

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

CAIO CÉSAR DA SILVA GUEDES

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO FIXO E FRAÇÃO PROTEICA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera*

RECIFE

2018

CAIO CÉSAR DA SILVA GUEDES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO FIXO E FRAÇÃO PROTEICA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera***

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

**RECIFE
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Guedes, Caio Cesar da Silva

Atividades biológicas do óleo fixo e fração protéica de sementes de
Moringa oleifera / Caio Cesar da Silva Guedes- 2018.

71 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Bioinseticida 2. *Aedes aegypti* 3. Antifúngico I. Paiva, Patrícia
Maria Guedes (orient.) II. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz
(coorient.) III. Título

363.78

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-377

CAIO CÉSAR DA SILVA GUEDES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO FIXO E FRAÇÃO PROTEICA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera***

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 27/07/2018

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof^ª. Dra. Luana Cassandra Breintenbach Barroso Coelho (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, por todo zelo, carinho e cuidado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pelo dom da sabedoria, por mostrar a luz quando a escuridão bate à porta e principalmente por ter colocado lindas pessoas no meu caminho. Agradeço a meus pais, pela educação, carinho, por sempre estarem de braços abertos, por me apoiarem, acreditarem em mim e principalmente por não medirem esforços quando o assunto é a felicidade dos seus três filhos. Amo vocês, sou sortudo em tê-los comigo.

Agradeço à minha orientadora, Patrícia Paiva por ser essa grande mulher que sempre nos ensina sobre compromisso, ética e como a educação é importante para mudar a vida das pessoas. Professora, muito obrigado por todo o apoio nesses 5 anos de orientação, admiro muito sua pessoa e sua inteligência. Outra pessoa que merece ser lembrada nesse texto é o Professor Thiago Napoleão que está sempre pronto pra ajudar, e tem uma paciência que nunca vi, você é uma referência para muitos. À professora Daniela Navarro por sempre ser solícita, por abrir as portas do seu laboratório para que eu realizasse meus ensaios. A Jéssica, Suyanna, Júlio, Dani e a Professora Rejane por terem ajudado nos meus ensaios, devo muito a todos vocês.

A meus amigos das antigas, Joana, Caio, Camila, Michelle, Maria Lays, Sheyla e Kaique por compartilharem comigo momentos que fizeram nossa história, por me apoiarem, por sempre torcerem pelas minhas conquistas, pelas palavras de conforto e também pelas broncas quando necessárias. Aos companheiros de graduação que certamente estou levando pra vida, os que vejo pouco (Raquel, Victor e Gustavo) e os que vejo sempre (Leandro, Fátima e Mário), vocês se tornaram minha família aqui em Recife, obrigado pelo apoio incondicional e por sempre termos esse sofrimento compartilhado.

Agradeço a todos que fazem o BIOPROT, só quem fez/faz parte sabe como é um lugar agradável e que dá vontade de trabalhar todo dia! Obrigado principalmente aos mais próximos Suéllen, Jainaldo, Robson, Polly, Poli, Livia, Bob, Dayvid, Bruna, Yasmin, Wênio, Marcelle, Jéssica, Stella, Danilo e Leilane por fazerem desse local de trabalho um lugar alegre e descontraído, não existe tempo ruim quando o assunto é trabalhar com vocês.

Aos amigos que a vida trouxe, Eloyze, Henrique, Jack, Cícero, Ricardo, Sérgio, Natália, Marina, Arley e Ray por serem pessoas que sempre torcem por mim, espero conseguir retribuir da mesma forma.

A José, que sem dúvida é um dos meus maiores apoiadores, obrigado por todo apoio diário, pelas palavras de conforto, pelos conselhos, por sempre querer meu bem e também por ser aquela pessoa que faz questão de me lembrar que eu não estou sozinho, você é um grande companheiro.

A UFPE que sem dúvidas está mudando a minha vida, aos professores, que são excepcionais e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FACEPE que tornaram essa pesquisa possível.

“Dopo la tempesta c’è poesia”
Capitano Angelo Magnano

RESUMO

Aedes aegypti (família Culicidae) é um inseto cosmopolita cujas fêmeas através de hábitos hematófagos, podem transmitir os vírus da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Estas arboviroses representam um grande problema de saúde pública devido a sua fácil disseminação, e alto risco de mortalidade. Vacinas para os alguns desses virus acima citados não são ainda disponíveis e portanto é necessário combater o aumento da população de insetos utilizando-se inseticidas químicos. Porém, existem desvantagens como o desenvolvimento de populações resistentes, o aumento de poluição química e efeito sobre organismos não alvo. Infecções fúngicas são comuns em países de clima quente e úmido, sendo os de clima tropical e subtropical os mais afetados. *Trichophyton tonsurans* é um fungo dermatófito de ampla distribuição geográfica que é o agente etiológico da tinea capitis, tinea corporis, tinea pedis e tinea unguium, que são infecções que podem ser transmitidas de homem para homem. O uso dos antifúngicos atuais tem levado ao desenvolvimento de cepas resistentes bem como tem sido detectado nos tratamentos efeitos colaterais tais como hipersensibilidade e toxicidade. A busca por compostos naturais com atividade inseticida e antifúngica, pode aumentar o número de candidatos para uso em estratégias de controle de insetos e tratamento de doenças associadas a fungos. A indicação de nova droga pode contribuir para o não desenvolvimento de espécies resistentes pelo aumento de rotatividade bem como pode disponibilizar composto ativo sobre espécies resistentes aos compostos atualmente utilizados. O presente estudo investigou a atividade inseticida do óleo fixo de sementes de *Moringa oleifera* contra *A. aegypti* e antifúngica do óleo e fração proteica obtida a partir do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* sobre *T. tonsurans*. O óleo foi extraído através de soxlet e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa (GC-MS). O potencial inseticida do óleo foi avaliado pela determinação da atividade larvicida sobre os estágios L1, L2, e L4 bem como efeito no desenvolvimento larval e na oviposição. A atividade antifúngica foi investigada através da determinação do efeito do óleo e fração proteica no crescimento do fungo bem como do uso combinado das duas preparações. O óleo nas concentrações de 50 ppm e 200 ppm promoveu mortalidade de L1 de 10% e 1%, respectivamente. Mortalidade de L2 foi detectada nas concentrações de 50 ppm (15%), 75 ppm (35%), 100 ppm (30%), 150 ppm (25%) e 200 ppm (45%) enquanto o óleo nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200 ppm não promoveu mortalidade de L4. O óleo (50 ppm) retardou o desenvolvimento larval de 42,5% a 44,28%. O óleo e a fração proteica 0-

60% inibiram em 50% o crescimento de *T. tonsurans* na concentração de 1024 µg/mL, quando as duas preparações foram avaliadas conjuntamente a inibição de 50% do crescimento do fungo foi detectada na concentração de 512 µg/mL do óleo e de 8 µg/mL da fração proteica 0-60%. Os valores de concentração inibitória fracionada (CIF) foram 0,5 e 0,007 para o óleo e fração, respectivamente. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi de 0,507 demonstrando que a fração proteica 0-60% tem efeito aditivo ao óleo fixo. Em conclusão, o óleo de sementes de *M. oleifera* tem potencial uso no controle da população de *A. aegypti* por bloqueio do ciclo biológico do mosquito. O uso combinado do óleo e fração proteica 0-60% resulta em aumento da eficiência antifúngica.

Palavras-chave: Óleo vegetal. *Aedes aegypti*. Bioinseticida. Antifúngico. *Tricophyton tonsurans*.

ABSTRACT

Aedes aegypti (family Culicidae) is a cosmopolitan insect whose females through hematophagous habits can transmit the dengue, zika, chikungunya and yellow fever virus. These arboviruses represent a major public health problem because of their easy dissemination, and high mortality risk. Vaccines for the above-mentioned viruses are not yet available and therefore it is necessary to combat the increase of the insect population using chemical insecticides which has as disadvantages the development of resistant insects, increased chemical pollution and effect on non-target organisms. Fungal infections are common in countries with a hot and humid climate, with tropical and subtropical climates most affected. *Trichophyton tonsurans* is a dermatophyte fungus of wide geographic distribution that is the etiological agent of tinea capitis, tinea corporis, tinea pedis and tinea unguium, which are infections that can be transmitted from man to man. The use of current antifungal agents has led to the development of resistant species as well as side effects such as hypersensitivity and toxicity have been detected in the treatments. The search for natural compounds with insecticidal and antifungal activity may increase the number of candidates for use in insect control strategies and treatment of diseases associated with fungi. The indication of a new drug can contribute to the non-development of resistant species by the increase of rotation as well as it can provide active compound on species resistant to the currently used compounds. The present study investigated the insecticidal activity of the oil of *Moringa oleifera* seeds against *A. aegypti* and antifungal of the oil and protein fraction 0-60% obtained from the salt extract of *M. oleifera* on *T. tonsurans*. The oil was extracted through soxlet and characterized by gas chromatography coupled mass spectrometry (GC-MS). The insecticidal potential of the oil was evaluated by determining the larvicidal activity on the L1, L2, and L4 stages as well as the effect on larval development and oviposition. The antifungal activity was investigated by determining the effect of oil and 0-60% protein fraction on fungus growth as well as the combined use of the two preparations. The oil at concentrations of 50 ppm and 200 ppm promoted L1 mortality of 10% and 1%, respectively. L2 mortality was detected at concentrations of 50 ppm (15%), 75 ppm (35%), 100 ppm (30%), 150 ppm (25%) and 200 ppm (45%) while the oil at concentrations of 10, 50, 100, 150, 200 ppm did not promote mortality of L4. The oil (50 ppm) slowed the larval development from 42.5% to 44.28%. The oil and the 0-60% protein fraction inhibited the growth of *T. tonsurans* at a concentration of 1024 $\mu\text{g/mL}$ by 50% and when the two preparations were evaluated together the 50% inhibition of fungus growth was detected at the concentration of 512 $\mu\text{g/mL}$ of the oil

and 8 µg/mL of the 0-60% protein fraction. The fractional inhibitory concentration (FIC) values were 0.5 and 0.007 for oil and 0-60% protein fraction, respectively. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was 0.507, showing that the 0-60% protein fraction has an additive effect on fixed oil. The oil of *M. oleifera* seeds has potential use in the control of the *A. aegypti* population by blocking the biological cycle of the mosquito. The combined use of oil and 0-60% protein fraction results in increased antifungal efficiency.

Key words: Vegetable oil. *Aedes aegypti*. Bioinsecticide. Antifungal. *Trichophyton tonsurans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos tipos de lectinas.....	23
Figura 2 - Representação de atividade hemaglutinante de lectinas (A) e representação de teste de inibição de atividade hemaglutinante com carboidratos (B).....	24
Figura 3 - Árvore de <i>Moringa olifera</i>	26
Figura 4 - Sementes de <i>Moringa oleifera</i>	27
Figura 5 - Distribuição geográfica das populações de <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 6 - Ciclo biológico do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	32
Figura 7 - Tineas - A: corporis; B: pedis, C: unguiun; D: capitis	34
Figura 8 - <i>Trichophyton tonsurans</i> (A) e culturas de <i>T. tonsurans</i> em Agar-sabourau-dextrose (B e C).....	35

ARTIGO

Figura 1 - Aspectos de larvas provenientes do ensaio de desenvolvimento larval na presença do óleo fixo de sementes de <i>Moringa oleifera</i> após 72 (A), 144(B) e 168 h (C) de incubação.....	46
Figura 2 - Desenvolvimento larval de <i>A. aegypti</i> incubado com o óleo fixo de sementes de <i>M. oleifera</i>	46
Figura 3 - Oviposição de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> na ausência e na presença do óleo fixo de sementes de <i>M. oleifera</i> (valores de $p > 0,005$).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica da <i>Moringa oleifera</i>	26
Tabela 2 - Percentual de constituintes da semente de <i>Moringa oleifera</i> g/100g de peso seco.....	28
Tabela 3 - Características físico-químicas do óleo de sementes extraído por técnicas diferentes.....	28

ARTIGO

Tabela 1 - Caracterização (GC-MS) e quantificação (FID) dos ácidos graxos presentes no óleo fixo de sementes de <i>Moringa oleifera</i> após esterificação.....	43
Tabela 2 - Taxa de mortalidade do óleo fixo de sementes de <i>M. oleifera</i> com larvas de <i>A. aegypti</i> em estágios L1 e L2.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivo Específicos.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	ÓLEOS FIXOS DE PLANTAS.....	18
2.2	PROTEÍNAS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	20
2.1.1	Lectinas	22
2.3	<i>Moringa oleifera</i> LAM.....	25
2.3.1	Óleo de sementes de <i>Moringa oleifera</i>	28
2.3.2	Lectinas de sementes de <i>Moringa oleifera</i>	29
2.4	O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	30
2.5	DERMATOFITOSSES.....	33
2.5.1	<i>Trichophyton tonsurans</i>	34
3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO FIXO E FRAÇÃO PROTEICA DE SEMENTES DE <i>Moriga oleifera</i>	36
4	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti (Culicidae) é encontrado em todos os trópicos e subtropicais em todo o mundo (América do sul, Sudeste Asiático, África) e representa um importante problema de saúde pública a longo prazo e é o principal vetor que transmite várias doenças arbovirais, como dengue, zika e chikungunya e febre amarela (BHARATI *et al.*, 2018; WHO, 2018). Como ainda não existe medicamento ou vacina para o tratamento de algumas dessas doenças o único método de prevenção da disseminação da doença é através do controle do vetor. Esse controle é feito através de estratégias que possam impedir o ciclo reprodutivo do inseto, desde o ovo até a sua forma adulta (NVBDCP, 2017; BHARATI *et al.*, 2017). No Brasil emprega-se o uso de inseticidas contra larvas e adultos que são aplicados em domicílios de 4 a 6 vezes por ano, durante visitas de agentes de controle, preferencialmente apenas em recipientes de água que não podem ser descartados. Em contraste, aplicações de baixo volume de inseticidas não apresentam função preventiva (GARCIA *et al.*, 2018). Porém, frequentemente os mosquitos desenvolvem resistência contra os químicos usados rotineiramente. A resistência a inseticidas resulta em impactos negativos na capacidade de controlar este vetor. Existem várias adaptações possíveis que permitem que o mosquito sobreviva a doses letais de um inseticida, geralmente classificadas com base em suas propriedades bioquímicas / fisiológicas como mecanismos de diminuição da resposta aos inseticidas ou mecanismos de diminuição da exposição (VONTAS *et al.*, 2012).

A infecção fúngica da pele é um problema comum. Atualmente, 20 a 25% da população mundial sofre de micoses, tornando-se uma das formas mais frequentes de infecção. *Trichophyton tonsurans* é também a principal espécie de dermatófito relacionada com infecções assintomáticas do couro cabeludo e também infecções em atletas de esporte de contato (GUO *et al.*, 2011; ILKIT *et al.*, 2010; ILKIT *et al.*, 2008). *T. tonsurans* é frequentemente resistente aos fungicidas utilizados rotineiramente (MENDEZ-TOVAR *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2008; MANZANO-GAYOSSO *et al.*, 2008). O surgimento de novos casos de micose aumentou a preocupação pública em desenvolver novas alternativas seguras e biodegradáveis. Nos últimos anos, houve um crescente interesse na pesquisa sobre o possível uso de produtos naturais que podem ser menos prejudiciais no controle de doenças e de poluição ambiental.

