



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, EFEITO ANTIBIOFILME, MECANISMO DE AÇÃO,
EFEITO SINÉRGICO COM FÁRMACOS COMERCIAIS E TOXICIDADE DE MO-
CBP2, UMA PROTEÍNA ANTICÂNDIDA ISOLADA DE SEMENTES DE *Moringa*
*oleífera***

FORTALEZA
2020

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

ASPECTOS ESTRUTURAIS, EFEITO ANTIBIOFILME, MECANISMO DE AÇÃO,
EFEITO SINÉRGICO COM FÁRMACOS COMERCIAIS E TOXICIDADE DE *Mo-*
CBP2, UMA PROTEÍNA ANTICÂNDIDA ISOLADA DE SEMENTES DE *Moringa*
oleífera

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientadora: Prof. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58a Silva Neto, João Xavier da.

Aspectos estruturais, efeito antibiofilme, mecanismo de ação, efeito sinérgico com fármacos comerciais e toxicidade de Mo-CBP2, uma proteína anticândida isolada de sementes de *Moringa oleífera* / João Xavier da Silva Neto. – 2021.

164 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

1. Produtos naturais. 2. Agentes antimicrobianos. 3. Bioatividade. I. Título.

CDD 572

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

ASPECTOS ESTRUTURAIS, EFEITO ANTIBIOFILME, MECANISMO DE AÇÃO,
EFEITO SINÉRGICO COM FÁRMACOS COMERCIAIS E TOXICIDADE DE MO-
CBP2, UMA PROTEÍNA ANTICÂNDIDA ISOLADA DE SEMENTES DE *Moringa*
oleífera

Tese ou Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção
do título de doutor em Bioquímica. Área
de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em: 19/12/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. José Ytalo Gomes da Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Lucas Pinheiro Dias
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha família, amigos e amigas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, pelo dom da vida e por ter dado força e ânimo para a realização deste trabalho.

À minha mãe e irmã, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos difíceis. Sou extremamente grato a Deus por ter elas em minha vida, as quais foram essenciais para chegar até onde cheguei. Elas sempre foram exemplos de força e superação e nunca me deixaram desmotivar dos meus sonhos e dos meus objetivos. Sou grato por todo cuidado e preocupação.

Aos meus professores e professoras, desde a educação infantil, por terem mostrado com tanto amor, como a educação é acolhedora e libertadora. A vocês, toda minha gratidão.

Aos amigos obtidos durante a graduação (UERN), pela amizade sempre verdadeira e por todos os momentos de apoio de alegria. Vocês têm papel importante nessa conquista.

À Roselia Fernandes, pelo cuidado e preocupação. Sou muito grato pelos ensinamentos e conselhos dados, sempre visando o meu melhor. Seus conselhos serviram para me tornar uma pessoa melhor. Muito obrigado por tudo.

À professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos, por ter sido um exemplo de profissional e pessoa. Seus conselhos sempre pertinentes e nas horas certas me ajudaram muito durante a caminhada científica.

Ao professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por toda a ajuda e dedicação. Pela disposição em ajudar sempre e pelo incentivo incondicional para que ninguém desista do caminho da ciência.

Ao Dr. Luiz Francisco Wemmenson, pela amizade e momentos de descontração e risos. Por estar sempre disposto a ajudar e pelas conversas científicas. Meu muito obrigado.

À Dra. Mirella Leite, pelas ajudas sempre que necessárias e por todo carinho, amizade, momentos de descontração e risos, conselhos e dedicação. Você faz parte dessa caminhada.

Ao Dr. Thiago Fernandes, pela amizade e ajuda desde a época da graduação. Pelas conversas científicas e momentos de descontração e risos. Meu muito obrigado.

À Dra. Lady Clarissa, pela amizade e dedicação. Pelas broncas e conselhos valiosos. Pelos momentos de alegria e descontração. Meu muito obrigado.

