PERES, N. T. A.; ROSSI, A., Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes, Springer Science+Business Media B.V., maio 2008.

RHODES, K. H.; WERNER, A. H., Dermatologia em pequenos animais, 2ª ed., São Paulo:Rosca, 2014.

SANTOS, A. S., Avaliação das atividades antibacterianas e antifúngicas e triagem fitoquímica de extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais coletadas no bioma caatinga, Dissertação de Pós-graduação (Título de Mestre em Tecnologias em Saúde), Tecnologias em Saúde, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, p.77, 2018.

SANTOS, E. R. D. dos. Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos. Florianópolis, p. 44, 2015.

SCHLOTTFELDT, F. dos S. *et al.*. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 199–204, jul. 2002.

SOARES, N. P. *et al.* TÉCNICAS DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E SUA IMPORTÂNCIA PARA O ESTUDO DE BIOMOLÉCULAS DERIVADAS DE PLANTAS. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 13, n. 24, p. 991-1010, dez de 2016.

SOARES, S. O. C.; SÉRVIO, C. M. S. DERMATOFITOSE EM CÃES E GATOS E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação-REASE, São Paulo, v. 8, n.10, p. 4431-4451, outubro de 2022.

SOUSA, J. P. de. Análises estruturais da lectina de *Canavalia maritima* complexada com auxinas naturais e sintéticas, Tese de Doutorado (Grau de Doutora em Bioquímica, na área de Bioquímica Vegetal), Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

SIQUEIRA, A. B. S., Perfil Enzimático de Dermatófitos e Avaliação da Atividade Antifúngica de Própolis e Lectinas, Tese de Doutorado (Grau de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Microbiologia), Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p.179, 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia, 12^a ed., Porto Alegre, 2017.

TROPICAL FORAGES. *Canavalia brasiliensis*. Disponível em: [Canavalia brasiliensis - Tropical Forages](#) Acesso em 18 out 2023.

WANG, F. *et al.* Fungal names: a comprehensive nomenclatural repository and knowledge base for fungal taxonomy. Nucleic Acids Research, v. 51, p. 708-716, out. 2022.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R. G., Atlas Colorido de Dermatologia dos Pequenos Animais – Guia para o Diagnóstico, 2^a ed., São Paulo:Manole, 1997.

XAVIER, G. A. A. *et al.*. Dermatophytosis caused by *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* in free-living *Bradypus variegatus* (Schiz, 1825) in the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, Braz. J. Microbiol., p. 508–510, jul. 2008.