Nesse contexto, a *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) ganha destaque por ser fonte de macromoléculas com atividade antifúngica e inseticida, é uma árvore de distribuição

panropical, originária do nordeste indiano, com grande capacidade adaptativa a climas quentes e secos. Essa planta apresenta uma versatilidade de aplicações nos diversos setores como na alimentação, na indústria farmacêutica, na produção de óleo, fonte de proteína para os animais e uso na clarificação de águas turvas sendo um promissor coagulante natural (OYEYINKA *et al.*, 2018). *M. oleifera* tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores que buscam estudar principalmente suas proteínas, flavonóides, ácidos graxos e substâncias fenólicas (HE *et al.*, 2018). As sementes de *M. oleifera* apresentam como componentes majoritários óleo e proteínas, onde o óleo representa cerca de 40% do conteúdo total das sementes. Esse óleo é um grande candidato na indústria do biodiesel devido a sua grande resistência à oxidação (MOFIJUR *et al.*, 2014; ATABANI *et al.*, 2013). Essas moléculas apresentam atividades inseticida e antimicrobiana contra diversas espécies, por exemplo, proteínas (lectinas) da semente apresentaram atividade inseticida contra *Aedes aegypti*, *Anagasta kuehniella* e atividade antimicrobiana contra *Bacillus sp.*, *B. pumillus*, *B. megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens* (OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014; AGRA-NETO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Porém, ainda sabe-se pouco sobre as atividades biológicas relacionadas ao óleo fixo de suas sementes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o potencial inseticida do óleo extraído de sementes de *M. oleifera* contra *A. aegypti* e avaliar o potencial antifúngico do óleo e fração proteica de sementes de *Moringa oleifera*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Extrair e caracterizar o óleo de sementes de *M. oleifera*;
- Avaliar a atividade larvicida do óleo contra *A. aegypti*;
- Avaliar o efeito do óleo no desenvolvimento de larvas de *A. aegypti*;
- Determinar o efeito do óleo na taxa de oviposição de fêmeas de *A. aegypti*;

- Avaliar o potencial antifúngico do óleo e fração proteica de sementes de *M. oleifera* contra *Tricophyton tonsurans*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÓLEOS FIXOS DE PLANTAS

Óleos fixos de plantas têm-se tornado populares devido a sua grande concentração de ácidos graxos saturados e insaturados (TIMILSENA *et al.*, 2017). Ácidos graxos são compostos orgânicos formados por uma cadeia carbônica ligada a átomos de hidrogênio contendo em uma de suas extremidades um grupo carboxílico; quanto mais extensa for a sua cadeia carbônica, menor será a sua polaridade. Ácidos graxos são de fundamental importância para o ser humano, pois são utilizados como fonte de energia para o bom funcionamento do corpo, quando consumidos adequadamente (DUARTE, 2006).

Dentre os ácidos graxos apenas 20 a 25 são amplamente distribuídos na natureza e têm significado comercial. Estes ácidos graxos variam entre 10 e 22 carbonos de comprimento e são obtidos em grandes quantidades de óleos vegetais e gorduras animais (HARWOOD; GUNSTONE, 2007; ZANETTI *et al.*, 2013). Óleos fixos de plantas contêm uma diversidade de ácidos graxos tais como palmítico, oleico, linoleico e esteárico (ERDEMOGLU; KUSMENOGLU, 2003; KORUL'KINA *et al.*, 2004; AHMAD, 2017). Os óleos fixos contêm além de ácidos graxos outros constituintes tais como minerais e proteínas. Mohammed e colaboradores (2018) estudaram a composição do óleo extraído de gergelim de diferentes regiões do Iémen e identificaram que o óleo era rico nos ácidos graxos oleico e linoleico, e também era fonte de esteróis e minerais como K, Ca, P, Mg, Mn e Fe. Os autores também demonstraram que os óleos extraídos de sementes das regiões mais úmidas apresentavam 30% de proteína.

Óleos fixos são obtidos geralmente por extração mecânica, técnica mais antiga empregada na extração de gorduras vegetais, podendo o material remanescente (torta) ser utilizado como fonte de outras moléculas (VISIOLLI; GALLI, 1998; RAMALHO *et al.*, 2018). Outras técnicas têm sido usadas por possibilitarem uma extração mais rápida do óleo fixo, como por exemplo: a extração enzimática, a extração em meio aquoso, que tem sido indicada como uma alternativa para a obtenção de óleos vegetais derivados de polpas de frutas; a extração utilizando o microondas, que foi eficaz em extrair óleo de sementes de *Pongamia pinnata* e de *Moringa oleifera* sem alterar a sua constituição; a extração supercrítica com o auxílio do CO₂ que ainda vem sendo estudada pois pode alterar a qualidade final do óleo, e a extração utilizando solventes orgânicos (NASCIMENTO, 2008; BENITO-ROMAN, 2018; CHANDRA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; ZHONG, 2018). No último

método, o hexano tem sido mais utilizado que o metanol e propanol por apresentar várias vantagens incluindo o seu baixo ponto de ebulição que diminui a decomposição do óleo no momento da retirada do solvente (RAMALHO *et al.*, 2012; TRENTINI, 2017; KARTIKA *et al.*, 2018). A diversidade estrutural dos ácidos graxos faz com que eles sejam extensivamente usados como matéria-prima para a indústria alimentícia e na fabricação de sabões, detergentes, lubrificantes, revestimentos, cosméticos, bem como de produtos especializados para fins farmacológicos.

Pesquisas têm demonstrado a atividade inseticida de ácidos graxos. Scudeler e colaboradores (2013) revelaram que o óleo inseticida de neem (*Azadirachta indica*) afetou a formação do casulo de pupas de *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). Os autores demonstraram que os insetos tratados com soluções do óleo foram mais susceptíveis a predadores devido apresentarem a parede do casulo com espessura diminuída e com porosidade aumentada. Jones e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato de inflorescência de fruta-pão, contendo uma mistura dos ácidos graxos palmítico, mirístico e linoleico, apresentou efeito deterrente sob o mosquito *A. aegypti*. Reifenrath (2005) registrou uma patente de uma mistura de ácidos graxos insaturados de cadeia curta com ácidos graxos saturados com potencial repelente contra algumas espécies de insetos. Outros trabalhos com resultados similares foram reportados por Bosh e colaboradores (2000) e por Skinner e colaboradores (1970).

Rahuman e Venkatesan (2008) reportaram a atividade larvicida de ácidos graxos extraídos de *Citrullus colocynthis* sobre larvas no quarto estágio de *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* com valores de concentração letal para matar 50% das larvas (CL₅₀) variando de 7,66 a 9,79 ppm para o ácido oleico e de 11,49 e 27,24 ppm para o ácido linoleico enquanto os valores de CL₉₀ ficaram entre 30,71 e 37,42 para o ácido oleico e 47,35 e 96,33 para o ácido linoleico. Silva e colaboradores (2015) mostraram a atividade larvicida dos óleos, ácidos graxos e metil-ésteres provenientes de frutos maduros e não maduros de *Solanum lycocarpum* sobre larvas de *A. aegypti*. O estudo revelou que as amostras mais eficientes foram a mistura de ácidos graxos contendo os ácidos oleico, linoleico e palmítico do fruto maduro (CL₅₀: 0,70 mg/L), os metil-ésteres de frutos não maduros (CL₅₀: 2,16 mg/L) e o óleo do fruto maduro (CL₅₀: 2,99 mg/L).

A atividade antibacteriana de ácidos graxos tem sido detectada. Saito e colaboradores (1984) mostraram que ácidos graxos insaturados com 16 a 20 carbonos, principalmente o ácido oleico e o palmitoleico, foram antibacterianos sobre micobactérias por causarem deformidade na membrana e falha na formação da membrana celular. Akiuz (2018) reportou

que filmes de quitosana combinados com óleo de milho, manteiga, gordura animal, azeite e óleo de girassol foram antibacterianos contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus thuringiensis*. O estudo revelou que esta pode ser uma estratégia para evitar o crescimento desses micro-organismos em alimentos quando usados como uma forma de embalagem.

Ácidos graxos também apresentam atividade antifúngica. Rhimi e colaboradores (2018) demonstraram que o extrato lipídico de folhas de *Dittrichia viscosa* rico em ácidos graxos, principalmente os ácidos linoleico e linolênico, inibiu o crescimento de *Candida* e *Malassezia* e sugeriram que o mesmo poderia ser utilizado para tratamento de infecções causadas por leveduras resistentes a compostos azóis. Bergsson e colaboradores (2001) reportaram que o ácido cáprico foi capaz de causar desordem no citoplasma de células de *C. albicans* afetando a sua capacidade infectante e Quatrin e colaboradores (2017) revelaram a atividade fungicida do óleo de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* com concentração mínima fungicida (CMF) de 0,7, 1,4 e 1,4 mg/mL, respectivamente. Os autores também demonstraram que o óleo nanoencapsulado foi mais eficiente em diminuir a formação do biofilme quando comparado com o óleo não encapsulado.

O potencial de uso de ácidos graxos como agente antimicrobiano na indústria de processamento do couro também vem sendo estudado. Suhu e colaboradores (2017) demonstraram que uma mistura de ácidos graxos transesterificados baseados na composição do óleo de *Calophyllum inophyllum*, quando combinada com o extrato de sementes de *Trachyspermum ammi* (que possui moléculas com atividade antifúngicas como timol e carvacrol), foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum* e *Paecilomyces variotii* que são fungos capazes de contaminar o couro em fase de processamento. O ácido graxo sintético (\pm)-4-metoxidecanóico foi um agente antifúngico contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* mais eficiente (menor valor de concentração mínima inibitória) que o ácido cáprico, porém o mesmo foi menos eficiente que o fluconazol contra a cepa de *Candida albicans* testada (CARBALLEIRA, 2009).

2.2 PROTEÍNAS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As plantas possuem um vasto número de peptídeos e proteínas que estão envolvidas na proteção do vegetal contra o ataque de insetos e microrganismos fitopatógenos (WANG *et*

al., 2016). A síntese dessas moléculas pode ser iniciada através de estímulos por agentes de natureza biótica ou abiótica, enquanto outras proteínas e peptídeos de defesa podem ser expressos constitutivamente (OLIVEIRA, 2004; VAN DER BERGH *et al.*, 2002). Proteínas fungicidas são não produzidas apenas por plantas, mas também por outros organismos, incluindo bactérias, insetos, mamíferos e até mesmo pelos próprios fungos (WANG *et al.*, 2006).

Defensinas, quitinases, proteínas semelhantes à quitinases, melaninas, proteínas de ligação à quitina, proteínas que inativam o ribossomo (RIP's), proteínas semelhantes à taumatina e miraculina, proteínas de transferência lipídica, inibidores de proteases e lectinas são diferentes classes de proteínas antifúngicas (ZHANG *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2012; VAN DEN BERGH *et al.*, 2004; WANG., 2004; LAM *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000). Lectinas também atuam como agentes antibacterianos e inseticidas (WANG *et al.*, 2012; LOGEMANN *et al.*, 1992).

A procura por novas proteínas antifúngicas sempre foi um assunto de interesse devido ao potencial uso dessas moléculas como terapias inovadoras e manejo de patógenos fúngicos (WANG *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2013). O isolamento de proteínas antifúngicas provenientes de sementes leguminosas é considerada uma tarefa de grande valia pois estas podem atuar através de diferentes processos servindo como uma proteção do hospedeiro evitando a infecção por esses patógenos, por limitar ou impedir o seu crescimento (KONDORI *et al.*, 2011; KLOMLAO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2006).

Diversas proteínas e peptídeos extraídos de plantas já foram descritos por apresentarem atividade sobre fungos. A quitinase de 38,8 kDa extraída das sementes de *Prosopis cineraria* apresentou atividade sobre *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus fumigatus* na quantidade de apenas 6,73 µg (SOLANKI *et al.*, 2018). Vulgarinina, um peptídeo de 7 kDa extraído de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. apresentou atividade sobre *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* e *Botrytis cinerea*, com LC₅₀ para *M. arachidicola* de 0,21 µM (WONG & NG, 2005). A proteína AFP-J extraída de tubérculos de *Solanum tuberosum* cv L. Jopung inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Trichosporon beigelii* e *Saccharomyces cerevisiae* e aquela isolada a partir de sementes de *Castanea mollissima*, denominada castamollina, apresentou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* e *Coprinus comatus* (PARK *et al.*, 2005; WANG; NG, 2003).

2.2.1 Lectinas

Lectinas (do latim "*lectus*", que significa selecionado) são proteínas hemaglutinantes de origem não imunológica que tem a capacidade de se ligar reversivelmente e especificamente a carboidratos sejam eles mono, oligo ou polissacarídeos. A ênfase da origem não imunológica se dá para diferenciar esse grupo de proteínas, já as lectinas diferem entre si por apresentarem distintas sequências de aminoácidos, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional, de anticorpos anticarboidratos que são estruturalmente semelhantes e que também aglutinam células.

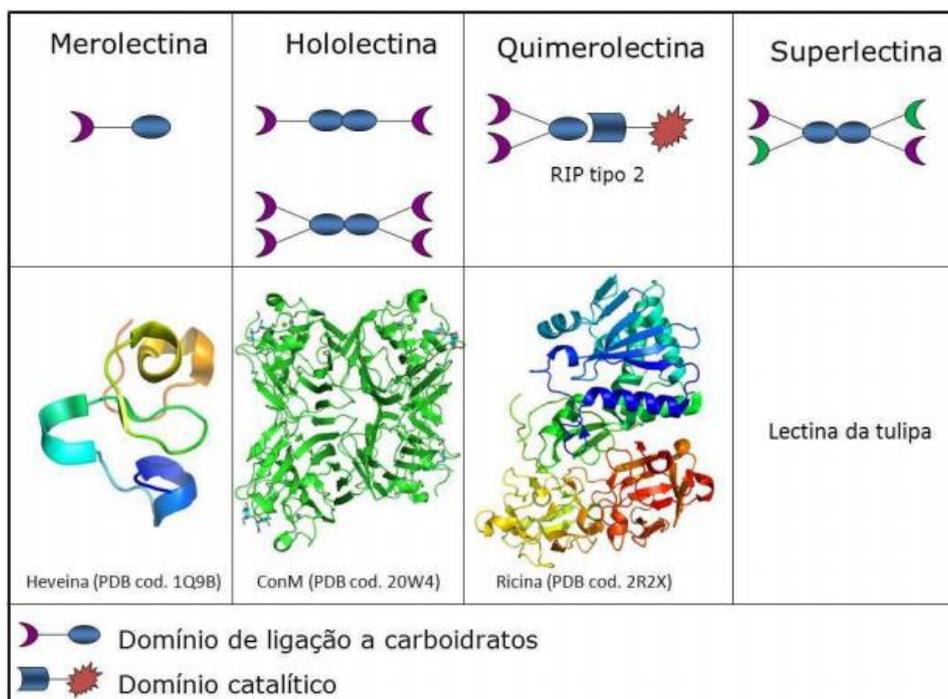
Lectinas podem ser encontradas em vírus e em todas as formas de vida sendo as de plantas principalmente extraídas de sementes, que é o órgão de estoque do vegetal. As lectinas de plantas produzidas nas sementes, tubérculos, bulbos e raízes dominam o cenário da lectinologia por serem encontradas em grandes quantidades nestes tecidos (CARNEIRO, 2011).

A habilidade de ligar carboidratos de lectinas tem sido atribuída à existência de uma região denominada “sítio de ligação a carboidrato” ou “domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC)” (SHARON; LIS, 2002; SHARON; LIS, 2004; WEIS; DRICKARMER, 1996). A interação entre lectina e carboidrato pode ser realizada principalmente através de pontes de hidrogênio (onde os grupos hidroxila constituintes dos açúcares são capazes de doar e receber moléculas de hidrogênio), coordenação por grupos metil, forças de Wan Der Waals e interações hidrofóbicas (ELGAVISH; SHAANA, 1998). Lectinas de plantas, em sua maioria, apresentam especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligosacarídeos e glicanas), tais como manose, N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico (VAN DAMME *et al.*, 2014).

As lectinas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas possuem apenas um DRC, o qual se liga a carboidratos simples, e não apresentam atividade hemaglutinante e catalítica; exemplos de merolectinas são a heveína, proteína ligante de quitina extraída do látex da mangueira, e as proteínas ligantes de manose que estão presentes nas orquídeas (VAN DAMME, 2008; VAN DAMME, 1996, VAN PARIJIS, 1991). As hololectinas, que compreendem o maior grupo de lectinas, possuem dois DRCs com elevada homologia e são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; são consideradas as hemaglutininas clássicas e a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBR) é um exemplo desse grupo (VAN DAMME 2008; SANZ-

APRICIO, 1997). As quimerolectinas, dispõem de pelo menos um DRC e outro domínio com atividade biológica distinta, o qual age independentemente dos outros. A lectina PPL2 extraída de sementes de *Parkia platycephala*, é uma quimerolectina que apresenta um domínio ligante de quitina e um segundo domínio com atividade endoquitinásica. As RIP's abrina e ricina, dependendo do número dos sítios de ligação a carboidratos, podem ser da classe das merolectinas ou das hololectinas (VAN DAMME *et al.*, 2008; CAVADA *et al.*, 2006; VAN DAMME *et al.*, 1998). As superlectinas são um grupo de quimerolectinas possuidoras de dois ou mais DCR's distintos, conferindo a essa proteína a especificidade por carboidratos diferentes; a lectina da tulipa, está inserida nesse grupo por ter um domínio N-terminal capaz de se ligar a manose e outro domínio que liga N-acetil galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 2008; VAN DAMME 1996).

