



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

**LAÍS OLIVEIRA LEITE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES A  
QUITINA (*MO-CBP<sub>3</sub>* E *MO-CBP<sub>4</sub>*) DE *MORINGA OLEIFERA* CONTRA  
FITOPATÓGENOS DE CULTIVARES ECONOMICAMENTE RELEVANTES**

**FORTALEZA**

**2025**

LAÍS OLIVEIRA LEITE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES A QUITINA  
(*MO-CBP<sub>3</sub>* E *MO-CBP<sub>4</sub>*) DE *MORINGA OLEÍFERA* CONTRA FITOPATÓGENOS DE  
CULTIVARES ECONOMICAMENTE RELEVANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de atuação: Bioquímica e aplicações biotecnológicas de biomoléculas de plantas.

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

FORTALEZA

2025

LAÍS OLIVEIRA LEITE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS LIGANTES A QUITINA  
(*MO-CBP<sub>3</sub>* E *MO-CBP<sub>4</sub>*) DE *MORINGA OLEÍFERA* CONTRA FITOPATÓGENOS DE  
CULTIVARES ECONOMICAMENTE RELEVANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de atuação: Bioquímica e aplicações biotecnológicas de biomoléculas de plantas.

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

Aprovada em: 28/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. João Xavier da Silva Neto  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Marco Aurélio e Andréia.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Aurélio e Andréia, por me apoiarem nas minhas decisões de vida, por me darem colo nos momentos mais difíceis e por me incentivarem constantemente a seguir em frente, mesmo quando vocês mesmos estão passando por lutas maiores e complicadas. Eu amo vocês e sempre serei grata por tudo que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

À professora Daniele, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos que me foram dados tanto na graduação quanto no mestrado e pelas oportunidades que me foram oferecidas no LABTOX.

Aos membros da banca, professora Raquel e Xavier, por cederem uma parte do seu tempo para me ajudarem a melhorar meu trabalho, pelas dúvidas que me foram tiradas e todo o direcionamento que me ofereceram.

Aos professores Cleverton Diniz e Cláudia Miranda, por cederem os equipamentos e o espaço de seus laboratórios para que eu pudesse realizar alguns dos experimentos deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por todos os conhecimentos compartilhados e pelo incentivo no meu desenvolvimento pessoal como cientista.

À Camila Gomes, que me recebeu muito bem no LABTOX, me ensinou muitas “manhas experimentais” que eu ainda não sabia executar e por tornar esse período mais suportável graças ao seu bom humor e companheirismo.

Aos meus melhores amigos de longa data, Ariel, Bruno, João Neto, Amanda, Luana, Gabi e Livia, que continuaram ao meu lado nos momentos mais difíceis que passei nos últimos anos, que me incentivaram a não desistir e me ajudaram da forma que podiam sempre que possível.

Aos meus amigos Leo, Fernando, Matheus, Dino, Gabi, Fe, Gustavo, Lina e Otávio, por me apoiarem e me ajudarem ao longo do mestrado. Sou grata a vocês por me ajudarem a me curar e me proporcionarem momentos incríveis nos últimos anos.

À minha namorada, Ariane, por estar no meu lado no que eu diria serem os piores dias da minha vida, por me dar apoio incondicional independente de qual rumo eu decidisse tomar, por me ajudar nos experimentos e por melhorar todos os meus dias só com a sua presença.

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

À Universidade Federal do Ceará, pelo fornecimento da estrutura e dos recursos necessários para a minha formação, tanto na graduação quanto no mestrado.

## RESUMO

Os fungos fitopatogênicos, como *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*, representam uma ameaça significativa à agricultura, causando doenças em culturas de importância econômica, como melão e pitaya, e gerando grandes perdas produtivas. Diante dos desafios associados ao uso excessivo de fungicidas químicos, como resistência microbiana e impactos ambientais, a busca por alternativas sustentáveis tem ganhado destaque. Nesse contexto, proteínas vegetais com atividade antifúngica, como as isoladas de *Moringa oleifera*, emergem como candidatas promissoras para o controle desses patógenos. Este trabalho investigou os mecanismos de ação de proteínas ligantes à quitina (*Moringa oleifera* Chitin Binding Protein – *Mo*-CBP), *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>, extraídas de sementes de *M. oleifera*, contra *F. jinanense* e *C. tropicale*, respectivamente. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade e troca iônica, e sua eficácia foi avaliada por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), integridade da membrana celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), vazamento de conteúdo intracelular, e análise do conteúdo de lipídeos e ergosterol. Os resultados demonstraram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> inibiu *F. jinanense* (CIM = 0,25 mg/mL), enquanto *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi eficaz contra *C. tropicale* (CIM = 0,25 mg/mL). Ambas as proteínas induziram danos à membrana plasmática, redução de lipídeos e ergosterol, e aumento da permeabilidade celular, corroborando seu potencial como agentes antifúngicos multifatoriais. Apesar de *Mo*-CBP<sub>3</sub> ter induzido moderada produção de EROs em *F. jinanense*, esse efeito não foi observado para *Mo*-CBP<sub>4</sub> em *C. tropicale*, sugerindo mecanismos distintos de ação dependentes da espécie fúngica. O estudo destaca o potencial biotecnológico dessas proteínas como alternativas sustentáveis no controle de fitopatógenos, com possíveis aplicações na agricultura para a redução do uso de fungicidas químicos.

**Palavras-chave:** mecanismo de ação, estresse oxidativo, permeabilização de membrana, antracnose, proteínas vegetais.

## ABSTRACT

Phytopathogenic fungi, such as *Fusarium jinanense* and *Colletotrichum tropicale*, pose a significant threat to agriculture by causing diseases in economically important crops, such as melon and pitaya, leading to substantial production losses. Given the challenges associated with the excessive use of chemical fungicides, including microbial resistance and environmental impacts, the search for sustainable alternatives has gained prominence. In this context, plant-derived proteins with antifungal activity, such as those isolated from *Moringa oleifera*, emerge as promising candidates for controlling these pathogens. This study investigated the mechanisms of action of *Moringa oleifera* chitin binding proteins (*Mo*-CBP), *Mo*-CBP<sub>3</sub> and *Mo*-CBP<sub>4</sub>, extracted from *M. oleifera* seeds, against *F. jinanense* and *C. tropicale*, respectively. The proteins were purified using affinity and ion-exchange chromatography, and their efficacy was evaluated through assays for minimum inhibitory concentration (MIC), cell membrane integrity, reactive oxygen species (ROS) production, intracellular content leakage, and analysis of lipid and ergosterol content. The results demonstrated that *Mo*-CBP<sub>3</sub> inhibited *F. jinanense* (MIC = 0,25 mg/mL), while *Mo*-CBP<sub>4</sub> was effective against *C. tropicale* (MIC = 0,25 mg/mL). Both proteins induced plasma membrane damage, reduced lipid and ergosterol content, and increased cellular permeability, confirming their potential as multifactorial antifungal agents. Although *Mo*-CBP<sub>3</sub> induced moderate ROS production in *F. jinanense*, this effect was not observed for *Mo*-CBP<sub>4</sub> in *C. tropicale*, suggesting distinct mechanisms of action depending on the fungal species. This study highlights the biotechnological potential of these proteins as sustainable alternatives for phytopathogen control, with possible applications in agriculture to reduce reliance on chemical fungicides.

