



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SÁVIA SORAIA SANTANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA COAGULANTE DAS
SEMENTES DE *Moringa oleifera* CONTRA *Cryptococcus*.**

RECIFE

2023

SÁVIA SORAIA SANTANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA COAGULANTE DAS
SEMENTES DE *Moringa oleifera* CONTRA *Cryptococcus*.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Me. Matheus Cavalcanti de Barros

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva., Sávia Soraia Santana da.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA
COAGULANTE DAS SEMENTES DE Moringa oleifera CONTRA
Cryptococcus. / Sávia Soraia Santana da Silva.. - Recife, 2023.

36 : il., tab.

Orientador(a): Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientador(a): Matheus Cavalcanti de Barros.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. cMoL.. 2. Biofilm.. 3. Cryptococcus neoformans.. 4. Cryptococcus
gattii.. I. Paiva., Patrícia Maria Guedes . (Orientação). II. Barros., Matheus
Cavalcanti de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

SÁVIA SORAIA SANTANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA COAGULANTE DAS
SEMENTES DE *Moringa oleifera* CONTRA *Cryptococcus*.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: __/__/____

Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Pollyanna Michelle da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Gustavo Ramos Salles Ferreira
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e aos meus pais por ter chegado até aqui.

Gratidão à Tia Cristina, minha professora do ensino médio, por ter acreditado em mim e me ajudado com a passagem de ônibus para fazer a prova do ENEM. A senhora possibilitou tudo isso, que Deus retribua o bem que me fez. Nunca vou me esquecer.

Gratidão à Prof^a Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva pela orientação e por ter me dado a oportunidade de obter, na prática, mais conhecimento.

Agradeço a Matheus Cavalcanti de Barros, meu colega e coorientador pelo acompanhamento e toda paciência.

Aos meus colegas de estágio do Laboratório de Bioquímica e Proteínas (BIOPROT) que tornaram tudo tão leve, sempre dispostos a ajudar uns aos outros, tornando o ambiente mais agradável descontraído.

A mim mesma por nunca ter desistido de mim, mesmo diante de tantas adversidades.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha vida acadêmica e realização de mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

Cryptococcus é um gênero de fungos responsáveis por causar a criptococose, uma micose sistêmica oportunista que pode acometer imunodeprimidos e imunocompetentes. Os principais agentes etiológicos responsáveis pela doença são *C. neoformans* e *C. gattii*. Devido à sua relevância clínica, *C. neoformans* foi categorizado no grupo crítico na lista de patógenos fúngicos prioritários publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A *Moringa oleifera* é uma planta arbórea amplamente utilizada popularmente, inclusive no nordeste brasileiro, devidos aos seus potenciais biotecnológicos. Sementes de *Moringa* são empregadas para o tratamento da água devido à presença de moléculas coagulantes, tais como a lectina coagulante cMoL. O presente estudo investigou a atividade antifúngica da lectina cMoL contra espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. A lectina foi purificada em coluna cromatográfica de gel de guar e eluída com NaCl 1,0 M. A atividade antifúngica foi determinada a partir do teste de microdiluição em caldo, onde foi determinada a concentração mínima que inibiu 50% ou mais da atividade fúngica (CMI50). O potencial antibiofilme foi testado a partir do ensaio utilizando o corante cristal violeta. cMoL inibiu o crescimento de *C. neoformans* cepas B3501 (sorotipo D) e H99 (sorotipo A) e *C. Gattii* cepa R265 com valores de CMI50 de 7,45 µg/mL. A lectina inibiu 80% da formação de biofilme por *C. neoformans* nas concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL. cMoL apresentou alto potencial fungistático *contra C. neoformans* (B3501 e H99) e *C. Gattii* (R265) e inibiu significativamente a formação de biofilme por *C. Neoformans* (B3501). Mais estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade de cMoL contra as espécies de *Cryptococcus*.

Palavras-chave: cMoL. Biofilme. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

ABSTRACT

Cryptococcus is a genus of fungi responsible for causing cryptococcosis, an opportunistic systemic mycosis that can affect immunosuppressed and immunocompetent people. The main etiological agents responsible for the disease are *C. neoformans* and *C. gattii*. Due to its clinical relevance, *C. neoformans* has been categorized in the critical group in the list of priority fungal pathogens published by the World Health Organization (WHO). *Moringa oleifera* is a tree plant widely used popularly, including in northeastern Brazil, due to its biotechnological potential. *Moringa* seeds are used for water treatment due to the presence of coagulant molecules, such as the coagulant lectin cMoL. The present study investigated the antifungal activity of the cMoL lectin against species belonging to the genus *Cryptococcus*. The lectin was purified on a guar gel chromatographic column and eluted with NaCl 1.0 M. Antifungal activity was determined from broth microdilution method where the minimum concentration that inhibited 50% or more of the fungal activity (MIC₅₀) was determined. Antibiofilm potential was tested from the assay using crystal violet dye. cMoL inhibited the growth of *C. neoformans* strains B3501 (serotype D) and H99 (serotype A) and *C. gattii* strain R265 with MIC₅₀ values of 7.45 µg/mL. The lectin inhibited 80% of biofilm formation by *C. neoformans* at concentrations of 30, 60 and 120 µg/mL. cMoL showed high fungistatic potential against *C. neoformans* (strains B3501 and H99) and *C. gattii* (R265), and significantly inhibited biofilm formation by *C. neoformans*. More studies are needed to elucidate the mechanisms of action involved in cMoL activity against *Cryptococcus* species.

Keywords: cMoL. Biofilm. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aspectos gerais de <i>M. oleifera</i>	13
Figura 2 - Detecção de lectinas através do ensaio de hemaglutinação	18
Figura 3 - Distribuição ambiental e clínica de <i>Cryptococcus gattii</i>	20
Figura 4 - Mecanismo de contaminação por <i>Cryptococcus</i>	22
Figura 5 - Formação de biofilme de <i>C. neoformans</i> na presença de cMoL em diferentes concentrações.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela 1: Potenciais usos de *Moringa oleifera*..... 15

Tabela 2- Atividade antifúngica de cMoL contra espécies de *Cryptococcus* expressa como Concentração Mínima Inibitória (CMI₅₀) e Concentração Mínima Fungicida (MFC). 26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS PECÍFICOS.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Moringa oleifera</i>	13
3.1.1 Aplicações e propriedades e <i>M. oleifera</i>	14
3.2. LECTINAS	16
3.2.1 Lectina coagulante das Sementes de <i>M. oleifera</i> (cMoL)	19
3.3 <i>Cryptococcus</i>	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1.Purificação de cMoL	23
4.1.1 Atividade hemaglutinante	23
4.1.2 Dosagem proteica	23
4.2.Microorganismos.....	23
4.2.1 Atividade antifúngica	24
4.2.2 Potencial antibiofilme	24
4.3 Análise de dados	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* é uma planta arbórea originária da Índia que possui como características o crescimento rápido, flores brancas, frutos com três valvas e sementes aladas marrons (SCHWARTZ, 2000). Além disso, devido aos potenciais medicinais e biotecnológicos que possui, apresenta grande relevância econômica (BEZERRA; MOMENTÉ; FILHO, 2004). As sementes de *M. oleifera* são comumente empregadas para o tratamento da água devido seu potencial coagulante, o qual está relacionado à presença de lectinas (BRAVO, 2021). Lectinas são proteínas de origem não imunológica, capazes de formar ligações reversíveis e específicas com açúcares ou glicoconjugados (BELMONTE, 2015). Devido ao seu potencial de reconhecimento de carboidratos, as lectinas apresentam diversas atividades biológicas, tais como inseticida (COELHO et al., 2009), antimicrobiana (SUN et al., 2008) e antitumoral (QUIROGA et al., 2015).