Figura 1 - Representação dos tipos de lectinas



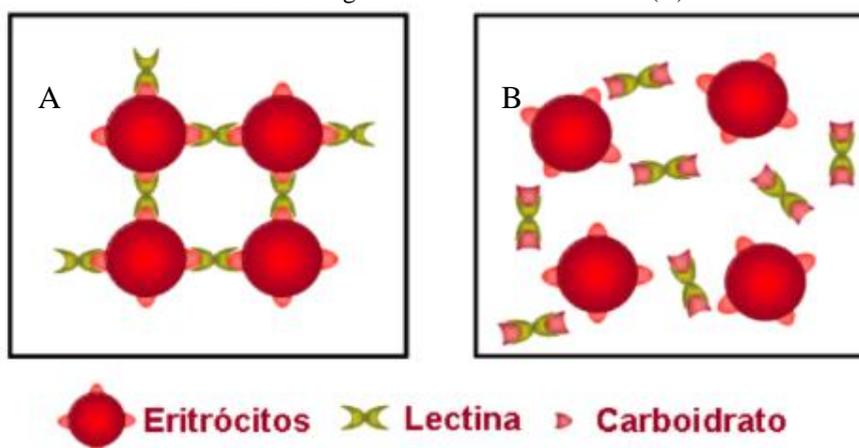
Fonte: TEIXEIRA, 2012.

Algumas lectinas apresentam atividade biológica apenas na presença de íons bivalentes enquanto aquelas que não necessitam de íons metálicos já possuem a conformação estrutural necessária para o reconhecimento aos carboidratos. Nas lectinas de natureza glicoproteica, a porção glicídica geralmente aumenta a estabilidade da lectina dificultando a sua degradação proteolítica e a desnaturação por temperatura e pH além de influenciar na

interação da lectina com outras moléculas e na solubilidade da proteína quando em solução aquosa (SHARON; LIS, 1990; KILPATRICK, 1986).

As lectinas são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas, que se apresentam em solução ou ligadas a membrana (CORREIA *et al.*, 2008). A detecção da presença de lectinas em uma amostra é realizada através do ensaio de hemaglutinação, onde a preparação que contém essas proteínas é incubada com uma suspensão de eritrócitos. Os eritrócitos utilizados de humanos ou de outros animais podem ser tratados enzimaticamente, por exemplo com tripsina e papaína, ou quimicamente, por exemplo com glutaraldeído ou formaldeído, visando o aumento da interação com a lectina. A formação de uma malha de aglutinação entre os eritrócitos indica positividade no teste e a atividade hemaglutinante (título) é dada pelo inverso da titulação do último poço que apresentou a malha de aglutinação (BRITO *et al.*, 2017). Para a confirmação de que a atividade hemaglutinante foi devido à presença de lectina, realiza-se o teste de inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos onde a amostra é inicialmente incubada com uma solução de diferentes carboidratos antes da adição da suspensão de eritrócitos. A inibição é confirmada pela ausência de hemaglutinação, essa inibição é causada porque os DCR's das lectinas serão ocupados pelos carboidratos livres em solução, diminuindo a interação das lectinas com os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos. (WU *et al.*, 2006.)

Figura 2 - Representação de atividade hemaglutinante de lectinas (A) e representação de teste de inibição de atividade hemaglutinante com carboidratos (B)



Fonte: PAIVA *et al.*, 2011.

O interesse por lectinas tornou-se mais evidente na década de 60 e estudos foram capazes de indicar essas moléculas como ferramentas úteis para a detecção, isolamento e caracterização parcial de glicoproteínas, além de possibilitar a identificação de mudança no

perfil glicídico presente no glicocálice da superfície de células durante o desenvolvimento, diferenciação e transformação tumoral (CASTRO NETO *et al.*, 2008). Dentre algumas atividades biológicas das lectinas vegetais têm-se o armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, atividade inseticida, atividade antitumoral, atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana (PROCOPIO *et al.*, 2017; ARAUJO *et al.*, 2012).

Lectinas antifúngicas têm atraído a atenção devido à sua capacidade de impedir que espécies patogênicas invadam culturas agrícolas e causem doenças em animais; a capacidade de lectinas de inibir o crescimento de fungos varia com a espécie do microrganismo. A lectina extraída da leguminosa *Phaseolus lunatus* (feijão-de-lima) inibiu o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Sclerotium rolfsii*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (WU *et al.*, 2016). PgTeL, uma lectina extraída da testa de *Punica granatum*, inibiu a formação de biofilme de *Candida albicans*, bem como causou estresse oxidativo e ruptura nas células fúngicas (SILVA *et al.*, 2018).

As lectinas possuem a capacidade de se ligarem especificamente às hifas fúngicas e atuam impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo, também podem atuar na germinação de esporos fúngicos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (LIS; SHARON, 1981). A interação das lectinas com fungos é possível devido estes microrganismos conterem em sua parede celular polissacarídeos, tais como celulose e quitina, além dos monossacarídeos arabinose, ácido D-glicurônico, N-acetil-D-glicosamina, D-galactosamina, D-galactose, D-glicose, D-glicosamina, L-fucose, D-manose, ramnose, ribose e xilose; Desses, glicose e manose são encontrados na maioria dos fungos (BARTINICKI-GARCIA, 1968).

2.3 *Moringa oleifera* LAM.

A *Moringa oleifera* (Figura 3) também popularmente conhecida como árvore da vida ou árvore do milagre, é uma árvore de porte grande e seu tamanho pode variar entre 10 e 12 metros de altura (PAROTTA *et al.*, 1993). Pertencente a família Moringaceae, o gênero *Moringa* compreende cerca de 13 espécies sendo que 11 destas tem origem na África e Arábia e 2 são nativas da Índia (MINAIYAN *et al.*, 2014; AMAGLO *et al.*, 2010; NASIR; ALI, 1972). Esta espécie é amplamente distribuída na Ásia, África e América Latina graças a sua grande capacidade resiliente e de longevidade (TAO-BIN HE, 2018; ZHAO; ZHANG, 2013).

Tabela 1 - Classificação taxonômica da *Moringa oleifera*

Reino	Plantae
Sub-reino	Angiosperms
Filo	Charophyta
Classe	Equisetopsida
Sub-classe	Magnollidae
Ordem	Brassicales
Familia	Moringaceae
Gênero	Moringa
Espécie	<i>Moringa oleifera</i>

Fonte: Adaptado de Azad *et al.* (2015).

Figura 3 - Árvore de *Moringa oleifera*

Fonte: Disponível em: <http://chaves.rcpol.org.br/>

A planta é conhecida por possuir várias aplicações, tais como na purificação da água, agricultura e cosmética. Suas folhas, flores, vagens e sementes são utilizadas na alimentação humana, principalmente na Índia, Filipinas e Paquistão bem como forrageira na alimentação de animais (EL-SOHAIMY, 2015; NDUBUAKU *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2008). Estima-se que a soma de seus componentes químicos nutricionais das diferentes partes da planta chegam a passar de mais de 90 compostos (FAHEY, 2005; FUGLIE, 2001).

A *M. oleifera* ainda é descrita por conter uma maior concentração de ácido ascórbico (vitamina c) em relação a algumas frutas, como por exemplo a laranja, e também foram identificadas altas concentrações de vitamina A, cálcio, potássio e ferro (ROCKWOOD *et al.*,

2013). As folhas frescas da *M. oleifera* são utilizadas como ingredientes de saladas e conseguem manter seu valor nutricional mesmo depois de secas e estocadas por um período de meses. Ainda há relatos sobre o uso popular das folhas no tratamento de condições associadas a sintomas da AIDS, bronquites, úlceras, malária e febre (KASOLO *et al.*, 2010).

As atividades biológicas da *M. oleifera* são resultantes da grande gama de fitoquímicos (taninos, esteróis, terpenóides, flavonóides, saponinas, antraquinonas, alcaloides) produzidos por essa planta, além de ser uma grande fonte de proteínas e possuir um excelente perfil de aminoácidos e ácidos graxos (KHOLIF *et al.*, 2015; MULUGETA; FEKADU, 2014; BERCOVICK *et al.*, 2013; SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2010). Todas as partes da planta são amplamente utilizadas na medicina popular por serem ricas em vitaminas, minerais e antioxidantes, conferindo a esta planta diferentes potenciais farmacológicos e biotecnológicos (BRILHANTE *et al.*, 2017; ANWAR *et al.*, 2007).

Estudos comprovam a eficácia de diferentes preparações de tecidos de *M. oleifera* como agentes anti-inflamatório (folhas, frutos e sementes), antitumoral (folhas, frutos e sementes), anti-microbiano (folhas e sementes), anti-oxidante (folhas, frutos e sementes), imunomodulador (sementes), anti-diabética (folhas) e inseticida (sementes) contra *A. aegypti* (ELGAMILY *et al.*, 2016; AL-ASMARI *et al.*, 2015; AGRA-NETO *et al.*, 2014; CHAROENSIN *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014; WATERMAN *et al.*, 2014; DIVI *et al.*, 2012; MBIKAY, 2012; PRABHU *et al.*, 2011; CHEENPRACHA *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2010; PURWAL *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; MAHAJAN *et al.*, 2009).

As sementes de *M. oleifera* são globulares, com cerca de 1 cm de diâmetro, com um peso médio de cerca de 0,3 g, 2,5 cm de comprimento, 0,4 a 0,7 cm de largura; o núcleo é responsável por 70% a 75% do peso da semente (ATABANI *et al.*, 2013; RAMACHANDRAN, 1980). A Tabela 2 mostra os compostos presentes nas sementes.

Figura 4 - Sementes de *Moringa oleifera*



Tabela 2 - Percentual de constituintes da semente de *Moringa oleifera* g/100g de peso seco

Nutrientes	Média	SD	Faixa
Gorduras	36,7	2,8	(34,7-40,4)
Proteínas	33,4	1,3	(29,4-33,3)
Carboidratos	18,4	1,4	(16,5-19,8)
Fibras	7,3	0,5	(6,8-8,0)
Cinzas	6,2	0,9	(4,4-6,9)
Umidade	7,0	1,2	(5,7-8,9)

Fonte: Adaptado de LEONE *et al.* (2016)

2.3.1 Óleo de sementes de *Moringa oleifera*

Uma das principais utilizações das sementes de *Moringa oleifera* é para a extração do seu óleo, popularmente chamando de óleo de Bem. Este óleo é rico em ácido oleico, tocoferóis e esteróis o que confere ao mesmo uma estabilidade a oxidação maior que de outros óleos também ricos em ácidos oleicos como óleos de sementes de girassol, macadâmia, cártamo, amêndoa e damasco (MARIOD *et al.*, 2017). A Tabela 3 resume características físico-químicas do óleo de sementes extraído por técnicas diferentes.

Tabela 3 - Características físico-químicas do óleo de sementes extraído por técnicas diferentes

Características	Pressão Fria	n-Hexano
Densidade a 24°C (mg/mL)	0,901 ± 0,002	0,901 ± 0,011
Índice de refração (40°C)	1,462 ± 0,005	1,459 ± 0,004
Unidades de cor vermelha	1,7 ± 0,5	1,1 ± 0,6
Unidades de cor amarela	28,3 ± 2,4	35,8 ± 14,0
Ponto de fumaça (°C)	203 ± 2	200 ± 1
Viscosidade (mPa x 5)	75,9 ± 25,6	52,8 ± 8,1
Acidez (% como ácido oleico)	1,91 ± 1,13	1,07 ± 1,12
Valor de saponificação (mg de KOH/g do óleo)	189,6 ± 8,0	183,7 ± 4,3
Iodo (g por I/100 de óleo)	64,54 ± 0,97	67,86 ± 1,45

Fonte: Adaptado de LEONE *et al.* (2016).

O óleo das sementes de *M. oleifera* apresenta uma coloração amarelo-dourado e na sua constituição são encontrados ácidos graxos saturados (19%) e insaturados (81%), sendo esses os ácidos láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, linolênico, araquídico e oleico, sendo este último o que apresenta maior concentração, chegando a representar quase 75% do óleo (MOFIJUR *et al.*, 2014; ASRAF; GILANI, 2007). O óleo pode ser utilizado em substituição ao azeite de oliva pois além de apresentar o mesmo perfil de ácidos graxos, também apresenta similaridade em propriedades químicas e um grande concentração de tocoferóis (TSAKNIS *et al.*, 1999; TSAKNIS *et al.*, 1998).

O óleo de sementes de *M. oleifera* tem sido extraído usando diferentes técnicas como extração com solvente, extração aquosa utilizando enzimas e extração supercrítica utilizando dióxido de carbono (BHUTADA *et al.*, 2016; RUTTARATTANAMONGKOL *et al.*, 2014; LATIF *et al.*, 2011). Silva e colaboradores (2010) concluíram que o óleo das sementes de *M. oleifera* cultivadas em território brasileiro é um potencial produto para a fabricação de combustível na engenharia de diesel e poderia ser uma ferramenta utilizada na indústria de petrodiesel. Estudos relatam que o óleo de *M. oleifera* também tem potencial de uso na indústria de perfumaria e cosmética devido a sua grande capacidade emoliente, suas características táteis, e de absorção de odor e cor. Também tem sido indicado seu uso como lubrificante para maquinários e como droga hipolipidêmica (AZAM *et al.*, 2005; FAHEY *et al.*, 2005; LALAS; TSAKNIS, 2002; CHAUDHRI, 1996; FERRAO; FERRAO, 1987; NAUTIYAL; VENHATARAMAN, 1987). Chuang e colaboradores (2007) descreveram o possível potencial antimicótico do óleo sobre dermatófitos que são fungos capazes de infectar e causar reações inflamatórias em humanos.

2.3.2 Lectinas de sementes de *Moringa oleifera*

A lectina cMoL (do inglês *coagulant Moringa oleifera lectin*) é uma proteína de catiônica e massa 30 kDa, ativa em uma faixa de pH entre 4,0 e 9,0 e cuja atividade hemaglutinante é resistente por mais de 7 horas em 100°C, estimulada por íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+ e inibida por ovalbumina, azocaseína e asialofetúina (SANTOS *et al.*, 2009). A proteína demonstrou atividade coagulante similar a do sulfato de alumínio, um dos coagulantes mais utilizados no tratamento da água (SANTOS *et al.*, 2009). Luz e colaboradores (2013) demonstraram que cMoL apresentou atividade anti-coagulante sanguíneo aumentando o tempo de tromboplastina e o tempo de protrombina, sendo cMoL a primeira lectina extraída da *M. oleifera* que apresenta essa atividade biológica. cMoL também apresenta atividade inseticida contra *Anagasta kuehniella* e foi sugerido que esta atividade foi devida a interação da lectina com a quitina, modulação das enzimas digestivas do intestino médio do inseto, bem como na interação com glicoproteínas presentes na matriz peritrófica impedindo que o inseto absorva nutrientes necessários para o seu crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em 2017, Luz e colaboradores identificaram a capacidade citotóxica e específica da lectina sob a linhagem celular B16-F10 de melanoma sem afetar fibroblastos saudáveis.

WSMoL (do inglês *water soluble M. oleifera lectin*) é uma proteína aniônica, que interage com quitina cuja atividade hemaglutinante é maior em pH 4,5 e é inibida por frutose

(SANTOS *et al.*, 2005). Ferreira e colaboradores (2011) demonstraram que WSMoL é uma das proteínas da semente eficaz no tratamento de água por apresentar atividades coagulante reduzindo a turbidez da água e antimicrobiana, diminuindo o número de colônias bacterianas presentes na água. WSMoL é um bioinseticida por apresentar atividade larvicida e ovicida contra *Aedes aegypti* e larvicida contra *Anagasta kuehniella* apresentando a capacidade de se ligar à matriz peritrófica do intestino do inseto causando um considerável desequilíbrio no metabolismo do mesmo (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2009). Araújo e colaboradores (2013) reportaram que WSMoL não é citotóxica para células mononucleares de sangue periférico humano, não apresenta atividade hemolítica e apresenta atividade antiinflamatória pela regulação dos níveis de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β .