**Keywords:** mechanism of action, oxidative stress, membrane permeabilization, anthracnose, plant proteins.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>1.1 Fungos filamentosos: características morfológicas e composição bioquímica</b> .....	10
1.1.1 <i>Fusarium spp</i> .....	13
1.1.2 <i>Colletotrichum spp</i> .....	15
<b>1.2 Infecções fúngicas em plantas</b> .....	16
<b>1.3 Mecanismos de ação de proteínas vegetais contra fungos</b> .....	18
1.3.1 $\beta$ -1,3-glucanases.....	19
1.3.2 Quitinases.....	20
1.3.3 Proteínas semelhantes à taumatina e osmotina.....	21
1.3.4 Proteínas inativadoras de ribossomos.....	22
1.3.5 Defensinas.....	23
1.3.6 Tioninas.....	24
1.3.7 Proteínas de transferência de lipídeos.....	25
<b>1.4 Moringa (<i>Moringa oleifera</i>) e seu potencial biotecnológico</b> .....	26
1.4.1 Proteínas Ligantes à Quitina de <i>Moringa oleifera</i> .....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	30
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	30
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	31
<b>3.1 Material</b> .....	31
<b>3.2 Purificação das proteínas <i>Mo</i>-CBP<sub>3</sub> e <i>Mo</i>-CBP<sub>4</sub></b> .....	31
<b>3.3 Quantificação de proteínas solúveis</b> .....	32
<b>3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	32

<b>3.5 Atividade antifúngica</b> .....	33
3.5.1 <i>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	33
3.5.2 <i>Integridade da membrana</i> .....	33
3.5.3 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i> .....	34
<b>3.6 Vazamento de proteínas e açúcares intracelulares</b> .....	34
<b>3.7 Efeito no conteúdo total de lipídeos</b> .....	35
<b>3.8 Efeito no conteúdo de ergosterol da membrana plasmática</b> .....	35
<b>3.9 Análises estatísticas</b> .....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	37
4.1 <i>Purificação das proteínas Mo-CBP<sub>3</sub> e Mo-CBP<sub>4</sub> e eletroforese SDS-PAGE</i> .....	37
4.2 <i>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	39
4.3 <i>Integridade da membrana</i> .....	40
4.4 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i> .....	42
4.5 <i>Vazamento de proteínas e açúcares intracelulares</i> .....	44
4.6 <i>Efeito no conteúdo total de lipídeos</i> .....	46
4.7 <i>Efeito no conteúdo de ergosterol na membrana plasmática</i> .....	48
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA</b> .....	67

# 1 INTRODUÇÃO

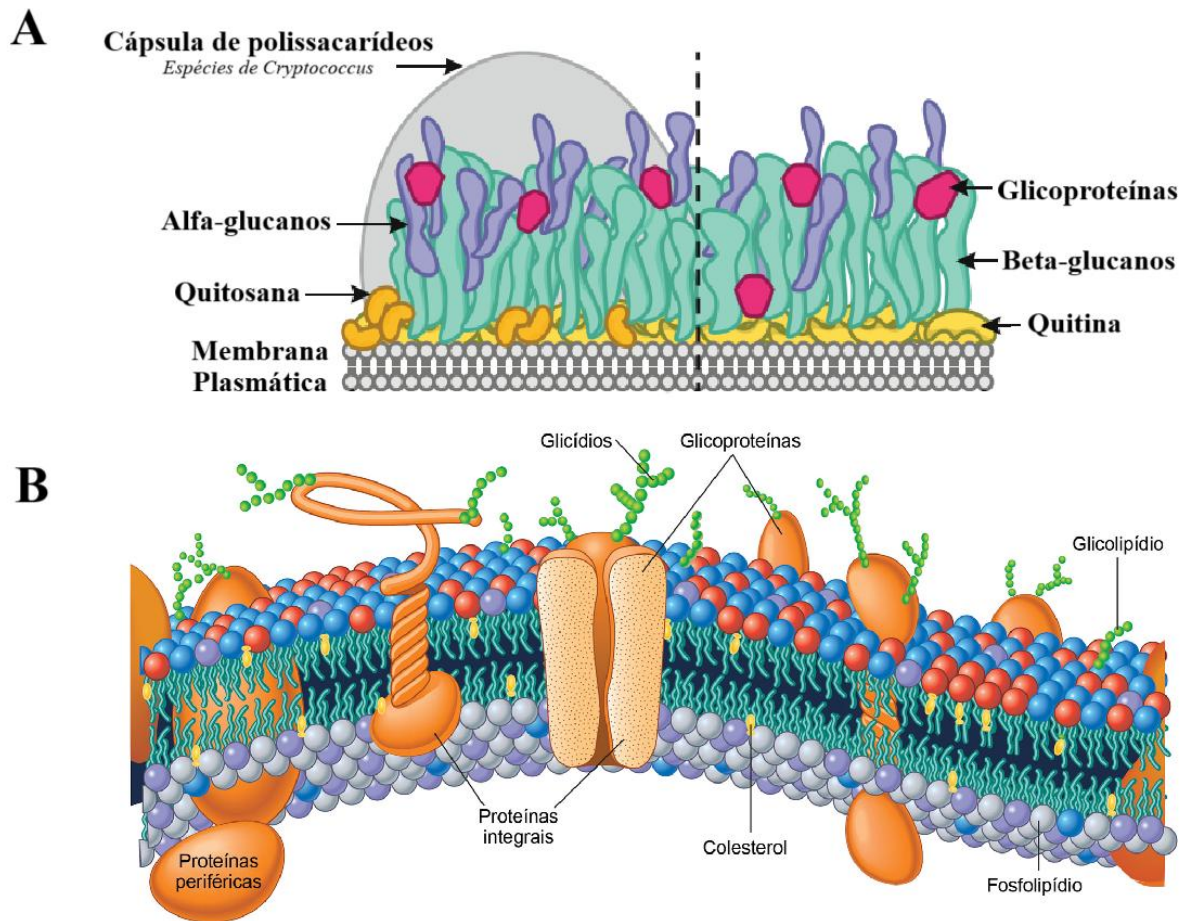
## 1.1 Fungos filamentosos: características morfológicas e composição bioquímica

Fungos filamentosos são um grupo de microrganismos eucarióticos caracterizados por sua diversidade de espécies, ampla distribuição, forte capacidade de adaptação e versatilidade metabólica (Li *et al.*, 2025). Os fungos podem produzir estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas. Conidiósporos ou esporangiósporos são estruturas assexuadas que produzem propágulos por divisão ou redistribuição de núcleos sem fusão nuclear. Dependendo do gênero, esses propágulos assexuados podem ser chamados de conídios ou esporos. Em contraste, estruturas sexuadas como cleistotécios, peritécios, basídios ou zigospórangios produzem propágulos após a união de dois núcleos haploides compatíveis (Powers-Fletcher *et al.*, 2016).