Dentre as proteínas coagulantes encontradas nas sementes de *M. oleifera* está a lectina cMoL (*Coagulant M. oleifera Lectin*). cMoL apresentou atividade inseticida contra *Anagasta kuehniella*, uma praga de importância econômica que se alimenta de produtos armazenados, especialmente grãos (DE OLIVEIRA et al., 2011). A lectina mostrou efeito inibitório sobre a enzima superóxido dismutase de larvas de *Aedes aegypti* resistentes (AGRA-NETO et al., 2014). Além disso, apresentou atividade citotóxica contra a linhagem cancerígena B16- F10 (melanoma murino) (LUZ et al., 2017). Quando imobilizada, esta proteína foi capaz de remover 30 miligramas de ácido húmico, um composto orgânico de origem biológica encontrado em águas superficiais, por grama de suporte (SANTOS et al., 2011).

A criptococose é uma micose sistêmica oportunista, causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, sendo que as principais espécies são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (PERFECT; BICANIC, 2015). A doença acomete principalmente pacientes imunocomprometidos; no entanto, também pode afetar indivíduos imunocompetentes (SURAWUT et al., 2019). A criptococose afeta especialmente os pulmões, mas em casos graves pode estar relacionada à meningite ou meningoencefalite (KRYSAN, 2015). As opções terapêuticas existentes são limitadas a três medicamentos, a saber, anfotericina B, 5-fluorocitosina (5FC) e fluconazol (PERFECT et al., 2010). Por isso, a alta toxicidade e o desenvolvimento

de resistência dos tratamentos disponíveis para criptococose aumentam a necessidade de desenvolver novas estratégias de tratamento para a doença (KRYSAN, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica da lectina coagulante das sementes de *M. oleifera* (cMoL) contra espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Purificar cMoL através dos procedimentos previamente estabelecidos;
- b) Acompanhar o processo de purificação de cMoL através da dosagem proteica e da atividade hemaglutinante;
- c) Determinar a concentração mínima inibitória de cMoL contra espécies de *Cryptococcus*;
- d) Determinar a atividade antibiofilme contra *C. neoformans*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera* (Figura 1) é uma espécie de planta arbórea, incluída na classe Magnoliopsida e pertencente à família *Moringaceae*, seu nome faz referência ao óleo que pode ser extraído das sementes (FARIA, 1991). Também é conhecida por vários nomes populares, tais como “árvore de cedro”, “rabanete de cavalo”, “quiabo de quina” ou “acácia branca” (RANGEL., 2003). É originária do nordeste da Índia, distribuindo-se também amplamente por países da África e da América do Sul (SANTOS et al., 2015). A ampla distribuição da planta é devido ao fato dela adaptar-se bem aos climas quentes, úmidos e secos de países de clima tropical e subtropical, além disso, possui a capacidade de sobreviver em solos pouco férteis (MAINENTI, 2018; ANWAR et al., 2007). No Brasil, a planta foi introduzida por volta dos anos 50 e adaptou-se muito bem na região Nordeste nos estados do Ceará, Maranhão, Piauí e Pernambuco (SOBRAL et al, 2020).

Figura 1. Aspectos gerais de *M. oleifera*.



Fonte: Barros et al. (2021)

A *Moringa* é uma árvore de pequeno a médio porte, podendo chegar entre 10 a 12 metros de altura e de rápido crescimento (SILVA et al., 2010). É uma árvore alongada, de caule fino, ramificado, pouco resistente e com diâmetro que pode variar de 20 - 40 cm (SILVA, 2013; RADOVICH.,2011). Suas raízes são tubérculos, onde o armazenamento de água e energia proporcionam para a planta a capacidade de sobreviver em condições adversas (ARAÚJO, 2010). Apresentam folhas compostas, bipinadas e emplumadas com pecíolos grandes que se compõem de folíolos de formato elípticos ou obovados, variando nos tons de verde claro (MORTON, 1991). As flores são brancas, crescem em inflorescência axilar do tipo panícula de 10-15 cm e liberam substâncias voláteis de um aroma ligeiramente adocicado, motivo pelo qual são visitadas por muitas abelhas, tendo bastante expressividade na função apícola (RADOVICH, 2011; ORWA et al., 2009). Os frutos possuem três valvas de tom marrom quando maduros, podendo atingir até 120 cm e abrigar de 10 a 20 sementes (ARAÚJO, 2010). As sementes têm aparência triangular, cor marrom e três asas que lhe conferem dispersão por anemocoria (LORENZI; MATOS, 2002).

3.1.1. Aplicações e propriedades de *M. oleifera*

Devido aos potenciais usos que apresenta, a *Moringa* tem sido chamada de “árvore milagrosa” (FAHEY et al., 2005). Todas as partes da planta como semente, flor, folha, vagem e casca podem ser consumidas e apresentam diferentes propriedades medicinais (MOHANTY et al., 2021; MAHMOOD et al., 2010). Os potenciais usos relatados para a *M. oleifera* estão apresentados na Tabela 1. O uso industrial e comercial da *M. oleifera* envolve a produção de biodiesel e cosméticos (GIMENS, 2019; ANWAR et al., 2007). Na agronomia é empregada na cobertura e proteção de solos, fertilizante, biopesticida e planta ornamental (GRANDE, 2021).

O conteúdo nutricional é tanto que tem sido mencionado como uma alternativa para o combate à desnutrição (SINGH et al., 2020; DUARTE, 2017). Testes fitoquímicos mostraram que a *Moringa* detém um amplo espectro nutricional com vitaminas, aminoácidos, proteínas e minerais (LOPEZ- RODRIGUEZ et al., 2020, MBIKAY, 2012). Além disso, diversos compostos secundários, tais como o ácido gálico tem sido relatado para essa planta e relacionados a diversas propriedades medicinais (LIMA et al., 2019; KARTHIVASHAN et al., 2015).