Oliveira e colaboradores em 2016, isolaram uma lectina a partir da torta de sementes (resíduo obtido após a extração do óleo) e a denominaram WSMoLc (do inglês *water soluble Moringa oleifera lectin from cake*). Os autores demonstraram que WSMoLc tem potencial uso para controle do *A. aegypti* devido apresentar efeitos deletérios em larvas (LC₅₀: 0,89 mg/mL) e ovos (EC₅₀:0,14 mg/mL) e também estimular a oviposição pelas fêmeas (0,1mg/mL).

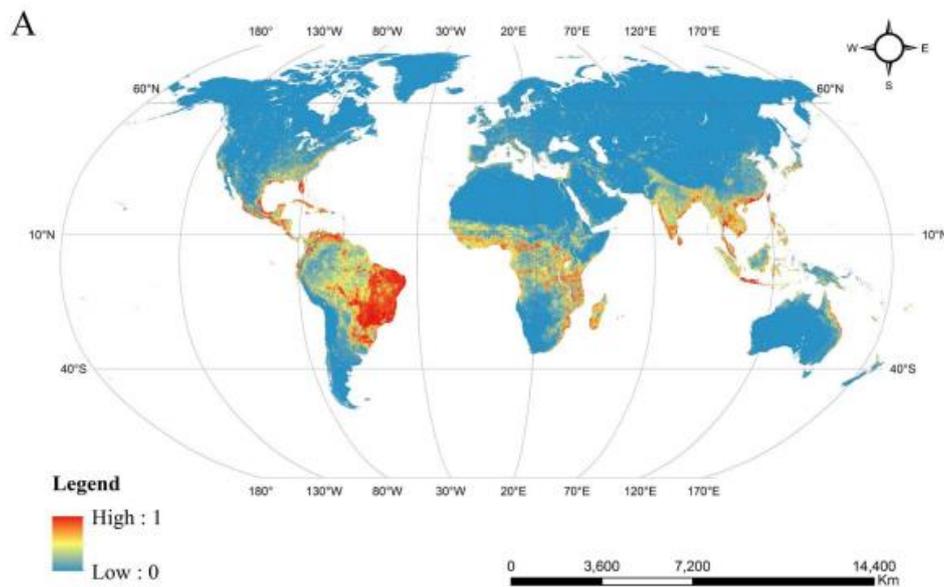
A lectina MoL (do inglês *M. oleifera lectin*) isolada por Katre e colaboradores (2008) é uma glicoproteína de alta estabilidade caracterizada por se apresentar como uma proteína homodimérica de peso molecular 14 kDa constituída por subunidades de 7,1 kDa ligadas por ponte dissulfeto. A atividade hemaglutinante de MoL é inibida por fetuína e tiroglobulina, apresenta uma alta estabilidade na faixa de pH 1 a 12 e até a temperatura de 85°C. MoL apresentou atividade contra células cancerígenas através da modulação da expressão de BAK e gene de expressão de NF κ B (ASADUZZAMAN *et al.*, 2018). Wahid e colaboradores (2017) demonstraram que tanto a lectina MoL quanto a lectina expressa heterologicamente em *Pichia pastoris* foram capazes de diminuir a turbidez de soluções aquosas de caolin a 1% e a 0,1%.

2.4 O MOSQUITO *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* pertencente à família Culicidae, é um inseto cosmopolita e considerado perigoso devido a sua habilidade de transmitir doenças mortais, a sua ampla distribuição nos centros urbanos (Figura 5), especialmente em países de clima tropical e subtropical está relacionada com o número crescente de casos de arboviroses como dengue, chikungunya, febre amarela e zika (WHO, 2017; SMITH *et al.*, 2016). São mosquitos de voo

baixo cujas fêmeas se alimentam de sangue humano, geralmente picando na região de panturrilhas e tornozelos (SPIELMAN; D'ANTONIO, 2001; HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001). Devido à ampla distribuição global desse mosquito, e seu desenvolvimento nos centros urbanos, ele representa um risco à saúde humana e controlar a população desse inseto é uma forma importante de diminuir a transmissão dessas doenças (SMITH; KASAI; SCOTT, 2016).

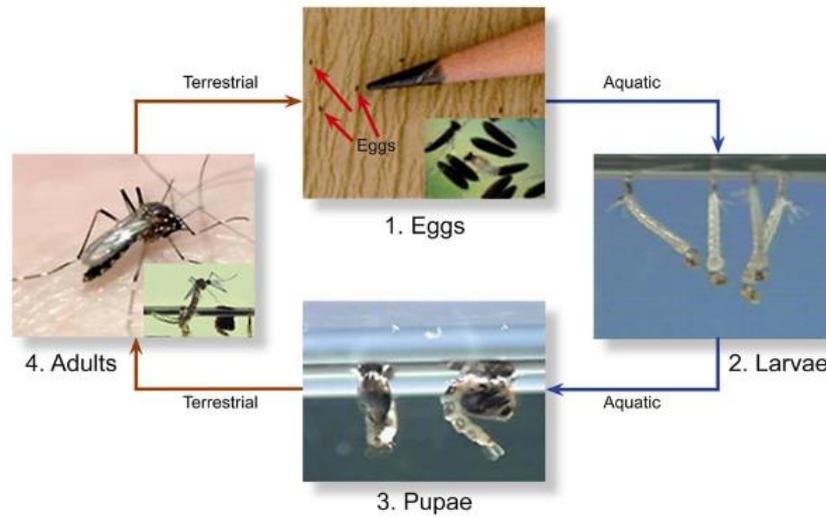
Figura 5 - Distribuição geográfica das populações de *Aedes aegypti*



Fonte: DING, *et al.* (2018).

A duração do ciclo de vida do mosquito pode variar de 10 dias a 3 semanas dependendo das condições climáticas, variações de temperatura, disponibilidade de recursos para a sua alimentação. O ciclo biológico do inseto compreende 4 estágios (Figura 6) que são ovo, larva, pupa e inseto adulto, dos quais apresentam duas fases, a fase aquática, que compreende os estágios de ovo até pupa e a fase terrestre, que é representado pelo inseto adulto, sendo as estratégias de controle do mosquito em sua fase aquática as mais utilizadas rotineiramente (REIS *et al.*, 2017).

Figura 6 - Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: Urdaneta-Marquez e Failloux (2011).

A principal forma de evitar novos casos é o uso de técnicas que possam controlar a população desse vetor, porém nem sempre essas técnicas são efetivas, devido a poluição ambiental e alto custo econômico (FLORENTINO *et al.*, 2014). A proteção pessoal é feita através do uso de repelentes contra esses insetos hematófagos, sendo a substância mais utilizada o N,N-dietil-toluamida (DEET), que apresentam efeitos locais no sistema nervoso do inseto, desempenhando efeitos deterrentes. Contudo, os repelentes apresentam proteção por tempo limitado, estão relacionados com irritações e intoxicações e muitos artrópodes conseguem desenvolver resistência aos mesmos (SAAVEDRA, 2018; BRATTACHERJEE *et al.*, 2005; ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY, 1980).

Os principais grupos químicos utilizados para controlar a população de *A. aegypti* são os organofosfatos, mais requeridos para tratamentos por aspersão e controle de larvas, e os carbamatos, organoclorados e piretróides (permetrina, deltametrina, cipermetrina e ciflutrina) que são comumente usados para tratamentos de redes que combatem os insetos adultos (WHO, 2016; BALDACCHINO, 2015; DAVID *et al.*, 2013; VAN DEN BERG *et al.*, 2012). O uso prolongado de inseticidas químicos, além de causar grande poluição, levou ao surgimento de populações resistentes e uma nova estratégia tem sido a utilização de bioinseticidas (WANG *et al.*, 2013; READ *et al.*, 2009). O uso de pesticidas derivados de plantas aumentou nas últimas décadas porque estes não deixam resíduos poluentes no ambiente, conseqüentemente tornando tais pesticidas alternativas sustentáveis para o controle desses vetores (BENELLI, 2016).

Estudos recentes demonstram o potencial inseticida de vários produtos extraídos de plantas. Em 2017, Ghramh e colaboradores concluíram que extrato de folhas de

Chrysanthemum prejudica o quarto estágio larval do mosquito e que este extrato enriquecido de nanopartículas de prata pode apresentar um potencial ainda maior em relação ao extrato não enriquecido. Santos e colaboradores (2017) descreveram atividades larvicidas e deterrentes do óleo essencial de sementes de *Syagrus coronata* e as relacionou aos ácidos graxos majoritários (decanóico, dodecanóico e octanóico) presentes no óleo.

2.5 DERMATOFITOSSES

Dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporium*, e *Epidermophyton* que infectam tecidos queratinizados. Os dermatófitos podem ser classificados em antropofílicos, geofílicos e zoofílicos, quando se leva em consideração o seu sítio primário de habitat. Para as doenças causadas por esses fungos se estabelecerem, existe a necessidade de alguns fatores como deficiência nas defesas do hospedeiro, virulência, sítio de infecção e fatores ambientais. A infecção causa resposta imune humoral e também resposta celular, caracterizadas, principalmente por uma reação de hipersensibilidade tardia (CHEN; CHIU, 2003; ALY; BERGER, 1996).

Estima-se que infecções causadas por dermatófitos afetam 40% da população e cerca de 30% dos casos diagnosticados das infecções fúngicas afetam pele e mucosas (KASZUBA *et al.*, 1998; EVANS, 1998). As dermatofitoses infectam crianças e adultos onde, nas crianças, os fungos infectam principalmente o couro cabeludo e em nos adultos infectam a pele glabra e unhas (MAZÓN, 1997).

A instalação do fungo dermatófito se inicia quando um fragmento de hifa é inoculado na pele favorecido por algum tipo de lesão preexistente. O processo invasivo se dá por meio de forças mecânicas bem como pelo auxílio de enzimas proteolíticas que tem afinidade por colágeno, elastina, queratina, hemoglobinas e albuminas, bem como fosfolipases que têm a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos de membrana (SIMPANYA, 2000; CANDIDO *et al.*, 1998; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; TSUBOI; TAKAMORI; OGAWA, 1989).

No Brasil, a distribuição dessas micoses é ampla, porém com agentes etiológicos distintos; nas regiões Sul e Sudeste há prevalência das doenças causadas por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*, enquanto na região Nordeste, o principal agente infectante é o *T. tonsurans* desde que o mesmo adaptou-se às condições climáticas caracterizadas por clima seco e umidade relativa baixa (CALADO, 2005; CHIMELLI *et al.*, 2003, REIS *et al.*, 1992).

2.5.1 *Trichophyton tonsurans*

O *T. tonsurans* é um tipo de fungo dermatófito de ampla distribuição geográfica também classificado como antropofílico. Essa espécie geralmente é o agente etiológico da tinea capitis (identificado pela causa de vários surtos), tinea corporis, tinea pedis e tinea unguium (Figura 7). Esse fungo pode se instalar no couro cabeludo e sua intensa esporulação pode causar a quebra da haste do fio de cabelo próximo ao couro cabeludo. Esse fenômeno resulta no aspecto clínico denominado “fundo-preto” caracterizado por um fundo liso e calvo (EL FARI *et al.*, 2000; GUPTA & SEMMERBELL, 1998; PADHYE & WITZMAN, 1998; HRADIL *et al.*, 1995; KWON-CHUNG & BENNETT; 1992).

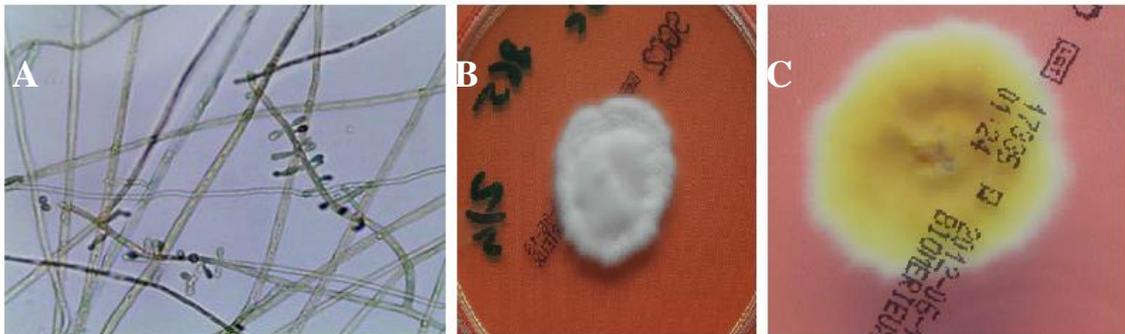
Figura 7 - Tineas - A: corporis; B: pedis, C: unguium; D: capitis.



A microscopia óptica mostra que *T. tonsurans* apresenta numerosos microconídios dispostos em acládio e de formas variadas (Figura 8 A). Em Ágar-Sabouraud-dextrose as colônias de *T. tonsurans* se mostram com cor e textura diferentes (Figura 8 B e C) necessitando assim de análise microscópica para determinar a comprovação de um isolado

clínico, o que leva certo tempo devido ao fato de algumas amostras clínicas apresentarem características morfológicas atípicas (ALMEIDA, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2006).

Figura 8 - *Trichophyton tonsurans* (A) e culturas de *T. tonsurans* em Agar-sabourau-dextrose (B e C).



As drogas rotineiramente utilizadas na prática médica para tratar essas dermatofitoses são cetoconazol, fluconazol, e itraconazol (FULLER *et al.*, 2014; SARABI; KHACHEMOUNE, 2007). Muitas das drogas antimicóticas disponíveis para consumo têm caído em desuso devido a fatores como baixa potência, baixa solubilidade, desenvolvimento de resistência e toxicidade, muitas vezes causando distúrbios gastrointestinais, o que leva à intensa procura por drogas alternativas que não apresentem esses efeitos (SHARMA *et al.*, 2011). Em 2014, Gozubuyuk e colaboradores concluíram que preparações de *Lawsonia inermis* foram capazes de inibir o crescimento de fungos dermatófitos, incluindo o *T. tonsurans*. O dragon's blood (seiva vermelha) extraído de *Croton urucurana* também foi eficaz em inibir o crescimento de *T. tonsurans* apresentando uma concentração mínima inibitória (CMI) de 1,25 mg/mL (LUILMA *et al.*, 2005).

3 ARTIGO 1: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO FIXO E FRAÇÃO PROTEICA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

Caio César da Silva Guedes, Daniela Maria Buonafina, Ana Patrícia Silva de Oliveira, Suyana Karolyne Lino da Rocha, Jéssica da Silva Nascimento, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Rejane Pereira Neves, Thiago Henrique Napoleão, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, Patrícia Maria Guedes Paiva

INTRODUÇÃO

Mosquitos são capazes de transmitir patógenos que causam doenças graves. O mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) é um mosquito doméstico de hábitos diurnos que se desenvolve preferencialmente em recipientes de armazenamento de água, frascos e pneus de automóvel. Esse mosquito é capaz de transmitir arboviroses como dengue, febre amarela, vírus zika e chikungunya e 40% da população mundial corre risco de ser infectado e desenvolver essas doenças (DOWLATHABAD *et al.*, 2009).

Existe um consenso crescente de que o controle do vetor é essencial para reduzir o surgimento de novos casos de doenças transmitidas pelo *A. aegypti*, enquanto vacinas eficazes ainda não estão disponíveis (REINER *et al.*, 2018). As formas de proteção contra picadas do mosquito incluem limpeza de pátios e jardins para eliminar a água parada, uso de repelentes de mosquitos, roupas de manga comprida, meias, sapatos fechados, telas em janelas, portas e ar condicionado (CDC, 2017). Inseticidas de vários grupos químicos são comumente usados para controlar esses vetores, mas os mosquitos estão evoluindo e desenvolvendo resistência a alguns desses produtos químicos (HOEL *et al.*, 2010).