Os fungos apresentam três formas morfológicas principais: levedura unicelular, fungo filamentoso (mofo) e forma semelhante a levedura (pseudohifa). A característica principal atrelada a fungos filamentosos é a hifa. O crescimento da hifa fornece os meios para a colonização de substratos, secreção de enzimas hidrolíticas, assimilação de nutrientes, regulação da morfogênese e reconhecimento de sinais ambientais. Podem apresentar diferentes tipos de hifas, categorizadas como: (1) hifas vegetativas: penetram no meio artificial para absorver os nutrientes; (2) hifas aéreas: crescem acima da superfície do meio artificial; (3) hifas reprodutivas (férteis): hifas aéreas que carregam a estrutura reprodutiva (esporo); (4) hifas cenocíticas: hifas não septadas que permitem o fluxo ininterrupto de protoplasma e núcleos através do lúmen; (5) hifas septadas com células uninucleadas; (6) hifas septadas com células multinucleadas (Samanta, 2015; Roberson *et al.*, 2010). Quando as hifas diferenciam estruturas para reprodução assexuada ou sexuada ou para mediar interações entre espécies, a maquinaria celular básica das hifas pode ser reprogramada por meio da síntese de novas proteínas e/ou da modificação da atividade proteica (Riquelme *et al.*, 2018).

A composição e a estrutura da parede celular fúngica definem suas propriedades materiais, que sustentam sua capacidade de proteger as células das hifas e permitir seu crescimento. A parede celular é tensionada por uma grande pressão citoplasmática de várias atmosferas, chamada turgor, gerada osmoticamente. O turgor atua como um motor mecânico central para deformar porções recém-montadas da parede celular nas pontas das células e, assim, impulsionar o crescimento celular, mas também acarreta o risco de falha da parede celular e morte celular (Chevalier *et al.*, 2023).

**Figura 1- Composição da parede celular externa (A) e membrana plasmática (B) em fungos**



**Fonte: modificado de Brown; Esher; Alspaugh (2019)**

A parede celular (Fig. 1A) dos fungos é reconhecida como uma organela protetora essencial, especialmente para fungos terrestres, que acumulam uma grande concentração de moléculas osmoticamente ativas e estresses ambientais severos (Latgé e Wang, 2022). Desempenha um papel importante em diferentes funções biológicas, como controlar a permeabilidade celular e proteger a célula do estresse osmótico e mecânico. Localizada fora da membrana plasmática (Fig. 1B), ela é o compartimento celular que medeia todas as relações da célula com o ambiente, sendo composta por polissacarídeos e proteínas, além de lipídeos e pigmentos (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Apesar da extrema diversidade química em nanoescala, o modelo fisiológico básico da parede celular, em termos de seu design biofísico, é conservado em diversos fungos. No entanto, as propriedades arquitetônicas e mecânicas das paredes celulares fúngicas são adaptáveis e podem atender às necessidades de uma ampla diversidade de estilos de vida fúngicos comensais, simbióticos e patogênicos (Gow e Lenardon, 2023).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular fúngica, depois do  $\beta$ -1,3-glucano, e aparece como microfibrilas cristalinas na parede celular, desempenhando um

papel estrutural (Urbar-Ulloa *et al.*, 2019). A quitina é um homopolímero linear de N-acetilglucosamina ligada a  $\beta$ -1,4 (GlcNAc) e é essencial para a viabilidade celular. É um componente importante das matrizes extracelulares protetoras ou de suporte que recobrem o tecido que a produz ou todo o corpo do organismo. As fibras de quitina associam-se entre si adotando uma das três possíveis organizações cristalinas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -quitina (Moussian, 2019; Ibe e Munro, 2021). Embora a quitina fúngica seja um homopolímero relativamente simples, ela possui diversidade estrutural e funcional por meio de variações no tamanho e na estrutura das microfibrilas, bem como no comprimento do polímero e no grau de acetilação. Formas suficientemente desacetiladas de quitina, como a quitosana, são quimicamente distintas da molécula original (Brown; Esher; Alspaugh, 2019).

Os lipídeos são compostos hidrofóbicos e incluem, por exemplo, acilglicerídeos, ácidos graxos livres, esteróis e isoprenoides. São compostos de moléculas altamente reduzidas, e o fator redox que fornece elétrons para sua síntese é o NADPH, produzido principalmente pela via das pentoses fosfato e pela enzima málica. Os lipídeos são considerados um dos três macronutrientes, além dos carboidratos e das proteínas. São importantes como substâncias de armazenamento de energia e essenciais para a integridade celular, visto que a membrana celular e todas as membranas das organelas são formadas principalmente por lipídeos (Passoth, 2017). Os lipídeos da membrana celular geralmente se organizam em bicamadas, e podem participar diretamente de diversos eventos celulares como mensageiros ou reguladores da transdução de sinais. Também desempenham papéis importantes na regulação da germinação de esporos assexuados e do crescimento micelial, além de participarem de processos biológicos como crescimento vegetativo, desenvolvimento morfológico e infecção do hospedeiro por fungos filamentosos patogênicos (Peng e Chen, 2024).

As proteínas compõem 30–50% do peso seco da parede fúngica em leveduras e 20–30% do peso seco da parede dos fungos filamentosos. As proteínas estão firmemente fixadas à parede celular por meio de ligações covalentes entre a fração de açúcar ligada a N e O ou uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) aos polímeros de quitina e/ou glucana. As proteínas localizadas na parede celular desempenham uma ampla gama de funções e estão envolvidas na adesão a superfícies, na manutenção da forma celular, no transporte de macromoléculas, nas interações célula a célula, na proteção celular contra diferentes substâncias, na absorção de substâncias e na síntese e reorganização de componentes da parede. Cada um desses componentes da parede celular é vital para o desenvolvimento normal da célula fúngica e pode ser considerado um alvo potencial para agentes antifúngicos (Garcia-Rubio, 2020; Hasim e Coleman, 2019).

Os esteróis, componentes estruturais e funcionais essenciais da membrana plasmática, desempenham um papel crucial na regulação da dinâmica da membrana, da fluidez e das respostas celulares ao estresse ambiental. Entre eles, o ergosterol, um esterol C28 encontrado exclusivamente em fungos, emergiu como um ator central na sobrevivência fúngica. Sua biossíntese envolve uma via enzimática complexa que diverge da via de biossíntese do colesterol (esterol C27) em mamíferos, tornando-o um alvo farmacológico ideal com o potencial de interromper a viabilidade fúngica. Para além da estrutura da membrana, também apresenta funções relacionadas ao controle da virulência fúngica, a resistência a medicamentos e a evasão imunológica (Song *et al.*, 2025). Embora os esteróis sejam sintetizados no retículo endoplasmático, a maioria é transportada para outras organelas, notadamente a membrana plasmática, que contém até 90% dos esteróis celulares. Esse movimento é mediado principalmente por proteínas transportadoras de lipídeos específicas de esteróis, que são independentes da via secretora (Choy; Gaylord; Doering, 2023).