À Dra. Helen Paula (nossa eterna chefinha), por toda amizade. Pelos valiosos conselhos científicos (e não científicos) e ajuda direta durante essa caminhada. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Lucas Pinheiro (nosso eterno chefinho) por toda a amizade e dedicação. Seus conselhos (científicos e não científicos) foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Pela disposição em ajudar e sempre socorrer dos apuros. Meu muito obrigado.

Ao Me. Tiago Deiveson, pela amizade e ajuda sempre que necessária. Pelos inúmeros momentos de descontração e risadas. Meu muito obrigado.

Ao Dr. Paulo Carvalho, pela amizade. Pelas discussões científicas e momentos de alegria e descontração. Meu muito obrigado.

À Me. Eva Morais (EvaPox), por toda ajuda sempre que necessária. Pela amizade, dedicação e momentos de alegria, dedicação e felicidade. Meu muito obrigado por tudo.

À Me. Larissa (LariPox), pela amizade e dedicação. Pelos conselhos e conversas sempre proveitosas. Pela ajuda sempre que necessária. Pelos momentos de alegria e descontração. Meu muito obrigado por tudo.

À Me. Claudia Johana, por toda a amizade e dedicação. Pelas conversas sempre proveitosas e momentos de alegria e risos. Por estar sempre disposta a ajudar. Por todas as conversas sobre política e ciências. Meu muito obrigado.

À Me. Nadine, pela amizade e momentos de alegria. Por estar sempre disposta a ajudar e pelas conversas sempre proveitosas. Meu muito obrigado.

À Me. Ana Paula Zaranza, pela amizade e momentos de descontração e alegria. Pelos momentos de ajuda e auxílio. Por suas brincadeiras sempre engraçadas. Meu muito obrigado.

À Dra. Mariana Reis, pela amizade durante o percurso da pós-graduação. Pelos conselhos, momentos de brincadeiras e descontração. Pela ajuda sempre que necessária. Pelas conversas sempre produtivas. Meu muito obrigado.

Ao IC Guilherme Lobo, pela amizade. Por todos os momentos de discussão científica ou não. Por todos os momentos de risadas e alegria. Meu muito obrigado.

À IC Amanda, pela grande amizade e ajuda sempre que precisa. Pelas conversas sempre proveitosas. Pelos momentos de alegria e descontração. Muito obrigado.

À Me. Raissa por toda a amizade e momentos de alegria e descontração. Pelas conversas sempre proveitosas e animadoras. Pelas ajudas e conselhos. Meu muito obrigado

À Me. Marina pela amizade. Pelas conversas sempre proveitosas e animadoras. Pelas ajudas e conselhos. Meu muito obrigado.

À Dra. Tarcymara Garcia, por todos os momentos de ajuda e conselhos científicos. Meu muito obrigado.

À professora Dra. Daniele Oliveira, por ter aceitado me orientar. Pela dedicação e amizade em todos os momentos. Pelos conselhos sempre valiosos e ajuda sempre que necessária. Pelos muitos momentos de alegria e descontração. Seus conselhos e ensinamentos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigado.

A todos os amigos da pós-graduação, meu muito obrigado.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM). Meu muito obrigado.

A todos os funcionários do DBBM (professores, secretários, técnicos, seguranças e zeladores). Meu muito obrigado.

Durante a caminhada desse trabalho, fui agraciado com o amor da minha vida, Ana Paula Apolinário. Agradeço o amor dedicado, as discussões científicas, toda a ajuda e os muitos momentos de alegria e felicidade. Agradeço por ter me dado auxílio e cuidado de mim em todos os momentos ruins e difíceis. Por sempre me incentivar e dar suporte. Além de caminharmos juntos na vida acadêmica, caminhamos juntos pela vida. Ela é parte essencial dessa caminhada e esse trabalho também é dela.

À Maria Eunice (sogra), Francisco Praxedes (sogro), André, João Paulo, e Thiago por terem me acolhido em sua casa e por toda ajuda e dedicação. Todos foram essenciais para a finalização desse trabalho. A todos, meu muito obrigado.