Dermatófitos são fungos responsáveis por causar doenças conhecidas como dermatofitoses que são caracterizadas pela invasão das estruturas queratinizadas da pele (COSTA-ORLANDI, 2014; WEITZMAN & SUMMERBELL 1995). *Trichophyton tonsurans* é um fungo cosmopolita, porém a sua prevalência é alta no sul da África e na América do Sul e endêmico na América do Norte. É capaz de causar dermatofitoses no homem, sendo responsável por causar a maioria das infecções pediátricas, também sendo frequentemente isolado de portadores assintomáticos (HAVLICKOVA *et al.*, 2008, SEEBACHER *et al.*, 2008). No Brasil, este fungo é o agente etiológico mais encontrado em lesões de tinea capitis

e também é encontrado em lesões de pele que são constantemente expostas ao sol (HAVLICKOVA *et al.*, 2008; BRILHANTE *et al.*, 2004). A infecção ocorre quando as hifas fúngicas crescem e invadem os tecidos digerindo a queratina presente nos tecidos do hospedeiro através da secreção de múltiplas proteases o que pode ser determinante para a prevalência dessa infecção (BALDO *et al.*, 2012; VERMOUT *et al.*, 2008).

A *Moringa oleifera* é uma planta típica de clima tropical, membro da família Moringaceae, com 14 espécies conhecidas (NISHI *et al.*, 2012). Esta planta é conhecida pelo seu alto valor nutricional e suas sementes contém elevado teor proteico além de ser fonte de um óleo comestível rico em ácidos graxos insaturados que já são estudados como alternativa na indústria de biodiesel (AZAD *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2015; MOFIJUR *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2010). Vários autores já descreveram atividades biológicas dessa planta contra *A. aegypti* e microrganismos; a lectina da torta de sementes de *M. oleifera* (WSMoL_c) apresentou atividade larvicida e ovicida contra o mosquito (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e a lectina WSMoL (water soluble *M. oleifera* lectin) apresentou atividade larvicida, estimulou a oviposição das fêmeas e diminuiu a taxa de eclosão de ovos estocados de *A. aegypti* (AGRA-NETO *et al.*, 2014, SANTOS *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2009).

Já foram demonstradas atividades antifúngicas de tecidos dessa planta, exemplo, *Aspergillus spp*; *Fusarium solani*, *Rhizopus sp.* foram sensíveis ao extrato aquoso de sementes (JABEEN *et al.*, 2008). A proteína Mo-CBP₃, isolada de sementes apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum musae* (GIFONI, 2012).

O presente estudo avaliou o efeito do óleo extraído das sementes da planta contra *A. aegypti* bem como a atividade antifúngica do óleo e de proteínas das sementes sobre o dermatófito *T. tonsurans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Sementes de *Moringa oleifera* foram coletadas com autorização (no. 38690) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente. As sementes foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil e a excisata (no. 73,345) está depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (Recife).

A colônia de *A. aegypti* usada nos experimentos pertence à cepa Rockefeller do Laboratório de Ecologia Química da UFPE. Os adultos foram mantidos em gaiolas (30x30x30 cm) e foram alimentados com solução de glicose a 10%. As fêmeas ingeriram sangue de galinha adquirido em fazendas locais e oferecido usando um alimentador artificial. A sala de criação foi mantida a 25 e 27 °C a 75 a 80% de umidade, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro. Ovos de *A. aegypti* foram eclodidos em água destilada em tigelas de plástico na faixa de temperatura de 25°C e 27°C e para alimentação, foi oferecida às larvas ração para gatos (Whiskas®) autoclavada.

As colônias fúngicas foram obtidas do acervo da coleção de culturas da micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da UFPE.

Extração do óleo fixo de sementes de *M. oleifera*

A farinha (10 g) de sementes de *M. oleifera* foi submetida à extração do óleo em aparelho Soxhlet durante 6 h, utilizando como solvente o n-hexano. Em seguida foi realizada rotevaporação para eliminação do solvente.

Esterificação do óleo fixo de sementes de *M. oleifera* e análise no GC-MS e GC

O óleo diluído em clorofórmio deuterado foi adicionado a um balão contendo 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% e agitado vigorosamente por 10 min. A fase orgânica foi separada da solução aquosa de hidróxido de sódio e transferida para 2 mL de água destilada e foi novamente agitada por 10 min, sendo esse procedimento repetido duas vezes. Em seguida a fase orgânica foi separada da solução aquosa e secada utilizando o sulfato de sódio anidro.

A fase orgânica foi filtrada e concentrada com gás nitrogênio a um fluxo de 0,5 L/min e depois submetida a análises por espectrometria de massa combinada com cromatografia gasosa (GC-MS). As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massas Agilent série 5975C MSD™ acoplado a um cromatógrafo a gás Agilent 7890A™ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com uma coluna apolar HP-5 ms (Agilent J & W; espessura de filme 30 mx 0,25 mm di X 0,25 lm). Para cada amostra, 1 µL foi injetado no modo split (20: 1) com a temperatura do injetor ajustada para 250 °C. A temperatura do cromatógrafo foi ajustada a 40°C durante 2 min, depois foi aumentada a uma taxa de 4°C/min até 230°C e depois mantida constante durante 5 min. O fluxo do gás carregador de hélio (He) foi mantido a uma pressão constante de 7,0 psi. As temperaturas MS

Source e quadrupolo foram ajustadas a 230°C e 150°C, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV (no modo EI) com uma velocidade de digitalização de 1,0 scan-s de m/z 35-350. Os compostos foram identificados comparando os seus espectros de massa e índices de retenção lineares (LRI, determinados para os componentes individuais do óleo por co-injeção de uma amostra com uma mistura de hidrocarbonetos lineares C8-C30 nas condições descritas acima, e subsequente aplicação a equação de Van den Dool e Kratz) com amostras de referência autênticas disponíveis em bibliotecas espectrais de massa comercial (MassFinder 4, NIST11 e Wiley Registry™ 9th Edition), integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, EUA).

Utilizou-se uma mistura padrão de de ácidos graxos metil-éster (RM18920 SUPELCO, FAME Mix C8-C22, Supelco Inc., PA, EUA) para identificar ésteres metílicos de ácidos graxos e hidrocarbonetos utilizando o padrão de mistura de hidrocarbonetos lineares C8-C20 (Sigma-Aldrich , São Paulo, Brasil).

A análise quantitativa do óleo esterificado e do óleo não esterificado foi realizada em uma cromatografia gasosa (Thermo TRACE ULTRA, detector FID) equipada com uma coluna apolar HP-5 (Agilent J & W; 30 mx 0,25 mm di X 0,25 lm de espessura de filme) nas mesmas condições de análise GC-MS. Os componentes do óleo foram quantificados por normalização das áreas de pico de ácidos graxos ou ésteres metílicos de ácidos graxos em relação à área combinada de todos os picos.

Produção da fração proteica a partir da farinha de sementes de *M. oleifera*

A fração proteica da farinha de sementes de *M. oleifera* foi preparada segundo o procedimento definido por Coelho *et al.* (2009). Resumidamente, as proteínas da farinha (10 g) das sementes foram extraídas com água destilada (100 mL) por 16 h, a temperatura de 4°C utilizando agitação magnética. Em seguida, a mistura foi filtrada e centrifugada (9000g por 5 min a 4°C) e o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato. As proteínas do extrato foram precipitadas com sulfato de amônio a 60% saturação de acordo com Green e Hughes (1955). A fração proteica foi coletada por centrifugação (9000g por 5 min, 4°C) dialisada em água destilada por 4 h com duas trocas de líquido.

Estimativa da concentração de proteínas

A quantificação proteica foi realizada de acordo com Lowry *et al.* (1951) utilizando curva padrão (31,25 a 500 µg/mL) de albumina sérica bovina (BSA).

Determinação de atividade hemaglutinante

Eritrócitos de coelho foram coletados conforme autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (processo 23076.033782/2015-70) e tratados com glutaraldeído. A atividade hemaglutinante (AH) foi determinada em placas de microtitulação (96 poços) onde foram colocados 50 µL de NaCl 0,15 M em cada poço da placa para, em seguida, se adicionar ao segundo poço 50 µL da amostra a ser avaliada. Após a diluição serial, 50 µL da suspensão de eritrócitos (2,5 % v/v) foram adicionados em todos os poços. A AH correspondeu ao inverso da maior diluição (título⁻¹) na qual ainda se observou a aglutinação total dos eritrócitos.

Bioensaios com *Aedes aegypti*

Bioensaio de desenvolvimento larval

Larvas de *A. aegypti* (70) no primeiro estágio (L1), recém eclodidas foram incubadas em 25 mL de uma solução (50 ppm) do óleo em tween 80 (0,2% v/v) ou com solução de tween 80 0,2 % (controle). O ensaio foi realizado a 25°C e ração para gato (WhiskasR) foi adicionada (0,5 g) durante 7 dias. O crescimento das larvas foi avaliado por medição em lupa sempre que as larvas do controle mudavam para o próximo estágio evolutivo.

Atividade larvicida

A atividade larvicida foi determinada de acordo com uma adaptação do método de Organização Mundial de Saúde descrito por Navarro *et al.* (2003) usando 20 larvas (estágios 1, 2 e 4) e 20 mL da solução (10 a 280 ppm) do óleo em Tween 80 (0,2%, v/v). Tween 80 0,2% (v/v) em água destilada foi utilizada como controle. O índice de mortalidade (%) foi determinado após 48 h de incubação a 25 °C e com um período de 12:12 de fotoperíodo claro/escuro, sendo consideradas mortas as larvas que não conseguiram alcançar a superfície ou não responderam a estímulo mecânico.

Ensaio de oviposição

Fêmeas grávidas (10) de *A. aegypti* foram colocadas na gaiola de ensaio (33x21x30 cm) contendo dois recipientes de vidro (10 cm diâmetro), cada um contendo 50 mL de água destilada, colocados em cantos diagonais opostos da gaiola. Uma alíquota (1 mL) da solução (50 ppm) do óleo em Tween 80 (0,2% v/v em água destilada) foi adicionado a um dos recipientes de vidro enquanto quantidade equivalente de Tween 80 foi adicionada no segundo recipiente (controle). Um pedaço de papel filtro foi colocado na superfície interna de cada recipiente para servir como suporte para a oviposição. Os insetos foram mantidos a $27 \pm 0,5$ °C com $73 \pm 0,4\%$ de umidade relativa por 14 h no escuro e em seguida o número de ovos em cada um dos papéis filtro foi determinado. Oito experimentos independentes foram realizados em duplicata e os dados foram analisados pelo teste t-Student, no qual foram obtidos valores de $p < 0,05$ para representar diferenças significativas entre os valores médios.

Atividade antifúngica

O método utilizado seguiu as condições descritas nos documentos M27-A3 (CLSI, 2008), M27-S4 (2012) e M38-A2 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol/L; Sigma-Aldrich), esterilizado em membranas de 0,22 mm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O óleo fixo de sementes de *M. oleifera* e fração proteica foram diluídos em DMSO para obter concentrações de 1024 a 1 µg/mL e o agente antifúngico padrão cetoconazol (Sigma-Aldrich®) diluído em DMSO foi utilizado nas concentrações de 16 a 0,03 a µg/mL.

Isolados de fungos filamentosos, foram repicados em meio de cultura ágar Batata dextrose (BDA) em tubos e incubados de cinco a dez dias a 35 °C. Solução salina a 0,85% esterilizada contendo Tween 20 foi então adicionada (3 mL) às colônias fúngicas para facilitar a dispersão dos esporos e em seguida a suspensão foi homogeneizada com uma pipeta e transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após um período (5 min) de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado que foi agitado por 15 seg em vórtex. A densidade da suspensão foi ajustada utilizando espectrofotômetro a 530 nm para obter uma transmitância de 65 a 70%. Em seguida, as suspensões foram diluídas (1:50) em RPMI 1640, obtendo-se uma concentração final aproximada de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL.

Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), nas quais foram dispostos 100 µL de cada uma das diluições das preparações a serem testadas nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 µL de meio RPMI

1640 foram distribuídos nas colunas de 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 µL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por até 96 h para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento em relação as CIMs de cetoconazol para inibir 50 a 100% do crescimento do fungo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Breakpoints para fungos filamentosos dermatófitos, ocorre de 50 a 80% frente ao cetoconazol e 80 a 100%, ao itraconazol, ambos entre as concentrações de 0,03 a 16 µg/mL.

Teste de sensibilidade antifúngica utilizando o método tabuleiro de xadrez

Combinações de óleo fixo e fração proteica de sementes de *M. oleifera* foram testados em duplicata utilizando o método descrito pelo CLSI. O inóculo inicial foi preparado como descrito para a teste de sensibilidade antifúngica e as leituras foram determinadas visualmente após 48 e 72 h. A concentração inibitória fracionada (CIF) foi calculada para cada combinação de óleo fixo e fração usando o método de diluição *checkerboard* (LEWIS *et al.*, 2002; PFALLER *et al.*, 1989). A CIF foi calculada para cada preparação dividindo a concentração da mesma presente na CMI da combinação pela CMI da preparação. Em seguida, o valor do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado pela soma dos valores de CIF das preparações. Valores de $ICIF \leq 0,5$ indica sinergismo, $0,5 < ICIF \leq 1$ indica efeito aditivo, $1 < ICIF \leq 2$ indica nenhum efeito e $ICIF > 2$ indica efeito antagônico (ODDS, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização e quantificação dos ácidos graxos presentes no óleo fixo de sementes de *M. oleifera*

Para a análise de ácidos graxos por cromatografia a gás, é necessário aplicar procedimentos de esterificação para converter os ácidos graxos em compostos mais voláteis, tais como ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Após as etapas de esterificação, identificação do perfil de ácidos graxos por GC-MS e quantificação dos constituintes (FID) foi identificado que o óleo possui ácidos graxos saturados e insaturados (Tabela 1).

O ácido oleico (C18:1) foi o composto majoritário, representando 66% da constituição total de ácidos graxos do óleo, seguido pelos ácidos palmítico (C16:0), elaídico

(C18:1) e beénico (C22:0) representando 9,25%, 9,06% e 5,20%, respectivamente. O óleo de *M. oleifera* pode ser classificado como rico em ácido oleico quando comparado a outros óleos usados convencionalmente como por exemplo, os óleos de soja, palma e de girrasol que contem 23%, 39% e 24,9% desse ácido graxo, respectivamente. Óleos com alto teor de ácido oleico, embora geneticamente difíceis de reproduzir, recentemente estão ganhando importância devida grande estabilidade e benefícios nutricionais (LEONE *et al.*, 2016; AZAD *et al.*, 2015).

O perfil de ácidos graxos do óleo de sementes de *M. oleifera* utilizado nesse estudo foi similar ao perfil de ácidos graxos de óleos fixos extraídos de *M. oleifera*. Silva e colaboradores (2010) revelaram que o óleo fixo extraído das vagens de *M. oleifera* continha ácido oleico (78%) e o ácido palmítico (7%) como compostos majoritários. Vaknin e Mishal (2018) caracterizaram o óleo das sementes da planta cultivada em regiões mediterrâneas e também identificaram que o ácido oleico representava cerca de 78% da constituição de ácidos graxos totais, seguido de outros ácidos graxos de cadeia curtas e longas, como por exemplo o ácido palmítico, esteárico e beénico que representaram 6,38%, 5,61% e 5,45%, respectivamente. Zhong e colaboradores (2018) avaliaram óleos de sementes de *M. oleifera* extraídos por extração convencional, MAE (*microwave-assisted solvent extraction*) e UAE (*ultrasound-assisted solvent extraction*) e determinaram que os óleos obtidos por todas elas continham cerca de 68% de ácido oleico e 7% de ácido palmítico.

Fatores ambientais (físicos ou químicos) presentes no cultivo da *M. oleifera* podem interferir na composição e concentração de ácidos graxos presentes no óleo fixo. Anwar e Bhangar (2003) compararam a composição de ácidos graxos do óleo de sementes proveniente do Paquistão com aquela do óleo de sementes do Quênia reportado por Tsakinis e colaboradores (1999). O óleo paquistanês não continha ácido caprílico (C8:0), ácido mirístico (C14:0), ácido linolênico (C18:3), ácido eicosanóico (C22:1) e ácido cerótico (C26:0) que estavam presentes em baixas concentrações no óleo queniano.