Tabela 1: Potenciais usos de *Moringa oleifera*

Parte da planta	Usos	Parte da planta	Usos
Folhas	<ul style="list-style-type: none"> • Biomassa; • Suplemento alimentar animal; • Alimentação humana; • Medicina popular; • Potencializador de crescimento vegetal; • Biopesticida. 	Madeira	<ul style="list-style-type: none"> • Lenha; • Carvão vegetal; • Papel; • Gomas; • Medicina popular.
Flores	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentação humana; • Ornamentação; • Medicina popular; • Produção de mel. 	Casca	<ul style="list-style-type: none"> • Corantes; • Produção de cordas; • Medicina popular.
Fruto	<ul style="list-style-type: none"> • Carvão ativado; • Alimentação humana; • Medicina popular. 	Raiz	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentação humana; • Medicina popular.
Sementes	<ul style="list-style-type: none"> • Biocombustíveis; • Alimentação humana e de outros animais; • Usos industriais (ex: fabricação de cosméticos e lubrificação); • Medicina popular. 		

Fonte: Adaptado de Pereira (2015)

Em relação às aplicações das folhas e sementes, a ação antioxidante é uma das propriedades da *M. oleifera* mais mencionadas na literatura e está relacionada à prevenção a doenças que podem ser causadas por radicais livres, como câncer e reumatismo (MBIKAY, 2012). Outras atividades biológicas envolvem as propriedades hepatoprotetora, analgésica, antiinflamatória, antitérmica, antiúlcera, diurética, antitumoral e hipotensiva (ANWAR et al., 2007). Além disso, apresenta potencial hipocolesterolêmico (GHASI et al., 2000) e propriedades antimicrobianas (LIMA et al., 2019). Estudos têm demonstrado também os potenciais anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano das sementes dessa planta (OLIVEIRA et al., 2018;

ARAÚJO et al., 2013).

Apesar de todas as partes da *M. oleifera* serem bastante utilizadas para diversas finalidades, as sementes recebem maior destaque, pois são utilizadas para o tratamento da água em regiões onde não há ampla disponibilidade desse recurso (GIMENS, 2019; ALMEIDA et al., 2017). Esta atividade apresentada pelas sementes está relacionada também à presença de moléculas coagulantes nas sementes, tais como as lectinas (LUZ et al., 2009). Além disso, o extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos de relevância médica, tais como as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Candida albicans* e *Microsporium canis* (LIN et al., 2019).

3.2. LECTINAS

As lectinas formam um grupo de proteínas não imunes e possuem pelo menos um domínio que se liga reversivelmente e especificamente a carboidratos (COELHO et al., 2017). Dada essa propriedade, as lectinas possuem a capacidade de aglutinar células, interagindo com glicoconjugados das membranas celulares por meio de interações fracas, como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals (ELGAVISH e SHAANAN, 1997). Lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser de fonte vegetal, animal, fúngica e bacteriana (IORDACHE et al., 2015; PEUMANS et al., 1995). Mesmo assim, pesquisas com lectinas tem focado em plantas devido à facilidade de obtenção, uma vez que elas podem ser isoladas a partir de diversos tecidos, como de folhas (GOMES et al., 2013), flores (CHOLAK et al., 2016) e semente (CARVALHO et al., 2015).

Com relação à estrutura, as lectinas podem ser classificadas em merolectinas, que possuem apenas um domínio de ligação aos carboidratos e não aglutinam ou precipitam glicoconjugados; hololectinas, que apresentam dois ou mais domínios idênticos para ligação a carboidratos e podem aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados; quimerolectinas, que são formadas pela fusão de duas cadeias diferentes, com uma cadeia exibindo atividade catalítica ou biológica diferente da propriedade de ligar-se a carboidratos; e superlectinas, que possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos distintos e podem reconhecer carboidratos diferentes (FIGUEIRÔA et al., 2017). Além disso, as lectinas podem ser classificadas de acordo com o tipo de monossacarídeo ligante, podendo ser ligadoras de manose,

galactose/*N*- acetilgalactosamina, *N*-acetilglicosamina, fucose ou ácido *N*-acetilneuramínico (KUMAR et al., 2012).

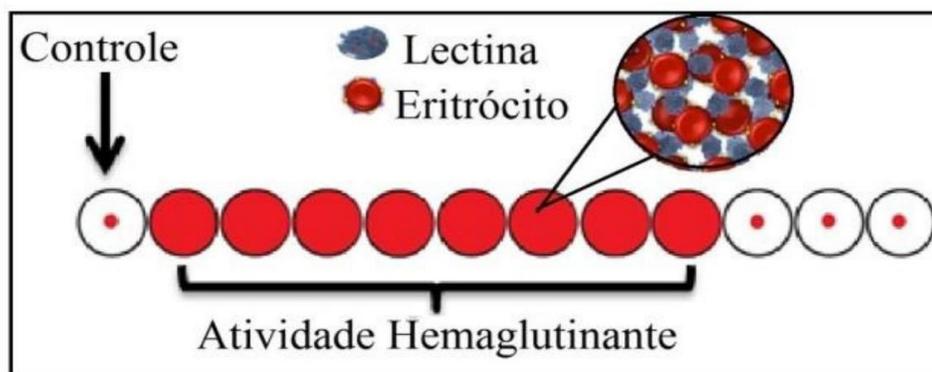
Diversas técnicas podem ser empregadas na obtenção e purificação de lectinas. O início de toda preparação é a obtenção do extrato bruto, através do rompimento das células e extravasamento do conteúdo celular, podendo ser realizado pelo uso de diversos tipos de solventes, dependendo da proteína desejada, como solução salina, água destilada ou solução tampão, sob agitação (LEHNINGER., 2006; KAWAGISHI et al., 2001). Em seguida, o extrato é submetido ao fracionamento protéico salino, adicionando sulfato de amônio afim de precipitar as proteínas desejadas, seguido de diálise para retirada do sal da amostra (YEASMIN et al., 2001; COELHO; SILVA, 2000). Após a obtenção dos extratos e frações protéica, as preparações são submetidas à cromatografia para separação das proteínas. As técnicas mais usadas são a cromatografia de afinidade, cromatografia por exclusão molecular, gel de filtração e cromatografia por troca iônica (SOUZA et al, 2015; COELHO; SILVA, 2000). Porém, a técnica mais utilizada na purificação de lectinas é a cromatografia por afinidade em colunas contendo uma matriz de glicoproteínas ou polissacarídeos na fase estacionária, onde é aplicada a amostra, fase móvel, em que as lectinas se ligam reversivelmente e podem ser eluídas da matriz através da competição do eluente com os sítios de ligação da matriz (SUN et al., 2007).

É fundamental a realização do teste hemaglutinante para detecção de lectinas na amostra. Neste teste, a amostra é misturada com uma suspensão de eritrócitos e a aglutinação é visualmente observada após alguns minutos (SANTOS,2013). Para a realização da atividade hemaglutinante (AH), uma suspensão de eritrócitos tratados em glutaraldeído é incubada com diferentes concentrações da amostra obtidas através de diluições sucessivas e o resultado é positivo quando é visualizada a formação de uma malha (Figura 2), resultante da interação das lectinas com os carboidratos da superfície celular (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004).