A ampla literatura disponível acerca da composição básica dos fungos e suas características morfológicas colaboram com a busca por novas moléculas com capacidade antifúngica, objetivando aplicações em diversas áreas, como agricultura, clínica e alimentos, e viabiliza a busca por otimização de tratamentos ou até mesmo a erradicação de patógenos.

### 1.1.1 *Fusarium spp.*

As espécies de *Fusarium* são os fungos fitopatogênicos e tóxicos mais importantes, distribuídos mundialmente, e seus esporos atuam como propágulos infecciosos que iniciam a infecção. *Fusarium* são fungos filamentosos encontrados no solo, pertencentes à classe Ascomycetes e à família Hypocreaceae. Este fungo é encontrado em regiões tropicais, subtropicais e também temperadas (Ajmal *et al.*, 2022). Os fungos desse gênero são conhecidos por produzirem uma variedade de toxinas com grandes implicações para a produção agrícola. Podem causar uma série de doenças tanto em ambientes agrícolas quanto naturais, como podridões, pragas, cancos e murchas em plantações florestais, plantas ornamentais e hortícolas. Podem ser encontrados em plantas e solos em todo o mundo na forma de patógenos, fungos endofíticos e sapróbios (Ejaz *et al.*, 2023).

Na agricultura, as espécies de *Fusarium* desempenham um impactante papel, visto que alguns fungos podem produzir pragas devastadoras nos campos. Uma das pragas mais relevantes é induzida por *F. graminearum* em trigo, cevada, aveia, centeio e triticale, induzindo a chamada cegueira da cabeça de *Fusarium* (às vezes chamada de cegueira da orelha de

*Fusarium*); outras espécies de *Fusarium*, como *F. tricinctum*, também são capazes de desencadear tais doenças em plantas (Hof e Schrecker, 2024). Em alguns casos, também são indiretamente responsáveis pela ocorrência de distúrbios alérgicos e intoxicações entre os consumidores, uma vez que os cereais são o principal substrato disponível durante a estação de crescimento e a contaminação fúngica é acompanhada da produção de micotoxinas que são, posteriormente, ingeridas pelo consumidor (Kursa *et al.*, 2022).

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma cucurbitácea muito apreciada, cultivada por seus frutos doces e saborosos. A cultura ocupa uma área considerável de cultivo em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Dhami *et al.*, 2024). O melão é a terceira fruta mais exportada do Brasil (Abrafrutas, 2024) com uma produção anual de 862.387 toneladas (FAO, 2023). A região Nordeste é a maior produtora de melão do país, representando mais de 90% da produção nacional (Vieira *et al.*, 2024).

Relatórios de exportadores brasileiros de melão indicam que 15% dos melões exportados apresentam sintomas de doenças pós-colheita ao chegar ao destino e, conseqüentemente, são descartados (~ 35 mil megagramas; ~ 23 milhões de dólares), e uma das principais doenças pós-colheita é a podridão causada por *Fusarium* (Arge *et al.*, 2024). Patógenos do gênero *Fusarium* são responsáveis por perdas significativas na produção de melão, e novas espécies fúngicas do complexo *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) têm sido descobertas, como *Fusarium jinanense* Han, Wang & Cai, e também apontadas como capazes de causar podridão nos frutos, o que pode comprometer a produção nacional (De Freitas *et al.*, 2024).

Espécies de *Fusarium* prejudicam vários aspectos da morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas. Podem causar redução da biomassa vegetal, aumento do estresse oxidativo, diminuição da atividade enzimática, menor taxa de fotossíntese, alterações na condutância estomática e níveis mais elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vazamento de eletrólitos, MDA (malondialdeído), proteína e prolina, que são identificados como indicadores de estresse (Mahmood *et al.*, 2024).

Pesquisadores buscam novas soluções seguras de proteger as plantações contra patógenos, e seus esforços incluem a busca por novos compostos biologicamente ativos com o objetivo de limitar o desenvolvimento de fungos patogênicos, inibir a produção de micotoxinas e causar baixo impacto negativo no meio ambiente (Kursa *et al.*, 2022). Por este motivo, o interesse em explorar a atividade antifúngica de moléculas de plantas tem aumentado e incentivado o surgimento de expectativas da substituição de antifúngicos convencionais.

### 1.1.2 *Colletotrichum* spp.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* (filo: Ascomycota, classe: Sordariomycetes) são amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. As espécies do gênero apresentam ciclos de vida semelhantes, podendo estar presentes em sementes ou crescendo saprofitamente em restos vegetais no solo. As epidemias causadas por fungos desse gênero geralmente são iniciadas a partir de conídios que se dispersam e atingem superfície das plantas, germinando e penetrando no tecido do hospedeiro em condições favoráveis (Salotti; Ji; Rossi, 2022).

Muitas espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* estão envolvidas em doenças de plantas, atingindo uma ampla gama de hospedeiros. Hospedeiros comuns incluem muitas plantas dicotiledôneas, como morango, maçã, frutas cítricas e frutas de caroço, além de cereais importantes como o milho e o sorgo (Talhinhas e Baroncelli, 2021). Considerado um dos 10 principais fungos patogênicos de plantas, *Colletotrichum* spp. é o agente causador da antracnose em mais de 3.000 espécies de plantas, levando à redução considerável da produtividade de culturas economicamente importantes (Bouffleur *et al.*, 2021).

A infecção por antracnose ocorre comumente nos campos durante as fases de floração e frutificação. Os sintomas mais visíveis são lesões afundadas, pretas ou marrom-escuras, contendo massas de conídios na superfície dos frutos infectados. Pequenas lesões individuais podem se fundir e produzir lesões maiores (Zakaria, 2021). A principal abordagem para o manejo desta doença tem sido a resistência genética; no entanto, devido ao alto grau de heterogeneidade na população do patógeno, a resistência específica do hospedeiro é frequentemente instável. Os mecanismos subjacentes à resistência à antracnose permanecem pouco compreendidos, apesar de muitas fontes de resistência genética terem sido identificadas (Tsedaley e Alemu, 2025). A pitaya está incluída entre as cultivares afetadas por antracnose causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. Relatórios foram publicados constatando a presença do fungo *Colletotrichum tropicale* em cultivares de pitaya no Brasil (Souza *et al.*, 2023; Inokuti *et al.*, 2024) e no México (Nuñez-García *et al.*, 2023).