Tabela 1 - Caracterização (GC-MS) e quantificação (FID) dos ácidos graxos presentes no óleo fixo de sementes de *Moringa oleifera* após esterificação

Compostos	Nome usual	% ± SD
Ácido hexadecanóico	Palmitico	9,25 ± 0,72
(Z)-9-Ácido octadecanóico	Oleico	66,00 ± 19,23
(E)-9-Ácido octadecanóico	Elaidico	9,06 ± 6,55
Ácido octadecanóico	Estearico	0,56 ± 0,56
cis-11-ácido eicosanóico	-	4,01 ± 3,93

Ácido eicosanóico	Araquídico	4,47 ± 4,40
Ácido docosanóico	Beénico	5,20 ± 5,22
Total		98,55

Atividade larvicida do óleo de sementes de *M. oleifera*

O óleo não foi larvicida sobre larvas L1, uma vez que a taxa de mortalidade larval após 48 h (Tabela 2) nas concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 ppm foram similares aquelas do controle. As larvas L2 (Figura 1 B) foram mais sensíveis ao óleo que as L1, sendo detectada taxas de mortalidade de 15, 35, 30, 25 e 45% nas concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 ppm, respectivamente. Nenhuma mortalidade foi detectada em larvas L4. Perumalsamy *et al.* (2015) revelaram que os ácidos oleico e palmítico são capazes de agir sobre a acetilcolinesterase de larvas e que o grau de saturação, o comprimento da cadeia lateral e o isomerismo geométrico dos ácidos graxos, onde estes fatores são responsáveis pela mortalidade das larvas.

Tabela 2 - Taxa de mortalidade do óleo fixo de sementes de *M. oleifera* com larvas de *A. aegypti* em estágios L1 e L2.

Concentração (ppm)	L1 (%)	L2 (%)
50	0	15
75	0	35
100	0	30
150	0	25
200	0	45

Estudos já demonstraram o potencial larvicida dos ácidos graxos. Rahuman *et al.* (2008) reportaram que o ácido oleico proveniente do extrato de éter de petróleo de *Citrullus colocynthis* apresentou atividade larvicida sobre L4 de *A. aegypti* (CL₅₀ 8,80 e CL₉₀ de 35,39 ppm), *Anopheles stephensi* (CL₅₀ 9,79 e CL₉₀ de 37,42 ppm) e *Culex quinquefasciatus* (CL₅₀ de 7,66 e CL₉₀ de 30,71 ppm). O óleo de sementes de *M. oleifera* avaliado neste estudo, embora contendo ácido oleico como composto majoritário não apresentou nenhuma toxicidade para L4 de *Aedes aegypti*. Spinndola e colaboradores (2016) reportaram que o extrato metanólico de flor de *Dendranthema grandiflorum* que tinha em sua constituição ácidos graxos (principalmente o ácido palmítico), flavonoide e fenilpropanoides, apresentou atividade larvicida contra L3 de *A. aegypti* com CL₅₀ de 5,02, CL₉₅ de 14,55 e CL₉₉ de 18,50

ppm. Rahuman (2000) reportou que extrato acetônicos de folhas de *Feronia limonia*, contendo o ácido palmítico como composto majoritário, foi larvicida sobre L4 de *A. aegypti* e que maior eficiência larvicida (CL₅₀ de 53,27ppm) foi detectada quando o ácido palmítico foi testado isoladamente. O espilantol e ácido palmítico foram os principais constituintes do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* que também apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2018). Esta diferença na atividade larvicida na presença do óleo pode ser devida a uma cepa mais resistente em nossos laboratórios, o que foi também observado por Spindola *et al.* (2016), que reportaram óleos contendo flavonóides e ácidos graxos (ácidos palmítico e linoleico) que mostraram baixa eficiência larvicida.

Efeito do óleo de sementes de *M. oleifera* no desenvolvimento larval

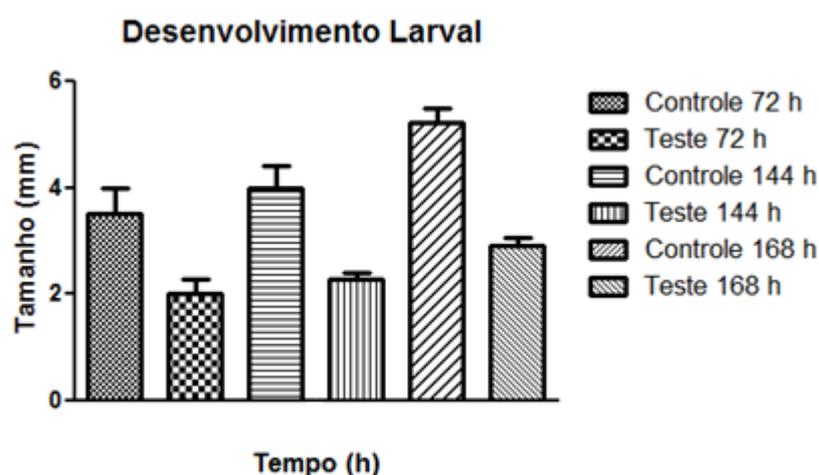
O ensaio de atividade larvicida em L1 na concentração de 50 ppm foi escolhido para avaliar o efeito do óleo no desenvolvimento larval. Após 72 h, as larvas incubadas com o óleo ainda estavam no estágio L1, com uma média de tamanho de 2,2mm (Figura 1A) enquanto aquelas do controle eram larvas L2 com uma média de tamanho de 3,5 mm. As larvas de L1 foram testadas com a presença e ausência de ração. Em ambos os casos, a larva apresentou desenvolvimento alterado.

O teste seguiu as mesmas condições com reposição do volume de solução, tanto no controle quanto no teste. As larvas foram observadas após 144 h. Após todo este tempo, observou-se que as larvas do controle estavam no estágio L3 com uma média de tamanho de 4 mm, enquanto aquelas tratadas com o óleo persistiam no estágio L1, com uma média de tamanho de 2,3 mm (Figura 1B). A próxima mudança de estágio foi detectada após 168 h do experimento, sendo larvas L4 com uma média de tamanho de 5,24 mm encontradas no controle, enquanto aquelas no ensaio teste foram observadas larvas L1, L2 e raras L3 (cerca de 1 ou 2 larvas neste estágio), com uma média de tamanho de 2,92 mm (Figura 1C). As figuras 1 e 2 representam a comparação entre as médias de tamanho das larvas de *Aedes aegypti* do controle e do teste para cada dia no qual foi identificado a troca de estágio larval.

Figura 1 - Aspectos de larvas provenientes do ensaio de desenvolvimento larval na presença do óleo fixo de sementes de *Moringa oleifera* após 72 (A), 144 (B) e 168 h (C) de incubação.



Figura 2 - Desenvolvimento larval de *A. aegypti* incubado com o óleo fixo de sementes de *M. oleifera*



Os resultados do presente estudo demonstram que o óleo fixo de sementes de *M. oleifera* a 50 ppm foi eficiente em retardar o desenvolvimento larval embora alteração na morfologia larval não foi observada. Os resultados indicam o efeito inibidor da metamorfose do óleo que pode ser devido a uma perturbação do controle hormonal, interferência na síntese de quitina durante o processo de muda e metamorfose do inseto ou efeito na alimentação da larva, uma vez que as larvas tratadas dispunham de alimentação igual aquela ofertada para as larvas sem tratamento. O presente estudo traz pela primeira vez o relato de um óleo rico em ácidos graxos com atividade retardatória no ciclo evolutivo do inseto *A. aegypti*.

Soonwera e Phasomkusolsil (2016) reportaram que óleos extraídos de duas plantas medicinais, *Cymbopogon citratus* e *Syzygium aromaticum* apresentaram-se extremamente tóxicos para os estágios de larva, pupa e adultos de *A. aegypti*. Os óleos foram capazes de causar severas mudanças morfológicas nos estágios indicados. Mas os autores não realizaram identificação dos compostos que faziam parte do óleo extraído.

Extratos vegetais que interferiram no desenvolvimento de *A. aegypti* têm sido descritos. Rajasekaran e Duraikannan (2012) detectaram que a combinação de extratos (1:1) de éter de petróleo de *Tridax procumbens*, *Datura stramonium* e *Lantana camara* retardou em 60% a metamorfose de larvas L4 de *A. aegypti* para o estágio de pupa e concluíram ser isto devido a presença de metabólitos secundários. Extrato diclorometano de *Dalbergia oliveri* retardou a transformação do estágio de pupa de *A. aegypti* para inseto adulto (PLUEMPANUPAT *et al.*, 2013). O extrato metanólico de *S. binderi* rico em alcaloides, saponinas, esteroides e terpenoides também foi eficaz em prolongar o estágio larval das larvas de *A. aegypti*, por cerca de um dia e meio, quando comparado com o controle, além de inibir quase 99% da emergência de insetos. Esse extrato também foi capaz de causar alterações no intestino médio das larvas onde as células intestinais apresentavam vários vacúolos de diferentes tamanhos, além de perda de vilosidades (YU *et al.*, 2015).

Extratos que afetam diferentes estágios do ciclo de vida de *A. aegypti* tem sido reportados. O extrato etanólico de sementes de *Seseli diffusum* apresentou atividade larvicida (CL₅₀ de 112,53 ppm após 24 h) sobre larvas L4 e na concentração de 100 ppm foi capaz de alterar morfológicamente as larvas após 48 hs de exposição (KABIR *et al.*, 2013). Devi e Bora (2017) demonstraram que o extrato fenólico de *Z. jujuba* foi larvicida sobre L4 (CL₅₀ de 41,45 ppm), inibiu a emergência bem como alterou a prole dos insetos que conseguiram emergir, por causar a morte de pupas e insetos adultos. Os autores também revelaram que o extrato afetou a bioquímica do inseto aumentando o nível de proteína e diminuindo o nível de lipídio, glicose e glicogênio.

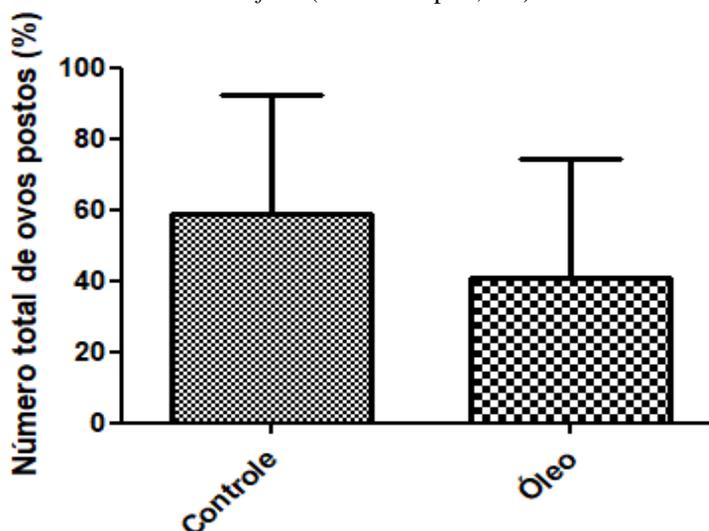
Efeito do óleo de sementes de *M. oleifera* na taxa de oviposição

O número de ovos colocados pelas fêmeas grávidas de *A. aegypti* na solução que não continha o óleo correspondeu a 61,04% da oviposição total enquanto a taxa de oviposição na solução contendo o óleo foi de 38,95% da oviposição total (Figura 3). As fêmeas apresentaram certa preferência em pôr os seus ovos no controle mas a diferença não foi significativa ($p > 0,05$) e portanto, os dados do ensaio de oviposição revelam que a fêmea não reconheceu a presença do óleo na solução. O índice de oviposição ativa (OAI) determinado foi -0,2208 mostrando que a amostra não é tem efeito repelente nem atraente, uma vez valores de OAI acima de +0,3 indicam efeito atraente e menores que -0,3 indicam repelência. Similarmente, a investigação do efeito de ésteres de ácidos graxos de longa cadeia (C₂₁) na

oviposição revelou que os mesmos não foram capazes de atrair ou estimular, repelir ou deter (SHARMA *et al.*, 2008).

O potencial repelente de óleos vegetais tem sido reportada. Santos *et al.* (2017) reportaram que o óleo volátil das sementes de *Syagrus coronata* a 50 ppm, contendo os ácido octanóico (40,55%) e ácido dodecanóico (40,48%), apresentou um potencial deterrente com um OAI no valor de -0,35 e que o ácido octanóico desempenhou atividade deterrente apresentando um OAI de -0,31. O óleo de sementes de *Jatropha curcas* que contem em sua constituição os ácidos linoleico, esteárico e oleico, apresentou atividade deterrente contra insetos da espécie *Callosobrucus maculatus* onde na presença do óleo, as fêmeas depositaram menos de 10% dos ovos, quando comparado com o controle (ADEBOWALE & ADEDIRE, 2006). O óleo de Neem, na concentração de 200 ppm, foi deterrente contra fêmeas grávidas de *Aedes albopictus* (BENELLI *et al.*, 2015). Ácidos graxos insaturados contendo de 16 a 26 carbonos na sua cadeia de cadeia provocaram atividade de índice de oviposição negativo quando testados contra *Cx. quinquefasciatus* em concentrações de 10⁻⁴ M (HWANG *et al.*, 1984).

Figura 9 - Oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* na ausência e na presença do óleo fixo de sementes de *M. oleifera* (valores de $p > 0,005$).



Efeito do óleo fixo, fração proteica e do uso combinado das duas preparações no crescimento de *T. tonsurans*

Os testes de sensibilidade de antifúngicos *in vitro* são utilizados para avaliar o seu potencial terapêutico, comprovar a sensibilidade do fungo frente aos antifúngicos e obter informações para o controle da terapia antifúngica, sendo capazes de prever uma resposta

clínica ou falha terapêutica para o resultado de um tratamento (REX *et al.*, 2001; HOSPENTHAL *et al.*, 2004). O presente estudo investigou a sensibilidade de uma linhagem do fungo dermatófito *T. tonsurans* ao óleo, fração proteica e ao uso combinado das duas preparações.

O óleo fixo e fração proteica foram agentes antifúngicos para *T. tonsurans*, sendo para ambos a CMI de 1024 µg/mL determinada após 72 h de incubação. Atividade antifúngica tem sido reportada para preparações de diferentes tecidos de *M. oleifera*. Chuang *et al.* (2007) utilizando o óleo essencial de folhas de *M. oleifera* revelaram a atividade antifúngica do mesmo contra os dermatófitos *Trichophyton rubrum* (CMI de 1,6 µg/mL), *Trichophyton mentagrophytes* (CMI de 0,8 µg/mL), *Epidermophyton floccosum* (CMI de 0,2 µg/mL) e *Microsporum canis* (CMI de 0,4 µg/mL). Os autores também mostraram que quando uma fração oxigenada do óleo essencial foi utilizada houve aumento da eficiência antifúngica. Gifoni *et al.* (2012) mostraram que a proteína ligadora de quitina isolada das sementes de *M. oleifera* tem atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum musae*.

Atividade antifúngica de proteínas de origem vegetal tem sido relacionada a dano na parede celular, alteração na morfologia celular e estresse oxidativo (SOLANKI *et al.*, 2018; PROCÓPIO *et al.*, 2017; PATRIOTA *et al.*, 2016). A atividade a fração proteica, pode estar relacionada, como as lectinas presentes em sua composição, uma vez que a amostra apresentou uma atividade hemaglutinante de 8192^{-1} e atividade hemaglutinante específica de 113,24. Lectinas antifúngicas tem sido descritas incluindo a lectina isolada da sarcotesta de *Punica granatum* ativa contra *Candida albicans* e *Candida krusei*, a lectina de *Amaranthus viridis* ativa contra *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* e a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* que inibiu o crescimento micelial de *Valsa Mali* (SILVA *et al.*, 2018; KAUR *et al.*, 2006; ANG, 2014). Lectinas podem interferir no crescimento fúngico por causarem injúrias na membrana celular, impedindo a deposição de quitina e assim inibindo a divisão celular (SANTOS *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2010).

Atividade antibacteriana e antifúngica tem sido reportada para alguns dos ácidos graxos presentes no óleo de *M. oleifera*. Extrato de folhas de *Excoecaria agallocha* contendo os ácidos graxos palmítico, láurico e linolênico apresentou atividade antimicrobiana contra 7 espécies de bactéria e 3 espécies de *Candida* (AGORAMOORTHY *et al.*, 2007). Seidel *et al.* (2004) mostraram que o ácido graxo oleico isolado a partir de extrato de raiz de *Pelargonium sidoides* foi antibacteriano contra *Mycobacterium phlei* (CMI de 16 mg/L). Walters *et al.* (2004) reportaram que o ácido oleico na concentração de 1000 µM inibiu o crescimento

micelial de *Pythium ultimum* e *Candida perniciosa* em 63% e 35%, respectivamente, enquanto inibição total do crescimento dos fungos foi detectado quando esse ácido foi colocado em meio de cultura líquido.