Diversas técnicas podem ser empregadas para detectar a presença das lectinas em amostras. Unido a atividade hemaglutinante, o Método de Lowry é bastante utilizado para determinar concentrações de proteínas e é baseado na reação de proteínas com reagentes de folin - Ciocalteu, o qual forma um complexo com os resíduos de tirosina e triptofano presentes na cadeia proteica (ZAIA et al.,

1998). A partir da curva padrão construída com soluções proteicas de concentrações conhecidas é possível calcular a concentração proteica (LOWRY et al., 1951).

Figura 2: Detecção de lectinas através do ensaio de hemaglutinação.



Fonte: Adaptado de Queiroz (2017)

Devido à capacidade de interação com os componentes de membranas e paredes celulares, as lectinas apresentam grande potencial antimicrobiano. O estudo conduzido por Silva et al. (2021) revelou que a lectina purificada de folhas de *Portulaca elatior* (PeLL) foi ativa sobre diferentes isolados do gênero *Pectobacterium* reduzindo crescimento com CMI (Concentração Mínima Inibitória) de 0,185 µg/mL e CMB (Concentração Mínima Bactericida) de 0,74 µg/mL. A lectina isolada das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) apresentou efeito antibacteriano contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* não resistentes e multirresistentes com valores de CMI de 25 e 50 µg/mL, respectivamente (MOURA et al., 2021). A lectina das folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) também apresentou potencial antibacteriano contra bactérias de interesse clínico com os maiores efeitos bacteriostáticos detectados para *Salmonella enteritidis* (CMI = 0,45 µg/mL) (GOMES et al., 2013). PgTeL lectina purificada da sarcotesta das sementes de romã (*Punica granatum*) apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* com CMI de 25 µg/mL e CMF (Concentração Mínima Fungicida) de 50 µg/mL, e *Candida krusei* (CMI e CMF de 12,5 µg/mL) (SILVA et al., 2018). Um estudo recente conduzido por Santos (2021) revelou a atividade antibiofilme e antifúngica da lectina WSMoL isolada da *M. oleifera* contra espécies do gênero *Cryptococcus*, além e atividade fungistática e fungicida para o gênero *Candida*. No gênero *Candida*, WSMoL apresentou CMI₅₀ de 20 µg/mL em todas as espécies testadas. Além disso, WSMoL apresentou efeito fungistático

(CMI = 6,25 µg/mL) sobre *C. neoformans* (B2501 e H99) e *C. gattii* (R265). A avaliação da ação da lectina de *Helianthus annuus* contra *C. albicans* no estudo de Del Rio et al. (2019) demonstrou a capacidade desta proteína em provocar a redução de 82% na viabilidade celular e de 80% na formação de biofilme.

3.2.1. Lectina Coagulante das Sementes de *M. oleifera* (cMoL)

No estudo conduzido por Santos et al. (2009) foi apresentada uma nova lectina purificada a partir das sementes de *M. oleifera*, a qual foi denominada cMoL (*Coagulant M. oleifera Lectin*). cMoL foi isolada após extração salina e cromatografia em coluna de gel de guar, composto por *N*-galactose, foi ativa na faixa de pH 4,0 – 9,0 e termoestável a 100 °C durante 7 h. A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições reduzidas revelou uma banda polipeptídica principal de 26,5 kDa. Além disso, o nome da lectina faz referência ao fato da atividade coagulante da proteína ser semelhante a do sulfato de alumínio, o coagulante mais utilizado no tratamento de água. Estudos estruturais revelaram que cMoL possui 101 aminoácidos, ponto isoelétrico teórico de 11,67 e 81% de similaridade com uma proteína floculante de *M. oleifera* (LUZ et al., 2013).

Várias atividades biológicas têm sido reveladas para cMoL, evidenciando o alto valor biotecnológico que essa lectina possui. cMoL apresentou atividade inseticida contra *Anagasta kuehniella*, uma praga de importância econômica que se alimenta de produtos armazenados, especialmente grãos (OLIVEIRA et al., 2011). A lectina inibiu as enzimas superóxido dismutase de larvas de *A. aegypti* resistentes a organofosforados (AGRA-NETO et al., 2014). cMoL (500 µg/mL) interferiu na motilidade das larvas de *Haemonchus contortus*, um parasito hematófago que causa prejuízos à produção de ruminantes em todo o mundo (MEDEIROS et al., 2020). Quando imobilizada, cMoL removeu 30 miligramas de ácido húmico, um composto orgânico de origem biológica encontrado em águas superficiais, por grama de suporte (SANTOS et al., 2011).

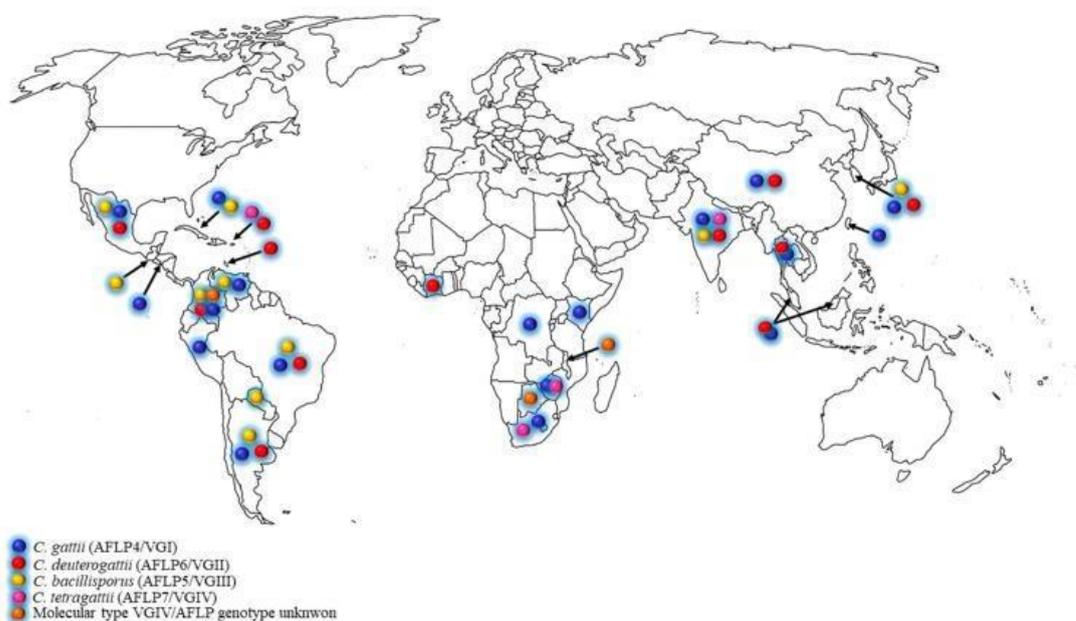
cMoL reduziu a viabilidade e causou a morte celular de células de melanoma murino (B16-F10) com um CI₅₀ (concentração que inibiu 50% da viabilidade celular) de 9,72 µM, induzindo necrose e apoptose tardia nas células em concentrações não citotóxica para células normais (LUZ et al., 2017). cMoL(6,25 µg/mL) exibiu atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarídeo,

regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β (ARAÚJO et al., 2013). cMoL prolongou significativamente o tempo necessário para a coagulação do sangue, agindo como uma proteína anticoagulante *in vitro* (LUZ et al., 2013).