A pitaya, também conhecida como fruta-dragão, é uma fruta comestível pertencente ao gênero *Hylocereus* (família Cactaceae). É nativa do sul do México, Guatemala e Costa Rica, e amplamente distribuída por regiões tropicais e subtropicais (Dos Santos *et al.*, 2025). O alto teor de compostos nutricionais presentes na pitaya despertou o interesse da indústria alimentícia em relação ao seu uso como ingredientes econômicos, ecologicamente corretos, de origem vegetal e com “rótulos limpos”. Os polissacarídeos e polifenóis da pitaya são antioxidantes bem conhecidos e podem ser usados para enriquecimento prebiótico, bem como como corantes

naturais (betanina) em produtos alimentícios (Huang *et al.*, 2021). No entanto, com o aumento da área de cultivo, as doenças da pitaya estão se tornando um problema importante, resultando na deterioração dos frutos, redução da vida útil e perdas econômicas (Zhang *et al.*, 2024).

Na pitaya, a antracnose é considerada uma doença muito prejudicial que afeta tanto a planta quanto o fruto. Por conta disso, vários métodos têm sido sugeridos para o controle da doença, especialmente o uso de substâncias químicas, mas a pressão regulatória em relação aos agroquímicos e seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente tem se tornado uma preocupação crescente (Bello *et al.*, 2022). Desta forma, a busca por novas alternativas ecologicamente corretas tem sido incentivada de maneira crescente nos últimos anos.

## 1.2 Infecções fúngicas em plantas

A grande maioria das espécies de fungos conhecidas são saprófitas estritas; apenas poucas espécies (menos de 10% dos fungos identificados) conseguem colonizar plantas. No entanto, os fungos fitopatogênicos são os principais agentes causadores, entre os fitopatógenos, de epidemias devastadoras em plantas cultivadas, além de causar perdas persistentes e substanciais na produtividade agrícola anualmente (El-Baky e Amara, 2021). As plantas cultiváveis são constantemente atacadas por patógenos, tanto no pré quanto na pós-colheita, frequentemente causando redução no seu valor nutricional e organoléptico (Kursa *et al.*, 2022).

Os fitopatógenos interagem principalmente com a cutícula da folha ou com a casca do caule, se infectarem as partes aéreas, ou com exsudatos radiculares antes de penetrar na epiderme radicular, se infectarem as raízes. Portanto, o tipo de tecido invadido afeta as respostas de defesa da planta (Cheaib e Killiny, 2025). Basicamente, as plantas lidam com ataques por dois mecanismos: desenvolvem estruturas físicas como espinhos, que agem como medidas preventivas, ou produzem e secretam muitas substâncias químicas em resposta à infecção ou ataque desses patógenos (Jain *et al.*, 2022).

Ao contrário dos mamíferos, as plantas não possuem um sistema imunológico adaptativo somático com células defensoras móveis. Em vez disso, dependem da imunidade inata exercida por cada célula, com sinais sistêmicos emergindo das células infectadas e da capacidade das células vegetais de se lembrarem de infecções anteriores (Nishad *et al.*, 2020). A primeira linha de defesa da planta contra o ataque de patógenos pode envolver respostas imediatas do sistema imunológico com imunidade desencadeada por padrões (PTI). A PTI é desencadeada por padrões microbianos conservados (padrões moleculares associados a patógenos), que são detectados por meio de receptores de reconhecimento de padrões. Proteínas efetoras secretadas

por patógenos ativam a imunidade desencadeada por efetores (ETI) quando reconhecidas por receptores de repetição ricos em leucina do domínio de ligação a nucleotídeos, que estão predominantemente localizados dentro da célula vegetal (Honig *et al.*, 2023; Santos e Franco, 2023).

Para infectar e colonizar um hospedeiro com sucesso, os fitopatógenos precisam superar um repertório de compostos de defesa vegetal com amplas propriedades antimicrobianas. Esses compostos são frequentemente subclassificados como fitoalexinas, aqueles induzidos em resposta à infecção, e/ou fitoanticipinas, que existem como compostos antimicrobianos pré-formados no tecido vegetal (Westrick; Smith; Kabbage, 2021). A ativação de fitoanticipinas envolve hidrolases (enzimas vegetais) que são liberadas somente após a degradação das células. Por outro lado, as fitoalexinas são produzidas pelas plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Elas são formadas a partir de precursores remotos somente em resposta ao ataque de patógenos (Tiku, 2020).

A quitinase e a glucanase são exemplos de proteínas de resposta à patogênese, ambas atacando diretamente os componentes estruturais de insetos e fungos. Dependendo da fonte, as quitinases vegetais podem ser ácidas ou básicas. A enzima se expressa continuamente em diversas partes da planta, como flores, sementes, tubérculos e caules. As quitinases também podem atuar de forma semelhante às quitosanases (induzidas em plantas como resposta à interação patogênica) e são capazes de degradar a quitosana, presente em componentes estruturais da parede celular de algumas espécies de fungos. As quitinases têm ação eficiente na degradação da quitina, um componente vital da parede celular fúngica, um dos motivos responsáveis pelo seu potencial antifúngico (Vaghela *et al.*, 2022; Dos Santos e Franco, 2023).

Diversas estratégias já são utilizadas na produção agrícola para controlar a ação de fitopatógenos. Apesar de os fungicidas sintéticos terem beneficiado a produção agrícola por décadas, atualmente, o uso desses produtos químicos é restrito ou desencorajado por diversos motivos. Sua aplicação excessiva ou uso indevido tem levantado sérias preocupações, incluindo seu impacto no meio ambiente, a contaminação da água potável e o efeito na saúde humana e na pecuária (Seepe; Nxumalo; Amoo, 2021). Devido aos riscos relacionados aos fungicidas sintéticos, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de métodos alternativos e eficazes para o controle de doenças de plantas (Sharma *et al.*, 2021).

Um dos problemas consequentes do uso indevido dos fungicidas convencionais é a resistência aos seus mecanismos de ação. A resistência a fungicidas no agroecossistema é considerada uma das ameaças mais sérias à segurança alimentar. À medida que a resistência a fungicidas se torna mais prevalente, sua eficácia diminui, resultando em maiores perdas nas

colheitas. Portanto, a resistência aos fungicidas pode resultar em impactos econômicos substanciais nos lucros dos agricultores e nas receitas comerciais do país com o Produto Interno Bruto – PIB (Ceresini *et al.*, 2024). Conforme Yin e colaboradores (2023), os mecanismos moleculares comuns de resistência a fungicidas incluem (1) mutações no alvo do fungicida, levando a uma afinidade diminuída do fungicida à proteína alvo; (2) superexpressão ou duplicação do gene alvo do fungicida, levando ao aumento da produção da proteína alvo; (3) superexpressão do cassete de ligação de ATP ou dos principais transportadores da superfamília de facilitadores que codificam bombas de efluxo; e (4) alterações epigenéticas.

A introdução de novos fungicidas e a descoberta de moléculas com potencial antifúngico são elementos essenciais para o controle sustentado das principais doenças que acometem cultivares. Com a crescente compreensão dos processos biológicos, tanto em patógenos fúngicos quanto em plantas hospedeiras, o desenvolvimento de fungicidas seletivos com um melhor controle de doenças tem aumentado (Thind, 2021). Produtos naturais, com vantagens como biocompatibilidade, diversidade estrutural e mecanismos de ação únicos, são considerados uma fonte importante para o desenvolvimento de novos fungicidas (Zheng *et al.*, 2024).