Ao pessoal do Bioprospec por terem disponibilizado a estrutura para a realização de experimentos e por toda a ajuda oferecida.

À equipe do LPVD por ter cedido material e equipamentos em vários momentos.

Ao professor Dr. Rômulo Farias Carneiro por ter cedido material e equipamentos, além de ter atuado diretamente nos experimentos.

Ao professor Dr. Jeanlex Soares de Sousa ter cedido material e equipamentos.

À professora Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar por ter atuado diretamente nos experimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado e doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará: Laboratório de Toxinas Vegetais (DBBM), sob a coordenação da Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa. Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (DBBM), sob a coordenação do Prof. PhD José Tadeu Abreu de Oliveira. Laboratório de Ecologia e Microbiana e Biotecnologia (Departamento de Biologia), sob a coordenação da Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo. Laboratório da Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES.

Universidade Estadual do Ceará – Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (Centro de Ciências da Saúde), sob a coordenação da Prof^a. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

À empresa GREENBEAN BIOTECNOLOGIA LTDA.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Através da concessão de bolsa de Pós-Graduação ao autor do trabalho e auxílio financeiro concedido para a realização da presente pesquisa.

Demais Instituições de Fomento e Apoio à Pesquisa - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Seria uma atitude ingênua esperar que as classes dominantes desenvolvessem uma forma de educação que proporcionasse às classes dominadas, perceber as injustiças sociais de maneira crítica. (FREIRE, 1984, p. 89)

RESUMO

As espécies de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* apresentam enorme relevância clínica, uma vez que podem causar doenças em humanos, sobretudo quando estes são expostos a fatores de risco como o comprometimento do sistema imunológico e uso de cateter e/ou sondas (presença de biofilmes). Os medicamentos convencionais utilizados (azóis, polienos, fluorpirimidinas e equinocandinas) contra esses microrganismos têm trazido consequências maléficas como a resistência antifúngica e efeitos adversos. Na busca por novas moléculas antifúngicas, as proteínas vegetais se destacam. Assim, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar estruturalmente, avançar no entendimento de aspectos relacionados ao mecanismo de ação e avaliar o efeito sinérgico com drogas convencionais de uma proteína isolada de sementes de *Moringa oleífera*, denominada *Mo-CBP₂*, tóxica para espécies de *Candida*. Foi determinado que *Mo-CBP₂* forma oligômeros (hexâmeros) compostos majoritariamente por α -hélice (44.6%) e β -folhas (30.6%). A proteína possui estabilidade ao calor (100 °C por 20 min) e a variações de pH (2-10). Foi observado que *Mo-CBP₂* agrega células de *C. albicans*, sendo esta ação relacionada à capacidade da proteína em interagir com a parede celular fúngica. Além disso, *Mo-CBP₂* causou inibição da acidificação do meio externo induzido por glicose em células de *C. albicans* o que pode ser resultado da inibição de H⁺-ATPase na membrana plasmática da levedura. Além de interagir com o ergosterol, *Mo-CBP₂* produziu poros (< 45 Å) na membrana celular e gerou o extravasamento de material intracelular. Também foi observado o aumento dos níveis de radicais livres e peroxidação lipídica, o que está relacionado a alterações das enzimas do sistema redox (SOD, CAT e POX). Em paralelo, *Mo-CBP₂* produziu degradação do DNA e liberação de citocromo c nas células de *C. albicans*. As atividades inibitórias de tripsina e amilase, quitinásica e glucanásica não foram detectadas para *Mo-CBP₂*. Em conjunto a isso, foi observado efeito sinérgico com os antimicóticos padrões (Itraconazol, Caspofungina e Nistatina) e expressiva atividade antibiofilme de *Candida* spp. para *Mo-CBP₂*. Por fim, foi demonstrado que *Mo-CBP₂* apresenta baixa toxicidade contra células saudáveis de mamíferos. Os dados obtidos mostram o potencial da proteína *Mo-CBP₂* em se tornar um antifúngico alternativo no controle de células planctônicas e de biofilmes de *Candida* spp., podendo também ser utilizada de maneira sinérgica com outros antifúngicos.