3.3 *Cryptococcus*

Cryptococcus é um gênero de fungos responsáveis por causar a criptococose, uma doença sistêmica que afeta hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos (MAY et al., 2016). Das diversas espécies conhecidas, duas são clinicamente significantes: *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON, 2014). *C. neoformans* encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente e está associado a fezes de aves, como de pombos (MITCHELL et al., 2010). *C. gattii* pode ser encontrado principalmente de árvores em regiões tropicais e subtropicais e em países de clima temperado como Canadá e Estados Unidos (HERKERT et al., 2017). Na Figura 3 está representada a distribuição do complexo de espécies de *C. gattii* em países em desenvolvimento.

Figura 3. Distribuição ambiental e clínica de *Cryptococcus gattii*.



Fonte: Herkert et al. (2017)

Anteriormente classificadas como uma mesma espécie, *C. neoformans* e *gattii* diferem entre si pela morfologia e atributos sequenciais moleculares e bioquímicos (KWON et al., 2002). As duas espécies possuem variados tipos moleculares, híbridos e outras citadas na literatura na classificação das duas espécies. *C. gattii* apresenta

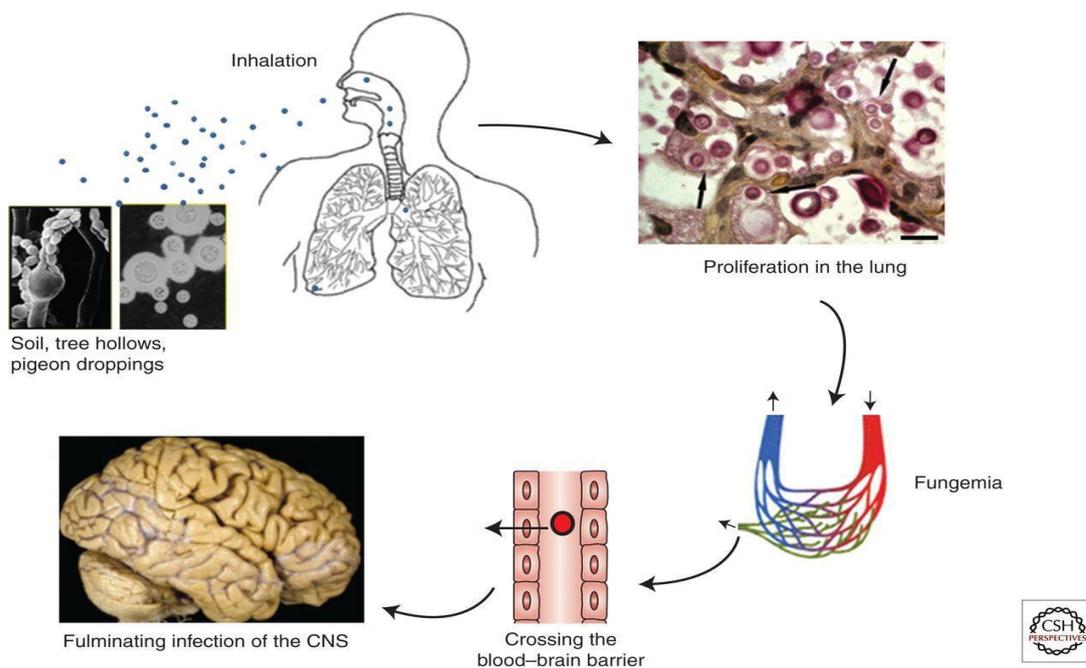
4 subtipos moleculares (VG I, VG II, VG III e VG IV) e sorotipos B e C (GONZALEZ et al., 2016). VG II é apontado pela capacidade de infectar pulmões de imunocompetentes, e VG I como a variante que mais provoca doenças no Sistema nervoso central e lesões no pulmão (ANDREOU, 2019). *C. neoformans* se agrupa em subtipos VN I, VN II (sorotipo A) e VN II e VN IV (sorotipo AD/D), a qual predominantemente afeta pessoas com AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (TRILLES et al., 2008).

A infecção oportunista criptococose geralmente afeta pessoas imunossuprimidas, como pacientes que contém o vírus HIV (Vírus da imunodeficiência Humana), pacientes transplantados, com câncer, idosos e crianças (KWON et al., 2014; PERFEITO et al., 2010). As vias de infecção podem se dar quando o indivíduo adquire os propágulos infecciosos ou leveduras dissecadas do *Cryptococcus* pelas vias aéreas (Figura 4) (QUEIROZ., 2008.). Com o potencial de comprometer não somente os pulmões, *C. neoformans* e *gattii* podem também se espalhar no organismo afetando outros órgãos, como cérebro, causando a meningite fúngica, chamada de meningite criptocócica (LI; MODY., 2010). As manifestações clínicas de meningite criptocócica podem variar de acordo com a gravidade e incluem febre, dor de cabeça, rigidez na nuca, confusão mental, sensibilidade a luz, náusea e vômito, alterações visuais, auditivas e convulsões (KON., 2008). O diagnóstico pode ser feito a partir da anamnese do paciente pelo médico e por análise da presença de elementos fúngicos no líquido ou fluidos corporais ou avaliação imunológica (SOUZA., 2013).

Embora a infecção por *Cryptococcus* seja principalmente uma manifestação de deficiência imunológica, até 25% dos casos relatados nos Estados Unidos ocorrem em pacientes sem problemas imunológicos reconhecíveis, indicando que esse fungo pode desenvolver mecanismos que lhe permitem escapar das defesas imunológicas e persistir em hospedeiros não imunocomprometidos (OLSZEWSKI; ZHANG; HUFFNAGLE, 2010). *Cryptococcus* spp. tem sua virulência associada a parede celular composta quitina, manoproteínas e quitosana; a capacidade de produção de uma cápsula polissacarídica ao redor de sua célula que auxilia na proteção quando fagocitado; termotolerância; capacidade de transições morfológicas, se transformando de leveduras haploides à células poliploides; presença de proteases (ZARAGOZA.,2019, OKAHAKI et al., 2010). Outra

característica importante para a virulência de *C. neoformans* e *gattii* é o fato deles serem patógenos intracelulares facultativos capazes de persistir dentro da célula hospedeira (GOULART., 2009).