### **1.3 Mecanismos de ação de proteínas vegetais contra fungos**

As plantas terrestres estão constantemente sujeitas a múltiplas condições ambientais desfavoráveis ou mesmo adversas. Entre elas, estresses abióticos (como salinidade, seca, calor, frio, metais pesados, ozônio, radiação UV e deficiências de nutrientes) têm efeitos prejudiciais ao crescimento e à produtividade das plantas (Mareri; Parrotta; Cai, 2022). Além dos estresses abióticos, as plantas também estão sujeitas a bióticos, que consistem no ataque à planta causado por patógenos (bacterianos, fúngicos, virais). Tanto os estresses bióticos quanto os abióticos são prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, pois são conhecidos por causar diversas disfunções metabólicas e, em casos extremos, podem até causar a morte da planta (Kaur *et al.*, 2020).

Durante a interação planta-patógeno, a planta libera vários tipos de elicitores. Esses elicitores são reconhecidos por genes de resistência da planta e desencadeiam diversas alterações bioquímicas e fisiológicas nas plantas (Kaur *et al.*, 2022). Nos estágios iniciais da infecção, as plantas produzem proteínas que se acumulam, e muitas dessas proteínas têm atividade antimicrobiana e podem induzir a produção de compostos estruturais. Essas proteínas podem atuar na reação de hipersensibilidade, acelerando a morte celular, limitando a

propagação de fitopatógenos. Dentre essas proteínas, destacam-se as proteínas relacionadas à patogênese (PR), capazes de induzir o sistema imunológico inato da planta (Dos Santos e Franco, 2023).

As proteínas PR são componentes-chave da resistência sistêmica adquirida, que é uma resposta imune induzível da planta que previne novas infecções da porção não infectada do hospedeiro. O termo "proteína PR" refere-se a um conjunto de diferentes proteínas induzidas por agentes fitopatogênicos, bem como moléculas sinalizadoras relacionadas à defesa (Chen *et al.*, 2022). São membros de uma grande família de proteínas em plantas relacionadas à estresses abióticos e bióticos, e a superexpressão dessas proteínas torna as plantas tolerantes a esses estresses. Com base na estrutura primária, composição de aminoácidos, atividades bioquímicas e relacionamento sorológico, as proteínas PR foram classificadas em 17 famílias:  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, 4, 8 e 11), proteínas semelhantes à taumatina (PR-5), proteínas inativadoras de ribossomos (PR-10), defensinas (PR-12), tioninas (PR-13) e proteínas de transferência de lipídeos (PR-14) (Manghwar e Hussain, 2022).

Os respectivos mecanismos de ação disponíveis na literatura acerca das proteínas mencionadas serão abordados nos subtópicos posteriores, como complementação teórica alinhada ao objetivo do presente trabalho.

### 1.3.1 $\beta$ -1,3-glucanases

A parede celular vegetal é uma estrutura composta dinâmica com diversas funções, incluindo suporte mecânico e estrutural para o crescimento da planta. As plantas desenvolveram mecanismos complexos para montar, modificar e desmontar os diversos componentes da parede.  $\beta$ -glucanas, incluindo celulose, calose, xiloglucana e glucana de ligação mista, são constituintes estruturais predominantes da parede na maioria dos tipos de células vegetais (Perrot; Pauly; Ramírez, 2022). A  $\beta$ -1,3-glucanase (E.C.3.2.1.39) é uma classe de enzimas que tipicamente catalisa a clivagem de ligações  $\beta$ -1,3-D-glucosídicas. Em plantas, as  $\beta$ -1,3-glucanases constituem famílias proteicas altamente complexas e diversas e desempenham papéis importantes em diversas funções fisiológicas e atividades de defesa. Pesquisas anteriores sobre  $\beta$ -1,3-glucanase concentraram-se principalmente em seu papel como uma proteína PR, devido aos transcritos de  $\beta$ -1,3-glucanase serem induzidos por infecções causadas por patógenos (Fang *et al.*, 2024).

As  $\beta$ -1,3-glucanases foram agrupadas na família PR-2 e, em sua maioria, são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 6-43 kDa). Foram subdivididas em dois subgrupos,

incluindo as  $\beta$ -1,3-glucanases ácidas e as  $\beta$ -1,3-glucanases básicas. As  $\beta$ -1,3-glucanases ácidas são geralmente secretadas para o espaço extracelular, enquanto as  $\beta$ -1,3-glucanases básicas são normalmente transportadas para o vacúolo por meio de um peptídeo sinal localizado na extremidade N-terminal. As  $\beta$ -1,3-glucanases pertencem a diferentes famílias de glicosídeos hidrolases devido às sequências de aminoácidos conservadas em seus sítios ativos. São categorizadas em exo- ou endo- tipos, com base no seu mecanismo de ação sobre o substrato. As exo- $\beta$ -1,3-glucanases clivam unidades de glicose das extremidades não redutoras, enquanto as endo- $\beta$ -1,3-glucanases dividem aleatoriamente a cadeia de glucana, produzindo monossacarídeos e oligossacarídeos (Taif *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2024).

As  $\beta$ -1,3-glucanases estão envolvidas em vários processos vegetais, como hibernação, alongamento da inflorescência, desenvolvimento do gametófito masculino, polinização, desenvolvimento e germinação de sementes, fisiologia dos frutos, defesa contra estresses bióticos e abióticos e absorção de nutrientes de organismos heterotróficos.  $\beta$ -1,3-glucanases extracelulares específicas ligam-se à superfície dos cristais de gelo, limitando seu crescimento no apoplasto e proporcionando crioproteção (Rajninec *et al.*, 2021).

Algumas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases de plantas demonstram apresentar atividade antifúngica. Isso se deve ao fato de que as paredes celulares fúngicas contêm quitina, quitosana,  $\beta$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,6-glucana,  $\beta$ -1,3-/ $\beta$ -1,4-glucana mista,  $\alpha$ -1,3-glucana, manana, manoproteína e melanina como constituintes principais (Takashima *et al.*, 2023), o que faz com que as  $\beta$ -1,3-glucanases possam interagir e degradar diretamente a parede celular de alguns patógenos, além de serem capazes de estimular a produção de outros compostos antifúngicos como consequência da liberação de substâncias derivadas da parede celular, funcionando também como um indutor de respostas de defesa (Gao *et al.*, 2023).