Palavras-chave: Produtos naturais. Agentes antimicrobianos. Bioatividade.

ABSTRACT

The species of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* have great clinical relevance since they cause diseases in human, especially when they are exposed to risk factors such as weakened immune system, and the use of catheters and/or probes (presence of biofilms). The conventional drugs (azoles, polyenes, fluoropyrimidines, and echinocandins) used against these microorganisms brought harmful consequences such as antifungal resistance and adverse effects. In the search for new antifungal molecules, plant proteins stand out. Thus, the objectives of this research were to characterize structurally, to advance in clarifying aspects related to the mechanism of action and to evaluate the synergistic effect with conventional drugs of the anti-candida protein isolated from *Moringa oleifera* seeds named *Mo*-CBP₂. It was determined that *Mo*-CBP₂ forms oligomers (hexamers) composed mainly of α -helix (44.6%) and β -sheets (30.6%). The protein has stability to heat (100 °C for 20 min) and pH variations (2-10). It was observed that *Mo*-CBP₂ aggregates *C. albicans* cells, being this action related to the protein's ability to interact with a fungal cell wall. In addition, *Mo*CBP₂ caused inhibition of glucose-induced external acidification in *C. albicans* cells, which may be the result of inhibition of H⁺ -ATPase in the yeast plasma membrane. In addition to interacting with ergosterol, *Mo*-CBP₂ produced pores (<45 Å) in the cell membrane and generated extravasation of intracellular material. It was also observed an increase in the levels of free radicals and lipid peroxidation, which is related to changes in the enzymes of the redox system (SOD, CAT and POX). In parallel, *Mo*-CBP₂ produced DNA degradation and release of cytochrome c in *C. albicans* cells. The trypsin and amylase, chitinase and glucanase inhibitory activities were not detected for *Mo*-CBP₂. In addition, the synergistic effect with standard antimicotic (Itraconazole, Caspofungin and Nystatin) and expressive antibiofilm activity of *Candida* spp. for *Mo*-CBP₂. Finally, it has been shown that *Mo*-CBP₂ has low toxicity against healthy mammalian cells. The data presented show the potential of *Mo*-CBP₂ protein to become an alternative antifungal in the control of planktonic cells and biofilms of *Candida* spp., and can also be used synergistically with other antifungals.

Keywords: Natural products. Antimicrobial agents. Bioactivity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.1	Espécies do gênero <i>Candida</i> e suas infecções	33
2.1.1	<i>Biofilmes</i>	35
2.2	Tratamentos convencionais: alvos moleculares, resistência antifúngica e toxicidade	36
2.3	Proteínas vegetais e atividade anticândida	40
2.4	Proteínas ligantes a quitina de <i>Moringa oleífera</i>	41
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	45
3.1	Hipótese	45
3.2	Objetivos	45
3.2.1	<i>Objetivo geral</i>	45
3.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	45
4	EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	46
5	INTRODUCTION	50
6	MATERIAL AND METHODS	52
6.1	Biological material and chemical reagents	53
6.2	Protein determination	53
6.3	<i>Mo-CBP₂</i> purification	53
6.4	Susceptibility test and MIC determination	53
6.5	Protein characterization	54
6.5.1	<i>Gel filtration chromatography</i>	54
6.5.2	<i>Atomic force microscopy analysis (AFM)</i>	55
6.5.3	<i>Influence of temperature and pH in anticandida activity</i>	55
6.5.4	<i>Circular dichroism (CD) spectroscopy</i>	56
6.5.5	<i>Enzymatic activity detection</i>	56
6.5.5.1	<i>Chitinase assay (EC 3.2.1.14)</i>	57
6.5.5.2	<i>β-1,3-glucanase assay (EC 3.2.1.39)</i>	57
6.5.5.3	<i>Trypsin inhibitory assay</i>	58
6.5.5.4	<i>α-Amylase inhibitory assay</i>	58
6.6	Mode of action of <i>Mo-CBP₂</i>	59