Figura 4: Mecanismo de contaminação por *Cryptococcus*



Fonte: Kwon (2014)

As infecções por *Cryptococcus* se mostram difíceis de tratar devido às características do gênero, plasticidade na expressão de genes envolvidos na resistência e adaptabilidades fisiológicas (IYER et al., 2021). O tratamento da criptococose pode empregar medicamentos que envolvem fármacos antifúngicos como fluconazol, anfotericina B, flucitosina e itraconazol, administrados por via oral ou intravenosa (KWON et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Purificação de cMoL

cMoL foi isolada de acordo com o procedimento previamente estabelecido por Santos et al. (2009) com algumas adaptações. Primeiramente, foi obtido o extrato aquoso a partir da homogeneização das sementes (10 g) em 100 mL de NaCl 0,15 M durante 6 horas a 28° C. Posteriormente, a mistura foi filtrada e centrifugada e o sobrenadante correspondeu ao extrato. As proteínas do extrato foram precipitadas com 60% de sulfato de amônio e o precipitado obtido foi solubilizado com a solução salina. Em seguida, a fração proteica foi dialisada (4h, 28° C) com três trocas de água destilada e a última troca de NaCl 0,15 M. O precipitado obtido do fracionamento salino dialisado, foi submetido a uma coluna de gel de guar (10 x 1 cm). A coluna foi previamente equilibrada com uma solução de NaCl 0,15 M a um fluxo de 20mL/h. A proteína foi eluída da matriz com NaCl 1,0 M e as frações coletadas foram avaliadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm. Todo processo de purificação foi acompanhado pelo teste de atividade hemaglutinante e dosagem proteica.

4.1.1. Atividade hemaglutinante

Após cada etapa de purificação, o teste de atividade hemaglutinante, utilizando eritrócitos de coelho (coleta autorizada pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFPE, processo nº 23076.033782/2015-70). A AH foi determinada a partir dos procedimentos descritos por Paiva e Coelho (1992). O teste foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços, na qual o primeiro poço correspondeu ao controle negativo. Nos demais poços foi realizada uma diluição seriada da amostra (50 µL) com NaCl 0,15 M (50 µL). Em seguida, uma suspensão de eritrócitos previamente tratados com glutaraldeído (50 µL) foi adicionada a cada poço e o ensaio foi incubado por 45 min a 28 °C. A unidade de hemaglutinação foi definida como a maior diluição da amostra que promoveu aglutinação eritrocitária completa.

4.1.2. Dosagem proteica

A dosagem de proteínas foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) (31,25 a 1000 mg/mL), de acordo com o método descrito por Lowry (1951).

4.2. Microorganismos

As cepas de *Cryptococcus neoformans* H99 (Sorotipo A) e B3501 (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii*, R265 (Sorotipo B) foram obtidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil).

4.2.1. Atividade antifúngica

A concentração mínima inibitória (CMI) de cMoL foi determinada pelo ensaio de microtitulação proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI, 2018). Em placas de microtitulação de 96 poços, a amostra foi adicionada (80 µl) no terceiro e quarto poço a partir do qual foi diluído seriadamente em água destilada estéril até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, 40 µl do meio Sabouraud Dextrose foi adicionado em todos os poços, exceto no primeiro, que será preenchido com 200 µl do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. A suspensão fúngica (80 µl; 3×10^6 UFC/ml) foi acrescentada do segundo poço até o último poço da fileira. O segundo poço (microorganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 30°C e a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) foi medida no tempo zero e após 48h de incubação usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) correspondeu à menor concentração da amostra capaz de promover a redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%. Para a determinação da concentração mínima fungicida (CMF), alíquotas (10 µl) dos poços contendo concentrações das amostras \geq CMI foram inoculados em placas de petri contendo meio SDA, e incubados a 30 °C por 48h. A CMF correspondeu à menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio será realizado em triplicata.

4.2.2. Potencial antibiofilme

O ensaio foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Silva et al. (2018). A cultura de *C. neoformans* (B3501) foi cultivada em meio SDB durante *overnight* a 37 °C e então suspensa em solução salina estéril (0,9%, p/v, NaCl) para obter uma suspensão fúngica equivalente a 10^8 UFC/mL. A cada poço de uma microplaca de 96 poços, foi adicionado meio SDB (40 µL), a suspensão fúngica (80

μL), bem como 80 μL de água Milli-Q ultrapura (controle) ou 80 μL de cMoL (0,23 – 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em água Milli-Q). A OD_{600} foi registrada no tempo zero e a microplaca foi incubada a 30 °C por 48 h. Após esse período, a OD_{600} foi lida novamente, o meio de cultura foi removido e os poços da placa foram lavados três vezes com solução salina. As demais células fúngicas aderidas foram fixadas a 60 °C por 40 min e a camada de biofilme aderente foi corada com cristal violeta 0,4% (p/v) por 15 min a 25 °C. Após lavagem com água, o corante ligado ao biofilme foi solubilizado com etanol (15 min de incubação) e a absorbância foi medida a 570 nm. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os resultados foram representados como porcentagem de inibição em relação ao controle não tratado (crescimento de 100%).

4.3. Análise de dados

Para a atividade antibiofilme foi realizada análise de variância de uma via (ANOVA), conduzida pela análise dos dados realizada no Software Prism Graphpad 7.0, seguido pelo teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos potenciais biotecnológicos têm sido referidos na literatura para a lectina cMoL, tais como hemostático, anticâncer e anti-inflamatório (LUZ et al., 2017; ARAÚJO et al., 2013; LUZ et al., 2013). Devido à capacidade de reconhecimento a carboidratos, as lectinas têm se mostrado bons agentes antimicrobianos (MOURA et al., 2021; SILVA et al., 2021). Além disso, vale ressaltar que a lista de patógenos fúngicos prioritários recentemente publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizou *C. neoformans* no grupo crítico de maior importância para a saúde pública (OMS, 2022). Desta forma, o potencial antimicrobiano de cMoL foi testado contra espécies de *Cryptococcus*.

Os dados relacionados à atividade antifúngica de cMoL contra *Cryptococcus* estão representados na Tabela 1. cMoL inibiu o crescimento das espécies de *Cryptococcus* com valores de CMI 7,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 2), no entanto a lectina não foi fungicida para as espécies testadas. A atividade antifúngica das lectinas pode estar relacionada à interação dessas proteínas com os componentes da parede celular dos fungos, levando à inibição do crescimento, redução da absorção de nutrientes, alteração da germinação dos esporos e morte celular (CHIKALOVETS et

al., 2015). Em estudo desenvolvido por Jones et al. (2017), a lectina recombinante citovirina apresentou alto potencial antifúngico contra *C. neoformans* e *C. gattii* (CMF = 500 nM) a partir da interação com a parede celular, afetando o tamanho e a liberação da cápsula fúngica. A lectina do gérmen de trigo (WGA) foi capaz de bloquear os quitoligômeros de superfície de *C. neoformans* em um modelo *in vivo*, o que inibiu a formação da cápsula fúngica e diminuiu os níveis de transcrição dos genes que estão envolvidos na formação da cápsula. Além disso, o tratamento com WGA tornou as células de levedura menos eficientes em sua capacidade de se associar aos fagócitos e retardou a mortalidade dos camundongos em relação a animais infectados com células fúngicas não tratadas (FONSECA et al., 2013). A interação das lectinas com componentes presentes na parede celular de *Cryptococcus* também foi evidenciada no estudo conduzido por Silva et al. (2021) com a lectina PgTeL acoplada a pontos quânticos, no qual os autores demonstraram que a proteína marcou intensamente *C. neoformans* a partir da interação com componentes da superfície celular fúngica.