### 1.3.2 Quitinases

A quitina está presente na parede celular dos fungos e demonstrou participar dos fenômenos de reconhecimento planta-patógeno e da ativação de mecanismos inatos de defesa vegetal. A presença de receptores em plantas que reconhecem quitina e oligossacarídeos de quitina tem sido amplamente demonstrada na literatura (García *et al.*, 2021). A quitina é um biopolímero de N-acetil-D-glucosamina com ligação  $\beta$ -1,4 e é o principal componente dos exoesqueletos de artrópodes e das paredes celulares de muitos fungos. O conteúdo de quitina na parede celular de fungos difere de acordo com a fase morfológica, representando apenas 1–

2% do peso seco da parede celular em leveduras, mas atingindo até 10–20% do peso seco da parede celular dos fungos filamentosos (Kozome *et al.*, 2022; Gong; Zhang; Liu, 2023).

As quitinases vegetais (endo-quitinases, EC 3.2.1.14) são hidrolases glicosídicas que decompõem as ligações  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina da quitina. Como as plantas não possuem quitina, o verdadeiro substrato das quitinases em plantas vasculares é desconhecido (Zielinski *et al.*, 2021). A massa molecular das quitinases vegetais, conforme demonstrado pelos estudos de purificação, varia de 20 a 60 kDa, com pontos isoelétricos ácidos e básicos. Com base no mecanismo catalítico e na similaridade nas sequências de ácidos nucleicos, as quitinases vegetais são classificadas nas famílias glicosil hidrolases (GH), GH18 e GH19 (Khan *et al.*, 2024). Essa enzima é expressa continuamente em diversas partes da planta, como flores, sementes, tubérculos e caules. A detecção de quitinases vegetais começa nos estágios iniciais de crescimento, e são encontradas principalmente em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Vaghela *et al.*, 2022).

Como parte da resposta de defesa da planta, as quitinases podem lisar patógenos direta ou indiretamente, enfraquecendo suas paredes celulares. Ao quebrar a quitina, as quitinases inibem o crescimento de fungos e causam a liberação de nutrientes essenciais que as plantas podem usar para seu crescimento e desenvolvimento (Shobade; Zabolina; Nilsen-Hamilton, 2024). As quitinases vegetais geralmente contêm uma região peptídica de sinal N-terminal, um domínio de ligação à quitina rico em cisteína, uma região de ligação cruzada variável (dobradiça) e um domínio catalítico C-terminal, que são altamente conservados. Além disso, com base nas relações de estrutura, evolução, reação catalítica, função e substratos das quitinases, elas são classificadas em sete classes distintas (Classe I-VII). A família de enzimas GH18 contém quitinases de Classe III e Classe V, e GH19 inclui as classes I, II, IV, VI e VII. Ao contrário das quitinases GH19, que são encontradas majoritariamente em plantas superiores, as da família GH18 estão amplamente dispersas entre diversos organismos (Chen *et al.*, 2024; Xuan *et al.*, 2024).

### 1.3.3 Proteínas semelhantes à taumatina e osmotina

As proteínas semelhantes à taumatina (PSTs) constituem uma família proteica complexa e evolutivamente conservada que participa da defesa do hospedeiro e de diversos processos de desenvolvimento em plantas, fungos e animais. As PSTs são proteínas de defesa do hospedeiro vegetal que pertencem à família PR-5, e evidências crescentes demonstram que elas estão envolvidas na resistência a uma variedade de doenças fúngicas em muitas plantas cultivadas,

particularmente leguminosas (Feng; Wei; Li, 2024). Em plantas, as PSTs são diferenciadas em dois tipos com base em seu peso molecular: tipo L (variando de 22 a 26 kDa) e tipo S (menos de 18 kDa). Essas proteínas são caracterizadas pela presença de 10 resíduos de cisteína nas PSTs do tipo S e 16 resíduos de cisteína nas PSTs do tipo L, formando ligações dissulfeto que promovem estabilidade em condições estressantes, como pH, calor e degradação por proteases. Além disso, as PSTs compartilham dois motivos conservados: o motivo REDDD (contendo arginina, ácido glutâmico e três resíduos de ácido aspártico) e o motivo-assinatura da taumatina, G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-G-X-(2,3)-C. O motivo REDDD está envolvido na ligação ao receptor para sua ação antifúngica (Zhao *et al.*, 2024). O mecanismo de ação das PSTs na resistência a fungos é ambíguo. Presume-se que essas proteínas atuem por degradação e permeabilização das paredes celulares dos fungos. Além disso, sabe-se que as PSTs também estão envolvidas na ação anticongelante e na resistência ao estresse abiótico em plantas. Há relatos de que também estão envolvidas em vários processos de desenvolvimento, como, por exemplo, floração, amadurecimento de frutos e germinação de sementes (Sharma *et al.*, 2022).

Proteínas semelhantes à osmotina (PSOs), originalmente isolada de células de tabaco sob estresse osmótico, pertencem ao grupo PR-5, com peso molecular de 24 a 26 kDa. As PSOs exibem diversas atividades biológicas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticongelante, antiestresse osmótico, atividade da  $\beta$ -1,3 glucanase, funções de desenvolvimento e aquelas funcionalmente semelhantes à adiponectina de mamíferos, envolvidas na resistência sistêmica adquirida e hipersensibilidade em plantas (Deng *et al.*, 2024). A osmotina atua como antifúngico impedindo a germinação de esporos, inibindo o crescimento de hifas, aumentando a lise e reduzindo a viabilidade dos esporos. Seu efeito citotóxico é aumentado em fungos suscetíveis, iniciando vias de transdução de sinal intercelular através dos genes STE7, a fim de enfraquecer a parede celular fúngica. Em seguida, a cascata de proteína quinase ativada por mitógeno, que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática defensiva, permite que a osmotina penetre na membrana, levando à formação de poros transmembranares, o que causa vazamento na membrana e, por fim, resulta em sua ruptura. Um experimento com esferoplastos, fungos e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) mostrou que a membrana plasmática é o principal alvo da proteína osmotina (Bashir *et al.* 2020).

#### 1.3.4 Proteínas inativadoras de ribossomos

As proteínas inativadoras de ribossomos (PIRs) são enzimas tóxicas que inibem irreversivelmente o processo de tradução ribossomal, removendo seletivamente um resíduo de adenina do componente 28S da subunidade ribossômica 60S. As PIRs são produzidas predominantemente por plantas e certas bactérias (Sharma *et al.*, 2023). A maioria das PIRs apresenta atividade contra os ribossomos de bactérias, leveduras, animais e plantas, atuando também como quitinases, lipases e desoxirribonucleases (Jain *et al.*, 2022).