Estudos revelam múltiplos mecanismos para a atividade antifúngica de ácidos graxos. Ácidos graxos de cadeia longa, incluindo o ácido oleico e linoleico, associados com lisados de macrófagos foram letais para *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e foi sugerido que a morte do microrganismo foi resultante de uma ação detergente (KONDO & KANAI, 1977; KONDO & KANAI, 1976). Os autores também mostraram que a esterificação desses ácidos graxos, aboliu a a atividade anti-Mycobacteria revelando a necessidade do grupo carboximetil para a atividade ser desempenhada. O ácido palmítico (ácido 2-hexadecínico) inibiu o alongamento de ácidos graxos saturados e insaturados bem como a síntese de triacilglicerol, indicando que a inibição da biossíntese de ácidos graxos é outro mecanismo responsável pela atividade antifúngica dos ácidos graxos (WOOD *et al.*, 1981). Bergsson *et al.* (2001) investigaram como cepas de *Candida albicans* se comportariam quando tratadas com ácidos graxos e constataram que os ácidos cáprico e laurico foram efetivos em matar as células fúngicas devido promoverem desordens citoplasmáticas que alteraram o seu equilíbrio hidrostático. Um mecanismo similar foi reportado por Avis & Bélanger (2001) para a atividade antifúngica do ácido cis-9-heptadecenóico contra *Phytophthora infestan* e *Pythium aphanidermatum*.

O estudo de interação *in vitro* entre moléculas com atividade antimicrobiana é realizado por vários modelos experimentais que permitem mensurar o efeito combinado de drogas. O método *checkerboard* por fornecer arranjos bidimensionais de diferentes concentrações das substâncias avaliadas permite o cálculo do valor do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), e assim determina se o uso associado de drogas aumenta a eficácia das mesmas (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Os benefícios terapêuticos através de combinações sinérgicas podem incluir o aumento na eficácia do efeito terapêutico, diminuição da dosagem da droga resultando em diminuição da toxicidade e efeitos colaterais (CHOU, 2006).

Quando o óleo e a fração proteica foram avaliadas conjuntamente, a inibição de 50% do crescimento do fungo foi detectada na concentração de 512 µg/mL do óleo e de 8 µg/mL da fração proteica sendo os valores de CIF 0,5 e 0,007, respectivamente. O ICIF foi de 0,507 demonstrando que a fração proteica 0-60% tem efeito aditivo sobre o óleo fixo. O uso combinado de moléculas pode aumentar a eficácia antifúngica devido a ação simultânea em diferentes rotas bioquímicas essenciais para a sobrevivência do microrganismo bem como

pelo aumento da penetração de um agente antifúngico resultante da alteração da permeabilidade da membrana provocada pelo outro antifúngico da combinação (JOHNSON *et al.*, 2004). Adicionalmente, o uso de drogas com mecanismos de ação distintos dificulta o desenvolvimento de resistência às mesmas.

Cetoconazol é a droga comumente utilizada no tratamento de infecções superficiais ou mais profundas causadas por *Trichophyton spp*, no entanto essa droga pode causar algumas efeitos colaterais como, por exemplo, náuseas, dores abdominais, coceira o que limita seu uso terapêutico em muitos casos, por isso é importante o emprego de novas estratégias de tratamento para essas infecções (SUGAR *et al.*, 1987). Estudos demonstraram que o óleo essencial de *Agastache rugosa* bem como aqueles de essenciais de *Allium sativum*, *A. cepa* e *A. fistulosum* apresentaram atividade sinérgica contra espécies de *Trichophyton* quando associado ao cetoconazol (PYUN e SHIN, 2006; SHIN, 2004).

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, K. O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 901, 2006.
- AGORAMOORTHY, G. et al. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 739-742, 2007.
- ANG, A. S. W. et al. Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese pinto beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 672-686, 2014.
- ANWAR, F; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558-6563, 2003.
- AVIS, T. J; BÉLANGER, R. R. Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis-9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 2, p. 956-960, 2001.
- AZAD, A. K. et al. Prospect of Moringa seed oil as a sustainable biodiesel fuel in Australia: A review. **Procedia Engineering**, v. 105, p. 601-606, 2015..
- BALDO A. et al. 2012. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**. 55:218–223.

BENELLI, G. et al. Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. **Parasitology research**, v. 114, n. 1, p. 227-236, 2015.

BERGSSON, G. et al. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3209-3212, 2001.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans*. **International journal of dermatology**, v. 43, n. 8, p. 575-579, 2004.

CDC. Pregnant women <https://www.cdc.gov/zika/pregnancy/protectyourself.html>. Accessed 27 April 2017

CHOU, T. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621-681, 2006.

CHUANG, Ping-Hsien et al. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, v. 98, n. 1, p. 232-236, 2007.

COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

DA SILVA, J. P.V. et al. *Moringa oleifera* oil: studies of characterization and biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1527-1530, 2010.

DA 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.

DE ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* LRK Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 134-140, 2018.

DE LIMA SANTOS, N. D. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.

DE 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, p. 1683-1690, 2016.

- DEVI, U; BORA, D. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 8, p. 787-791, 2017.
- DOWLATHABAD, M. R. et al. Larvicidal activity of essential oils from Indian medicinal plants against *Aedes aegypti* L. **Journal of Pharmacy Research Vol**, v. 2, n. 4, 2009.
- FERNANDES, D. M. et al. *Moringa oleifera*: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. **Fuel**, v. 146, p. 75-80, 2015.
- GIFONI, J. M. et al. A novel chitin- binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 406-415, 2012.
- GRANADOS-ECHEGOYEN, Carlos et al. Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 8, p. 594-601, 2014.
- HAVLICKOVA, B. et al. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, p. 2-15, 2008.
- HOSPENTHAL, D. R. et al. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 153-160, 2004.
- HWANG YS, S. G.W & Mulla M.S. 1984. Structure–activity relationship of unsaturated fatty acids as mosquito ovipositional repellents. **Journal of Chemical Ecology** 10, 145–151.
- JABEEN, R. et al. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. **Pak J Bot**, v. 40, n. 4, p. 1349-1358, 2008.
- JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.
- KABIR, K. E. et al. Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and environmental Safety**, v. 90, p. 52-60, 2013.
- KAMIABI, F. et al.. Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 10, p. 767-775, 2013.
- KARMEGAM, N. et al. Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource technology**, v. 59, n. 2-3, p. 137-140, 1997.
- KAUR, N. et al. A novel antiproliferative and antifungal lectin from *Amaranthus viridis* Linn seeds. **Protein and peptide letters**, v. 13, n. 9, p. 897-905, 2006.
- KONDO, E.; KANAI, K. Further studies on the lethal effect of long-chain fatty acids on mycobacteria. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 29, n. 1, p. 25-37, 1976.

KONDO, E; KANAI, K. The relationship between the chemical structure of fatty acids and their mycobactericidal activity. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 30, n. 4, p. 171-178, 1977.

LEONE A. et al., *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. **Open Access Int. J. Mol. Sci.** **2016**, *17*(12), **2141**.

MCGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 431-433, 2002.

MOFIJUR, M. et al. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of *Moringa oleifera* and Palm oil based biodiesel in a diesel engine. **Industrial crops and products**, v. 53, p. 78-84, 2014.

NISHI, L. et al. Application of hybrid process of coagulation/flocculation and membrane filtration for the removal of protozoan parasites from water. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 148-160, 2012.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

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**, v. 1, p. 396-406, 2010.

PLUEMPANUPAT, S. et al. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 653-658, 2013

POHL, C. H. et al.. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, p. 61-71, 2011.

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

PYUN, M. S.; SHIN, S. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 394-400, 2006.

RAHUMAN, A. A. et al. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 553-555, 2000.

RAJASEKARAN, A; DURAIKANNAN, G. Larvicidal activity of plant extracts on *Aedes Aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1578-S1582, 2012.

- REINER, R. et al. Estimating the impact of city-wide *Aedes aegypti* population control: An observational study in Iquitos, Peru. **bioRxiv**, p. 265751, 2018.
- REX, J. H. et al. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.
- SANTOS, A. F.S. et al. Lectins: important tools for biocontrol of *Fusarium* species. **Fusarium: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention**, Nova Science Publishers Inc., New York, p. 161-175, 2012.
- SANTOS, L. M.M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 100, p. 35-40, 2017.
- SEEBACHER, C. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335-352, 2008.
- SEIDEL, V; TAYLOR, P. W. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 6, p. 613-619, 2004.
- SHIN, S. Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as antifungal agents against *Trichophyton* species. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 3, p. 295-299, 2004.
- SILVA J. P.V. et al., *Moringa oleifera* oil: Studies of characterization and biodiesel production. **biomass and bioenergy** 34 (2010) 1527 e 1530
- SOLANKI, D. S. et al. Purification and characterization of a novel thermostable antifungal protein with chitinase activity from mung bean. **Journal of Environmental Biology**, v. 39, n. 3, p. 406-412, 2018.
- SOONWERA, M; PHASOMKUSOLSIL, S. Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. **Parasitology research**, v. 115, n. 4, p. 1691-1703, 2016.
- SPINDOLA, K. C.V.W. et al. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 342-346, 2016.
- SUGAR, A.M. et al.. Pharmacology and toxicity of high-dose ketoconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31, 1874–1878, 1987.
- TSAKNIS, J. et al. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4495-4499, 1999.
- Tunaz H, Uygun N. Insect growth regulators for insect pest control. **Turk J Agric For.**; 28: 377-387, 2004.
- UQUICHE, E. Recovery and antioxidant activity of extracts from *Leptocarpha rivularis* by supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 257-264, 2016.

VAKNIN, Y; MISHAL, A. The potential of the tropical “miracle tree” *Moringa oleifera* and its desert relative *Moringa peregrina* as edible seed-oil and protein crops under Mediterranean conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 431-437, 2017.

VERMOUT, S. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 166:267–275, 2008

WALTERS, D. et al. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 157, n. 1, p. 87-90, 2004.

WOOD, R.; LEE, T. Metabolism of 2-hexadecynoate and inhibition of fatty acid elongation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 23, p. 12379-12386, 1981.

YU, Ke-Xin et al. Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 12, p. 1006-1012, 2015.

ZHENG, Chang Ji et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS letters**, v. 579, n. 23, p. 5157-5162, 2005.

ZHONG J. et al., The application of ultrasound and microwave to increase oil extraction from *Moringa oleifera* seeds. **Industrial Crops & Products** 120, 1–10, 2018.

4 CONCLUSÕES

O óleo fixo de sementes de *M.oleifera*, extraído com n-hexano usando soxhlet tem alto teor de ácidos graxos e retardou o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti*. Adicionalmente foi revelado que o óleo agiu diferentemente na sobrevivência dos estágios larvais, sendo larvicida apenas para L2 e não interferiu na oviposição de fêmeas grávidas.

O óleo e a fração proteica 0-60% são agentes antifúngicos contra o dermatófito *T. tonsurans* e o uso combinado das duas preparações resulta em aumento da eficiência antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ABD WAHID, M. A. et al. Recombinant protein expression of *Moringa oleifera* lectin in methylotrophic yeast as active coagulant for sustainable high turbid water treatment. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 81, n. 8, p. 1642-1649, 2017.
- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- AHMAD, Moghis U. (Ed.). **Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications**. Elsevier, 2017.
- ALMEIDA, S.R.. Apostila de micologia clínica. **Faculdade Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2009.
- ALY, R; BERGER, T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. **Clinical infectious diseases**, v. 22, n. Supplement_2, p. S128-S132, 1996.
- AL-ASMARI, A. K. et al. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0135814, 2015.
- AMAGLO, N. K. et al. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1047-1054, 2010.
- ANWAR, F. et al. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.
- ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013.
- ARAÚJO, R. M. S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARORA, D. S. et al. Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): microbiological perspective. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 1, n. 6, 2013.
- MULUGETA, G.; FEDAKU, A. **Industrial and agricultural potentials of Moringa**. Carbon 45, 2014
- ASADUZZAMAN, A. K. M. et al. *Moringa oleifera* seed lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF- κ B gene expression. **International journal of biological macromolecules**, 2017.
- ASHRAF, F.; GILANI, S. R. Fatty acids in *Moringa oleifera* oil. **Jour. Chem. Soc. Pak**, v. 29, n. 4, 2007.

ATABANI, A. E. et al. A comparative evaluation of physical and chemical properties of biodiesel synthesized from edible and non-edible oils and study on the effect of biodiesel blending. **Energy**, v. 58, p. 296-304, 2013.

AZAD, A. K. et al. Prospect of Moringa seed oil as a sustainable biodiesel fuel in Australia: A review. **Procedia Engineering**, v. 105, p. 601-606, 2015.

AZAM, M. et al.. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass and bioenergy**, v. 29, n. 4, p. 293-302, 2005.

BALDACCHINO, F. et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest management science**, v. 71, n. 11, p. 1471-1485, 2015.

BHARATI, M . Assessment of Insecticide Resistance in Primary Dengue Vector, *Aedes aegypti* (Linn.) From Northern Districts of West Bengal. **Acta tropica**, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.004>.

BHARATI M, S. P, S. D. Variation in Esterase Activity Among Different *Aedes aegypti* L. Populations from the Dooars and Terai Regions of West Bengal, India. **InProceedings of the Zoological Society** 2016: <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0193-8>: 1-9

BENELLI, G. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. **Parasitology research**, v. 115, n. 1, p. 23-34, 2016.

BENITO-ROMÁN, O. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of quinoa oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 139, p. 62-71, 2018.

BERGSSON, G. et al. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3209-3212, 2001.

BERKOVICH, L. et al. *Moringa Oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 212, 2013.

BHUTADA, P. R. et al. Solvent assisted extraction of oil from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 74-80, 2016.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 7, p. 621-630, 2017.

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

BOSCH, O. et al. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, v. 25, n. 3, p. 323-330, 2000.

- CALADO, N. B. **Frequência e etiologia das dermatomicoses em pacientes atendidos no Hospital Giselda Trigueiro, Natal, RN.** 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- CANDIDO, R. C. et al. Fosfolipasa, proteinasa y morfotipos de *Candida albicans* aisladas de vagina y ano. **Rev. chil. cienc. méd. biol**, v. 8, n. 1, p. 25-9, 1998.
- CARBALLEIRA, N. M.; et al. The first total synthesis of (\pm)-4-methoxydecanoic acid: a novel antifungal fatty acid. **Tetrahedron letters**, v. 50, n. 41, p. 5699-5700, 2009.
- CASTRO NETO, H. R. J. Histoquímica com lectinas em diagnósticos de hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático humanos. **Tese de Doutorado, UFPE**, 2008.
- CARNEIRO, A. G. O. L. L. et al. LECTINAS: Onde se Obter, O Que São e Para Que Servem. **Pós em revista**, n. 3, 2011.
- CAVADA, B. S. et al. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N- acetylglucosamine- binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, v. 273, n. 17, p. 3962-3974, 2006.
- CHAROENSIN, S. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 7, p. 318-325, 2014.
- CHAUDHRI, R. D. **Herbal drugs industry, a practical approach to industrial pharmacognosy.** New Delhi: Eastern Publishers xii, 1996.
- CHEENPRACHA, S. et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 17, p. 6598-6602, 2010.
- CHEN, J. et al. Combination of Span 20 and pH-assisted walnut oil extraction during aqueous extraction process. **LWT**, v. 91, p. 477-483, 2018.
- CHEN,H.;CHIU, H. Facial Majocchi's granuloma caused by *Trichophyton tonsurans* in an immunocompetent patient. **Acta dermato-venereologica**, v. 83, n. 1, p. 65-66, 2003.
- CHIKALOVETS, I. V. et al. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 2, p. 503-507, 2015.
- CHIMELLI, P. A. V. et al. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 259-263, 2003.
- CHUANG, P. H. et al. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, v. 98, n. 1, p. 232-236, 2007.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

- COELHO, L. M. et al. In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **J Antimicrob Chemother** 62, 758–761, 2008.
- COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis** v. 11, p. 295-300, 2000.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart.(Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.
- DAVID, Jean-Philippe et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 368, n. 1612, p. 20120429, 2013.
- DIVI, S. M. et al. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* in fructose fed insulin resistant and STZ induced diabetic wistar rats: a comparative study. **Asian J. Pharm. Clin. Res**, v. 5, n. 1, p. 67-72, 2012.
- ERDEMOGLU, N.; KUSMENOGLU, S. Fatty acid composition of *Zygophyllum fabago* seeds. **Chemistry of natural compounds**, v. 39, n. 6, p. 595-596, 2003.
- EL-SOHAIFY, S. A. et al. Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 4, p. 188-199, 2015.
- ELGAMILY, H. et al. Microbiological Assessment of *Moringa Oleifera* Extracts and Its Incorporation in Novel Dental Remedies against Some Oral Pathogens. **Open access Macedonian journal of medical sciences**, v. 4, n. 4, p. 585, 2016.
- ELGAVISH, S; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono-and disaccharides¹. **Journal of molecular biology**, v. 277, n. 4, p. 917-932, 1998.
- EVANS, E. G. V. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S32-S36, 1998.
- FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for life Journal**, v. 1, n. 5, 2005.
- FARI, E. et al. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. **Mycoses**, v. 43, n. 5- 6, p. 191-196, 2000.
- FERRAO, A. M. B. et al. Fatty acids of the oil of Moringueiro (*Moringa oleifera* [M. pterygosperma]). **Agron. Angolana**, n. 30, p. 3-16, 1970.