Tabela 2. Atividade antifúngica de cMoL contra espécies de *Cryptococcus* expressa como Concentração Mínima Inibitória (CMI₅₀) e Concentração Mínima Fungicida (MFC).

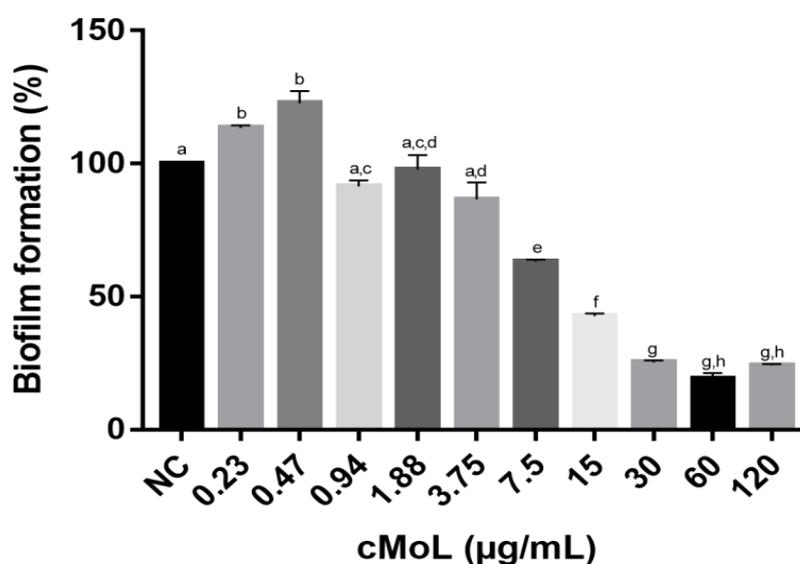
Microorganismo	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMF (µg/mL)
<i>Cryptococcus neoformans</i>		
B3501	7.45	ND
H99	7.45	ND
<i>Cryptococcus gattii</i>		
R265	7.45	ND

ND: Não detectado.

Dentre as espécies testadas neste estudo, a única capaz de formar biofilme é *C. neoformans*, por isso os estudos antibiofilme foram conduzidos apenas com essa espécie. Biofilmes são associações complexas de microrganismos que aumentam a resistência e tolerância a antibióticos (KUMAR, 2017). cMoL apresentou efeito inibitório na formação do biofilme de *C. neoformans*, exibindo valores de até 80% de inibição nas concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL (Figura 5). Conforme demonstrado

com outras lectinas, a capacidade do cMoL de inibir a formação de biofilmes pode estar relacionada à interferência no arranjo e na integridade estrutural da associação, como a interação com moléculas *quorum sensing* ou com a matriz polimérica (MOURA et al., 2017).

Figura 5. Formação de biofilme de *C. neoformans* (B3501) na presença de cMoL em diferentes concentrações.



NC: controle negativo (crescimento 100%). Barras com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

6. CONCLUSÃO

cMoL apresentou alto potencial de inibição contra *C. neoformans* B3501 (sorotipo D) e H99 (sorotipo A) e *C. gattii* R265 (sorotipo B), espécies fúngicas de alto interesse médico. A proteína foi capaz de inibir significativamente a formação de biofilme por *C. neoformans* (B3501) na concentração do CMI₅₀ e de maneira dose dependente. O presente estudo destaca o potencial antifúngico de cMoL e estimula a condução de mais estudos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos com as atividades relatadas, bem como o efeito sinérgico da lectina com antibióticos comerciais.

REFERÊNCIAS

- AGRA-NETO, Afonso Cordeiro 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, p. 175-184, 2014.
- ANDREOU, M. et al. *Cryptococcus gattii* infection in an immunocompetent host in Greece. **Medical Mycology Case Reports**, v. 27, p. 1-3, 2019.
- ANWAR, Farooq et al. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.
- ARAÚJO, Larissa Cardoso Corrêa 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, M. de S. Manejo de espécies florestais para produção de madeira, forragem e restauração de áreas degradadas. **Caicó: Emparn**, v. 5, p. 60, 2010.
- BARROS, M. C. et al. Evaluation of acute toxicity, 28-day repeated dose toxicity, and genotoxicity of Moringa oleifera leaves infusion and powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 296, p. 115504, 2022.
- BARROS, M.C. et al. 2021. *Moringa oleifera* Toxicology: An Overview, in: Figueroa, D. S., **Moringa oleifera: Properties, Applications and Health Effects**. Nova Science Publishers, New York, pp. 35-68.
- BRAVO, Franklin Vidaurre. Uso de semilla de Moringa Oleifera como biocoagulante natural para mejorar la calidad del agua proveniente del rio Ahuashiyacu-Tarapoto. 2021.
- BELMONTE, Bernardo do Rego. **Determinação do potencial inseticida de extratos e lectinas de casca de cerne de Myracrodruon urundeuva contra o gorgulho do milho (Stophilus zeamais)**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BEZERRA, Antonio Marcos E.; MOMENTÉ, Valeria G.; MEDEIROS FILHO, Sebastião. Seed germination and seedling development of moringa (Moringa oleifera Lam.) as a function of seed weight and substrate type. **Brazilian Horticulture**, v. 22, p. 295-299, 2004.
- CHIKALOVETS, Irina V. et al. A lectin with antifungal activity from the mussel Crenomytilus grayanus. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 2, p. 503-507, 2015.
- CHOLAK, Iryna S. et al. A study of lectin activity in buds of Sophora japonica L.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 15, n. 9, p. 1877-1881, 2016.

COELHO, Juliene 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, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, 2017.

COELHO, Luana CBB; DA SILVA, Maria BR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

QUEIROZ, João Paulo Araújo Fernandes. Criptococose-uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 2, p. 32-38, 2008.

DEL RIO, Marianela et al. Effects of the binding of a *Helianthus annuus* lectin to *Candida albicans* cell wall on biofilm development and adhesion to host cells. **Phytomedicine**, v. 58, p. 152875, 2019.

ELGAVISH, Sharona; SHAANAN, Boaz. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.

FAHEY, Jed 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, p. 1-15, 2005.

FARIA, E. Dicionário Escolar Latino-português: revisão de Ruth Junqueira de Faria. 6. Ed. Rio de Janeiro: FENAME, 1991. 592p.

FIGUEIROA, E. O. et al. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 34, p. 3667-3680, 2017.

FONSECA, Fernanda L. et al. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chito oligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 64-73, 2013.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GONZÁLEZ, Gloria M. et al. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. **Folia microbiologica**, v. 61, p. 51-56, 2016.