6.6.1	Carbohydrates interaction assay	59
6.6.2	Yeast aggregation assay	59
6.6.3	Sorbitol interaction assay	60
6.6.4	Ultrastructural analysis	60
6.6.5	Pore size determination in live yeast	61
6.6.6	Intracellular compounds linkage	62
6.7	Synergism assay	61
6.8	Biomass inhibition on <i>Candida</i> spp. Biofilm	62
6.8.1	Effect of <i>Mo</i>-CBP₂ on the adhesion of <i>Candida</i> spp. Biofilms	62
6.8.2	Effect of <i>Mo</i>-CBP₂ on matures biofilms of <i>Candida</i> spp.	63
6.9	Statistical analysis	63
7	RESULTS	64
7.1	Protein purification and antifungal activity	64
7.2	Structural and biochemical characterization	64
7.2.1	Protein oligomerization	65
7.2.2	Effect of temperature and pH in antifungal activity	65
7.2.3	CD analyses	65
7.2.4	Enzymatic activity detection	65
7.3	Mode of action	66
7.3.1	Carbohydrates interaction and yeast aggregation	66
7.3.2	Inhibition of cell wall biosynthesis	66
7.3.3	Morphological analysis of <i>C. albicans</i>	66
7.3.4	Estimation of pore size in cellular membrane and release of cytoplasmic material	67
7.4	Synergistic effect of <i>Mo</i>-CBP₂	67
7.5	Anti-biofilm activity	68
8	DISCUSSION	68
9	CONCLUSION	76
10	INTRODUCTION	125
11	Material and methods	126
11.1	<i>M. oleifera</i> seeds and yeast strains	126
11.2	Protein quantification	126
11.3	<i>Mo</i>-CBP₂ purification	126

11.4	Biological activity	126
11.4.1	Antifungal activity	126
11.4.2	Mode of action	126
11.4.2.1	<i>Ergosterol biosynthesis inhibition</i>	126
11.4.2.2	<i>Sterol interactions</i>	126
11.4.2.3	<i>Effect of Mo-CBP₂ on glucose-stimulated acidification of the external medium</i>	126
11.4.2.4	<i>Influence of ROS on Mo-CBP₂ anti-candida activity</i>	126
11.4.2.5	<i>Redox system enzyme activity</i>	127
11.4.2.5.1	Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	127
11.4.2.5.2	Catalase (CAT; EC. 1.11.1.6)	127
11.4.2.5.3	Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)	127
11.4.2.6	<i>Lipid peroxidation determination</i>	127
11.4.2.7	<i>Apoptotic induction by Mo-CBP₂ treatment</i>	127
11.4.2.8	<i>Cytochrome c release</i>	127
11.5	Cell viability	128
11.6	Statistical analysis	127
12	RESULTS	128
12.1	Protein preparation	128
12.2	Mo-CBP₂ mode of action in <i>C. albicans</i>	128
12.2.1	<i>Ergosterol quantification and interaction</i>	128
12.2.2	<i>External médium acidification</i>	128
12.2.3	<i>Effect of reactive oxygen species (ROS) on anti-candida activity and lipid peroxidation</i>	128
12.2.4	<i>Enzymes</i>	128
12.2.5	<i>DNA fragmentation</i>	128
12.2.6	<i>Cytochrome c release</i>	128
12.3	Cell viability	128
13	DISCUSSION	129
14	CONCLUSÃO	136
	REFERÊNCIAS	138
	APÊNDICE A – LISTA DE ILUSTRAÇÕES	148
	APÊNDICE B – LISTA DE TABELA	154

APÊNDICE C – LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	155
APÊNDICE D – LISTA DE SÍMBOLOS	158
ANEXO A – ARTIGO 1 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	159
ANEXO B – ARTIGO 2 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	160
ANEXO C – ARTIGO 3 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	161
ANEXO D – ARTIGO 4 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	162
ANEXO E – ARTIGO 5 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	163
ANEXO F – ARTIGO 6 PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA	164