FERREIRA, P. M. P. et al. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FLORENTINO, H. O. et al. Multiobjective genetic algorithm applied to dengue control. **Mathematical biosciences**, v. 258, p. 77-84, 2014.

FREIRE, M.G. Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talísia Esculenta* (ST. HILL)

FUGLIE, L. J. **The miracle tree: the multiple attributes of Moringa**. 2001.

FULLER, L. C. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of *Tinea capitis* 2014. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 3, p. 454-463, 2014.

GARCIA, G. A. et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006227, 2018.

GHOSH, P. et al. Biological safety assessment of mutant variant of *Allium sativum* leaf agglutinin (mASAL), a novel antifungal protein for future transgenic application. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 48, p. 11858-11864, 2013.

GHRAH, H. A. et al. Chrysanthemum extract and extract prepared silver nanoparticles as biocides to control *Aedes aegypti* (L.), the vector of dengue fever. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 1, p. 205-210, 2018.

GOZUBUYUK, G. S. et al. An ancient plant *Lawsonia inermis* (henna): Determination of in vitro antifungal activity against dermatophytes species. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. 313-318, 2014.

GUO, J. et al. Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 474-483, 2011.

GURGEL, L. A. et al. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 409-412, 2005.

GUPTA, A. K.; SUMMERBELL, R. C. Increased incidence of *Trichophyton tonsurans* tinea capitis in Ontario, Canada between 1985 and 1996. **Medical mycology**, v. 36, n. 2, p. 55-60, 1998.

GUPTA, A. et al. **Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam. extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice**. 2010.

HARRINGTON, L. C et al.. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 3, p. 411-422, 2001.

HRADIL, E. et al. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among wrestlers in Sweden. **Acta dermato-venereologica**, v. 75, n. 4, p. 305-306, 1995.

- HE, T. et al. Structural elucidation and antioxidant activity of an arabinogalactan from the leaves of *Moringa oleifera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 126-133, 2018.
- ILKIT, M. et al. Clonal outbreak of *Trichophyton tonsurans* tinea capitis gladiatorum among wrestlers in Adana, Turkey. **Medical mycology**, v. 48, n. 3, p. 480-485, 2010.
- ILKIT M, et al. Asymptomatic dermatophyte scalp carriage: laboratory diagnosis, epidemiology and management. **Mycopathologia**, 165: 61– 71. 2008.
- JONES, A. M. P. et al. Isolation and identification of mosquito (*Aedes aegypti*) biting deterrent fatty acids from male inflorescences of breadfruit (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 15, p. 3867-3873, 2012.
- KARTIKA, I. Amalia et al. Direct *Calophyllum* oil extraction and resin separation with a binary solvent of n-hexane and methanol mixture. **Fuel**, v. 221, p. 159-164, 2018.
- KASOLO, J. N. et al. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 9, p. 753-757, 2010.
- KATRE, U. V. et al. Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 203-207, 2008.
- KASZUBA, A. et al. Fungal flora in human skin and skin appendages infections in the region of Łódź, Poland Pilzflora der Haut- und Adenxinfektionen bei Menschen im Raum Łódź, Polen. **Mycoses**, v. 41, n. 5- 6, p. 249-253, 1998.
- KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995.
- KHOLIF, A. E. et al. Effect of feeding diets with processed *Moringa oleifera* meal as protein source in lactating Anglo-Nubian goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 217, p. 45-55, 2016.
- KHOLIF, A. E. et al. *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 129-137, 2015.
- KILPATRICK, D. C. Carbohydrate and protein conformation. **Biochemical Journal**. v. 239, p. 808-806, 1986.
- KLOMKLAO, Sappasith et al. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1348-1354, 2011.
- KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. **elife**, v. 4, 2015

- KONDORI, N. et al. Fungicidal activity of human lactoferrin-derived peptides based on the antimicrobial $\alpha\beta$ region. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 1, p. 51-57, 2011.
- KORUL'KINA, L. M. et al. Fatty-acid composition of two *Limonium* plant species. **Chemistry of natural compounds**, v. 40, n. 5, p. 417-419, 2004.
- KUMAR, R. Chandra et al. Microwave assisted extraction of oil from *Pongamia pinnata* seeds. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 2960-2964, 2018.
- KUMARATILAKE, L. M. et al. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on *Plasmodium falciparum* and in vivo effects on *P. berghei*. **The Journal of clinical investigation**, v. 89, n. 3, p. 961-967, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J. Dermatophytoses. **Medical mycology**, p. 105-161, 1992.
- LAM, Y. W.; WANG, H. X.; NG, T. B. A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, n. 1, p. 74-80, 2000.
- LALAS, S; TSAKNIS, J. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety "Periyakulam 1". **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 1, p. 65-77, 2002.
- LATIF, S. et al. Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from *Moringa oleifera* seed. **European journal of lipid science and technology**, v. 113, n. 8, p. 1012-1018, 2011.
- LIS, HALINA; SHARON, NATHAN. Lectins in higher plants. In: **Proteins and Nucleic Acids**. 1981. p. 371-447.
- LOGEMANN, J. et al. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 305, 1992.
- LUZ, L. A. et al. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 94-99, 2017.
- LUZ, L. A. et al. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.
- MAHAJAN, Shailaja G. et al. Inhibitory effect of n-butanol fraction of *Moringa oleifera* Lam. seeds on ovalbumin-induced airway inflammation in a guinea pig model of asthma. **International journal of toxicology**, v. 28, n. 6, p. 519-527, 2009.
- MANZANO-GAYOSSO, P. et al. Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. **Gac Med Mex**, 144, 23-26, 2008.
- MAZÓN, A. et al. Estudio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España). **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 65-8, 1997.

- MBIKAY, M. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 24, 2012
- MENDEZ-TOVAR, L.J. et al. Resistance to azolic compounds in clinical *Trichophyton* spp. strains. **Rev Iberoam Micol** 24, 320–322, 2007.
- MINAIYAN, M. et al. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 127, 2014.
- MOFIJUR, M. et al. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of *Moringa oleifera* and Palm oil based biodiesel in a diesel engine. **Industrial crops and products**, v. 53, p. 78-84, 2014.
- MOURA, M. C. et al. Water- soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.
- NASCIMENTO, R. J. S. et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.
- NASIR, Eugene; ALI, S. I.; STEWART, Ralph Randles. **Flora of West Pakistan: an annotated catalogue of the vascular plants of West Pakistan and Kashmir**. Fakhri, 1972.
- NAUTIYAL, B. P. et al. Moringa (drumstick)-an ideal tree for social forestry: growing conditions and uses-Part I. **Myforest**, v. 23, n. 1, p. 53-58, 1987.
- NATIONAL VECTOR BORNE DISEASE CONTROL PROGRAMME, NVBDCP dengue. 2017. www.nvbdc.gov.in/dengu1 retrieved on 11.07.2017.
- NDUBUAKU, U. M. et al. Anti-nutrient, vitamin and other phytochemical compositions of old and succulent moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaves as influenced by poultry manure application. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 32, p. 2502-2509, 2015.
- OLIVEIRA, J. T. A. et al. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and chemical toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1737-1747, 2004.
- 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, p. 1683-1690, 2016.
- OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

- OLIVEIRA, C. F. R. et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 142, p. 67-76, 2017.
- OYEYINKA, A. T.; OYEYINKA, S. A. *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 2, p. 127-136, 2018.
- PADHYE, A.A.; WEITZMAN, I. The dermatophytes. In: Agelatin L, Hay R, editors. **Medical mycology. London: Topley & Wilson's**, p. 224, 1998.
- PARK, Y. et al. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6491-6496, 2005.
- PAROTTA, J. A. *Moringa oleifera* Lam. Reseda, Horseradish Tree. **Moringaceae. Horseradish Tree Family**. USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, 1993, 2018 (SO-ITF-SM; 61). URL: <https://www.treearch.fs.fed.us/pubs/30357>
- PENEDO, P. LM; COELHO, G. L.V. Purificação de óleos vegetais por extração com CO₂ supercrítico. **Food Science and Technology**, v. 17, n. 4, p. 380-383, 1997.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.
- PRABHU, K. et al. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 124-129, 2011.
- PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.
- PURWAL, L.; PATHAK, A. K.; JAIN, U. K. In vivo anticancer activity of the leaves and fruits of *Moringa oleifera* on mouse melanoma. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 655-665, 2010.
- RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. **Parasitology research**, v. 103, n. 6, p. 1383-1390, 2008.
- RALDLAK. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas,SP, 2001
- RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Economic botany**, v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.
- RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2012.
- REIFENRATH, W. G. **Natural insect repellent**. US Patent No. 6,953,814. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC. 2005.

REIS, C. M. S. et al. Estudo da flora dermatofítica na população do Distrito Federal. **An. bras. dermatol**, v. 67, n. 3, p. 103-5, 107-10, 1992.

REIS, C. A. et al. An approach of the exact linearization techniques to analysis of population dynamics of the mosquito *Aedes aegypti*. **Mathematical biosciences**, 2017.

RHIMI, Wafa et al. *Dittrichia viscosa* L. leaves lipid extract: An unexploited source of essential fatty acids and tocopherols with antifungal and anti-inflammatory properties. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 196-201, 2018.

ROCHA, M.F.G. et al. *Moringa oleifera* inhibits growth of *Candida* spp. and *Hortaea werneckii* isolated from *Macrobrachium amazonicum* prawn farming with a wide margin of safety. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, p. 2197-2203, 2014.

ROCKWOOD, J. L.; ANDERSON, B. G.; CASAMATTA, D. A. Potential uses of *Moringa oleifera* and an examination of antibiotic efficacy conferred by *M. oleifera* seed and leaf extracts using crude extraction techniques available to underserved indigenous populations. **International Journal of Phototherapy Research**, v. 3, n. 2, p. 61, 2013.

RUTTARATTANAMONGKOL, K. et al. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, physico-chemical properties and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil in comparison with conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 68-77, 2014.

SAAVEDRA, L. M. et al. The quantitative structure–insecticidal activity relationships from plant derived compounds against chikungunya and zika *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector. **Science of The Total Environment**, v. 610, p. 937-943, 2018.

SAITO, H.; TOMIOKA, H.; YONEYAMA, T. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 26, n. 2, p. 164-169, 1984.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. **Food analytical methods**, v. 3, n. 3, p. 175-180, 2010.

SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 975-980, 2005.

SANTOS, L. M.M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 100, p. 35-40, 2017.

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, n. 5, 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, n. 9, p. e44840, 2012.
- SANZ-APARICIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, 1997
- SARABI, K.; KHACHEMOUNE, A. *Tinea capitis*: a review. **Dermatology nursing**, v. 19, n. 6, p. 525, 2007.
- SHARMA, K. K. et al. Antifungal activity of *Solanum melongena* L, *Lawsonia inermis* L. and *Justicia gendarussa* B. against Dermatophytes. **Int J PharmTech Res**, v. 3, n. 3, p. 1635-1640, 2011.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2**. Springer, Boston, MA, 2001. p. 1-16.
- SILVA, V.C.B. et al. Larvicidal activity of oils, fatty acids, and methyl esters from ripe and unripe fruit of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) against the vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 610-613, 2015.
- SILVA, J. P. V. et al. *Moringa oleifera* oil: studies of characterization and biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1527-1530, 2010.
- 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.
- SIMPANYA, M. F. et al. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, p. 1-12, 2000.
- SINGH, B. N. et al. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1109-1116, 2009.
- SKINNER, W. A. et al. Human skin-surface lipid fatty acids—mosquito repellents. **Experientia**, v. 26, n. 7, p. 728-730, 1970.
- SOLANKI, D. S. et al. Characterization of a novel seed protein of *Prosopis cineraria* showing antifungal activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 16-22, 2018.

SPEILMAN, A.; D'ANTONIO, M. Mosquito. **A Natural History of Our Most Persistent and Deadly Foe. New York, Hyperion, 2001**

TEIXEIRA, C.S., 2012. Determinação da estrutura de uma lectina da semente de *Camptosema pedicellatum* Benth por cristalografia de raios X. Dissertação de Mestrado.

TIMILSENA, Y. P. et al. Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. **Food chemistry**, v. 228, p. 394-402, 2017.

TRENTINI, Caroline Portilho et al. Oil extraction from macauba pulp using compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 126, p. 72-78, 2017.

TSAKNIS, J. et al. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4495-4499, 1999.

TSUBOI, R. et al. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infection and immunity**, v. 57, n. 11, p. 3479-3483, 1989.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 253-261, 2011.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. In: **Lectins**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 3-13.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. **Plant lectins**. Adv. Bot. Res. 48, 107-209, 2008.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Molecular cloning of two different mannose- binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 419-427, 1996.

VAN DAMME, E. J. M. et al. The NeuAc(α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an usual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996

VAN DEN BERG, H. et al. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 4, p. 577, 2012.

VAN DEN BERGH, K. P. B. et al. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **Planta**, v. 219, n. 2, p. 221-232, 2004.

VAN DEN BERGH, K. P. B. et al. Five disulfide bridges stabilize a hevein- type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS letters**, v. 530, n. 1-3, p. 181-185, 2002.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VISIOLI, F.; GALLI, C.. Olive oil phenols and their potential effects on human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4292-4296, 1998.

WANG, S. et al. Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. **journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 4, p. 881-887, 2016.

WANG, S. et al. Isolation of a trypsin–chymotrypsin inhibitor and its functional properties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 545-557, 2014.

WANG, H. X.; NG, T. B. An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. arvense Poir. **peptides**, v. 27, n. 7, p. 1732-1737, 2006.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from *Chinese chestnuts*. **Protein expression and purification**, v. 32, n. 1, p. 44-51, 2003.

WANG, S. Y. et al. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. **Peptides**, v. 25, n. 8, p. 1235-1242, 2004.

WANG, S. et al. Molecular cloning and functional analysis of a recombinant ribosome-inactivating protein (alpha-momorcharin) from *Momordica charantia*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 939-950, 2012.

WATERMAN, C. et al. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. **Phytochemistry**, v. 103, p. 114-122, 2014.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual review of biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 441-473, 1996.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WHO- World Health Organization, **Dengue and dengue haemorrhagic fever**, Fact Sheet (2008) 117.

WHO - World Health Organization (2017). **Dengue and severe dengue**. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Accessed February 23, 2017.

WONG, J. H. et al. A defensin-like peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. 'King Pole Bean'. **Food chemistry**, v. 135, n. 2, p. 408-414, 2012.

WONG, J. H.; NG, T. B. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 8, p. 1626-1632, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance**. 2006.

- WU, J. et al. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 717-724, 2016.
- YE, X.; NG, T. B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. **The Journal of Peptide Research**, v. 57, n. 4, p. 330-336, 2001.
- YE, X. Y.; WANG, H. X.; NG, T. B. Sativin: a novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap *Pisum sativum* var. macrocarpon. **Life sciences**, v. 67, n. 7, p. 775-781, 2000.
- YOSHIDA, E. et al. Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. **Journal of dermatological science**, v. 42, n. 3, p. 225-230, 2006.
- ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14-R19, 2016.
- ZHONG, J. et al. The application of ultrasound and microwave to increase oil extraction from *Moringa oleifera* seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 1-10, 2018.