GOULART, Letícia Silveira. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. 2009.

GRANDE, Campo. **Uso de Bio sólido e Moringa Oleífera Lamarck em Sistema Silvopastoril como Alternativa na Recuperação de Pastagem Degradada**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Católica Dom Bosco.

GUIMARÃES-GOMES, Viviane et al. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n. 1, p. 1-11, 2004.

HERKERT, Patricia F. et al. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in developing countries. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 62, 2017.

IORDACHE, Florin et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

IYER, Kali R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p.454-466, 2021.

JONES, Tyler H. et al. Novel antifungal activity for the lectin scytovirin: inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 755, 2017.

KAWAGISHI, Hirokazu et al. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 2001.

KON, Adriana Satie et al. Consenso em criptococose-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 524-544, 2008.

KRYSAN, Damian J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: novel molecules and repurposed drugs. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 93- 98, 2015.

KUMAR, K. Kiran et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of orofacial sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

KUMAR, Yogesh et al. A multifunctional wonder tree: *Moringa oleifera* Lam open new dimensions in field of agroforestry in India. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 6, n. 8, p. 229-235, 2017.

KWON-CHUNG, Kyung J. et al. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, n. 4, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, Kyung J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

LEONÍDIO, Angélica Ribeiro Araújo. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MORINGA OLEIFERA LAM. **Revista Gestão & Tecnologia**, v. 1, n. 28, p. 4- 15, 2019.

LI, Shu Shun; MODY, Christopher H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010.

LIMA, Laiys S. Trigueiro. et al. Caracterização físico-química, toxicológica e nutricional das folhas da Moringa oleifera Lam secas e in natura. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 11, p. 178111450, 2019.

LIN, Lin; GU, Yulei; CUI, Haiying. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. **Food packaging and shelf life**, v. 19, p.86-93, 2019.

LORENZI, H. MATOS. FJA: Plantas Medicinais no Brasil. **Nova Odessa, Instituto Plantarum**, p.346-347, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-275, 1951.

LUZ, Luciana 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.

LUZ, Luciana A. **Purificação, caracterização e determinação de atividade coagulante da lectina de sementes de *Moringa oleifera***. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

LUZ, Luciana Andrade et al. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 94-99, 2017.

MA, Z. F. et al. Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 40-46, 2020.

MAHMOOD, Khawaja Tahir; MUGAL, Tahira; HAQ, Ikram Ul. Moringa oleifera: a natural gift-A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 11, p. 775, 2010.

MAINENTI, DAVID. Moringa oleifera: a prolific herbal research front. **Information S**

MANGALE, S. M. et al. Study of Moringa oleifera (drumstick) seed as natural absorbent and antimicrobial agent for river water treatment. **J Nat Prod Plant Resour**, v. 2, n. 1, p. 89-100, 2012.

MAY, Robin C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

- MBIKAY, Majambu. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 24, 2012.
- MEDEIROS, Mário LS et al. In vitro effects of *Moringa oleifera* seed lectins on *Haemonchus contortus* in larval and adult stages. **Experimental Parasitology**, v. 218, p. 108004, 2020.
- MITCHELL, Thomas G. et al. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**, p. 235-259, 2010.
- MOHANTY, Monalisa et al. Phytoperspective of *Moringa oleifera* for oral health care: An innovative ethnomedicinal approach. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1345-1357, 2021.
- MORTON, Julia F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)—a boon to arid lands?. **Economic botany**, v. 45, p. 318-333, 1991.
- MOURA, M. C. et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 745-754, 2021.
- OKAGAKI, Laura H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010.
- OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho 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, Natalia Terezinha et al. Tratamento de água com *Moringa oleifera* como coagulante/floculante natural. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 373-382, 2018.
- OLSZEWSKI, Michal A.; ZHANG, Yanmei; HUFFNAGLE, Gary B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. **Future microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1269-1288, 2010.
- OMS, Organização Mundial de Saúde. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **Geneva: World Health Organization**. 2022. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- ORWA, C. et al. Agroforestree Database: a tree reference and selection guide. Version 4. **Agroforestree Database: a tree reference and selection guide. Version 4.**, 2009.
- PAIVA, Patricia M. G.; COELHO, Luana C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PEREIRA, Francisco Sávio Gomes et al. Moringa oleifera as sustainable source for energetic biomass. **International Journal of Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 177, 2015.

PERFECT, John R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PERFECT, John R.; BICANIC, Tihana. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49- 54, 2015.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

QUEIROZ, Leydianne Leite de Siqueira Patriota. **Isolamento, caracterização e avaliação de atividades citotóxica e imunomoduladora de lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia***. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

QUIROGA, Alejandra V.; BARRIO, Daniel A.; AÑÓN, María Cristina. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 478-485, 2015.

RADOVICH, T. Farm and forestry production and marketing profile for Moringa (Moringa oleifera). **Specialty crops for Pacific island agroforestry**, 2011.

SANTOS, Andréa FS et al. Interaction of Moringa oleifera seed lectin with humic acid. **Chemical Papers**, v. 65, p. 406-411, 2011.

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

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

SANTOS, Andréa FS. et al. *Moringa oleifera*: resource management and multiuse life tree. **Advances in Research**, 4(6), 388-402, 2015.

SANTOS, Leilane Marina Morais dos. Investigação do potencial antifúngico de lectina de sementes de Moringa oleífera (WSMoL) contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. 2021. Tese (doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

SILVA, Jhosianna PV et al. Moringa oleifera oil: studies of characterization and biodiesel production. **Biomass and bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1527-1530, 2010.

SILVA, Pollyanna Michelle 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.

SILVA, Suéllen Pedrosa et al. Purification, characterization, and assessment of

antimicrobial activity and toxicity of *Portulaca elatior* leaf lectin (PeLL). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2021.

SINGH, Amit Kumar et al. Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 209-220, 2020.

SOBRAL, Acir José Santos; MUNIZ, Evandro Neves; SILVA, Camilla Mendonça. Caracterização da *Moringa oleifera* Lam e sua utilização na alimentação animal. **Ciência Animal**, v. 30, n. 2, p. 68-79, 2020.

SOUSA, Rosianne Assis et al. First molecular typing of cryptococemia-causing *Cryptococcus* in central-west Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, p. 267-272, 2013.

SOUZA CARVALHO, Aline et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

SOUZA, Jayra D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SUN, Jie et al. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 292-299, 2007.

SUN, Yun-Dong et al. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular immunology**, v. 45, n. 2, p. 348-361, 2008.

SURAWUT, Saowapha et al. Increased susceptibility against *Cryptococcus* neoformans of lupus mouse models (pristane-induction and FcγRIIb deficiency) is associated with activated macrophage, regardless of genetic background. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 45-53, 2019.

RILLES, Luciana et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus* neoformans and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

YEASMIN, Tanzima et al. Purification and characterization of three galactose specific lectins from mulberry seeds (*Morus* sp.). **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 23, p. 6005-6010, 2001.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaís BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.