As PIRs são classificadas em três tipos com base na estrutura de seus domínios proteicos. As PIRs do tipo I são proteínas de cadeia única com peso molecular de aproximadamente 30 kDa que possuem atividade enzimática de RNA N-glicosidase. As PIRs do tipo II possuem uma cadeia A com atividade de RNA N-glicosidase e uma ou mais cadeias B ligadas por uma ponte dissulfeto. A cadeia B é um peptídeo semelhante à lectina com alta afinidade por resíduos de galactose na superfície celular, o que facilita a translocação através da membrana plasmática; assim, a cadeia B permite que a cadeia A entre na célula. As PIRs do tipo III compreendem um domínio amino-terminal semelhante às PIRs do tipo I, com uma região carboxi-terminal com função incerta. Algumas das PIRs bem estudadas, como ricina, abrina e saporina, permitem o funcionamento do rRNA homólogo e a tradução nas células, pois permanecem inibidos no citosol ou compartimentados nos vacúolos e apoplastos. Além disso, sua alta especificidade para ribossomos permite a inibição seletiva do rRNA heterólogo e protege a planta de pragas de insetos ou fungos, inibindo a tradução. Na maioria dos casos, as PIRs são responsáveis pela remoção de uma adenina específica localizada na alça  $\alpha$ -sarcina/ricina ( $\alpha$ -SRL) do rRNA. Isso resulta na inibição da ligação do fator de alongamento. Como a alça  $\alpha$ -SRL foi despurinada, o sítio de ligação do GTP perde sua capacidade de estimular a hidrólise do GTP, resultando na inibição da síntese proteica (Mishra; Mishra; Shamra, 2022; Kocyigit *et al.*, 2023).

### 1.3.5 Defensinas

O grupo de peptídeos antimicrobianos de defesa abundantemente disponível em todo o reino vegetal é o das defensinas vegetais. As defensinas vegetais são constitutivamente expressas no espaço extracelular da maioria dos tecidos vegetativos e reprodutivos de plantas e podem ser induzidas especificamente sob condições de estresse causado por patógenos. São pequenas proteínas catiônicas solúveis, com tamanho de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, exibindo oito resíduos de cisteína conservados (C1 a C8) com um padrão de espaçamento conservado. A estrutura tridimensional das defensinas compreende três folhas  $\beta$  antiparalelas e

uma  $\alpha$ -hélice paralela às folhas  $\beta$ . A estabilidade das defensinas vegetais é mantida por quatro ligações dissulfeto que incluem um motivo  $C\alpha\beta$  cisteínico (Chiu; Poucet; Li, 2022; Ghosh e Roychoudhury, 2024). As defensinas possuem diferentes mecanismos de ação antifúngica, seus alvos sendo, na maioria das vezes, os componentes da membrana celular. A carga positiva total das defensinas vegetais proporciona interação eletrostática inicial com componentes carregados negativamente da parede celular e da membrana fúngica (Finkina *et al.*, 2024).

As defensinas vegetais têm como alvo diferentes lipídeos da membrana de leveduras e fungos filamentosos. A glicosilceramida (GlcCer) é o glicoesfingolípido mais simples, do qual deriva uma grande diversidade de glicolipídeos da membrana plasmática de fungos, plantas e animais. A defensina RsAFP2 do rabanete, por exemplo, interage com a GlcCer na membrana plasmática de *Candida albicans* e *Komagataella phafi* suscetíveis, e essa interação leva à subsequente permeabilização e à interrupção do crescimento celular (Manzanares *et al.*, 2024). Algumas defensinas vegetais apresentam alto grau de especificidade de ligação a lipídeos. No entanto, outras defensinas capazes de permeabilizar a membrana não são conhecidas por apresentarem especificidade para nenhum componente específico da membrana; a contribuição exata da ligação lipídica para a atividade antifúngica ainda é majoritariamente desconhecida (Shahmiri *et al.*, 2023).

Além de atuar se ligando à membrana, as defensinas e peptídeos semelhantes também são capazes de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em uma explosão oxidativa, perda de funcionalidade mitocondrial e retração citoplasmática no fungo causador de antracnose *Colletotrichum scovillei*, conforme relatado por Resende e colaboradores (2024). A indução da permeabilização da membrana plasmática e a produção de EROs também são características de outras defensinas vegetais relatadas na literatura, como PvD1, AFP1, So-D2 de espinafre, CaDef2.1 e CaDef2.2 de *Capsicum annuum* (Finkina *et al.*, 2024).

### 1.3.6 Tioninas

As tioninas são peptídeos antimicrobianos encontrados apenas em plantas. São inicialmente produzidas como pré-pró-proteínas e, em seguida, processadas para produzir o peptídeo tionina básico, geralmente de 5 kDa, com três ou quatro pontes dissulfeto. As tioninas são encontradas, majoritariamente, em algumas famílias de plantas de angiospermas (Höng *et al.*, 2021). O nome “tionina” representa uma família de peptídeos homólogos. Estruturalmente, as tioninas são descritas como um peptídeo anfipático básico com duas hélices  $\alpha$  antiparalelas,

uma folha  $\beta$  antiparalela de duas fitas e três a quatro pontes dissulfeto. A estrutura secundária conservada se organiza em um padrão de  $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2$ , que, por fim, resulta em uma estrutura terciária semelhante à letra grega  $\Gamma$  (Azmi e Hussain, 2021). Com base nas semelhanças na sequência e estrutura das proteínas, as tioninas vegetais podem ser divididas em dois subtipos principais: as  $\alpha/\beta$ -tioninas e as  $\gamma$ -tioninas, que compartilham apenas cerca de 25% de similaridade de sequência. Como as  $\gamma$ -tioninas se assemelham às defensinas tanto na sequência quanto na estrutura, as  $\gamma$ -tioninas podem ter sido identificadas como defensinas ou confundidas com elas em alguns estudos (Liu *et al.*, 2023).

Conforme relatado por Das (2024), a maquinaria envolvida na atividade antimicrobiana desses peptídeos ainda é desconhecida, podendo estar associada a formação de poros. Suspeita-se que as tioninas, altamente carregadas positivamente, interajam com as membranas celulares carregadas negativamente e criem poros. O lado esquerdo da haste helicoidal e a parte inferior da molécula contêm principalmente componentes hidrofóbicos, enquanto a curva interna entre a haste helicoidal e o braço  $\beta$  é predominantemente hidrofílica. Quando esses peptídeos interagem com as membranas, eles tendem a formar agregados, formando ainda mais poros, permitindo que as regiões hidrofóbicas interajam com o grupo polar das caudas, enquanto as regiões hidrofílicas se estendem em direção à fase aquosa. A formação de poros resulta na ruptura da membrana e no vazamento do conteúdo intracelular, finalmente ocasionando a destruição das células.

### 1.3.7 Proteínas de transferência de lipídeos

Também conhecidas como proteínas de transferência de lipídeos não específicas ou proteínas de transferência de lipídeos vegetais (PTLs), os peptídeos deste grupo compreendem uma cavidade hidrofóbica em forma de túnel, capaz de acomodar lipídeos e outros ligantes, dependendo de sua natureza química. Acredita-se que muitas das funções desempenhadas pelas PTLs estejam associadas à sua capacidade de se ligar e transportar lipídeos e outras moléculas hidrofóbicas (Amador *et al.*, 2021). A maioria dos lipídeos celulares é sintetizada no retículo endoplasmático e, como os lipídeos não conseguem se difundir eficientemente pelo ambiente citosólico aquoso, são transportados para outros compartimentos celulares por transporte vesicular ou não vesicular. O transporte não vesicular de lipídeos é realizado pelas PTLs (Kang *et al.*, 2025).

As PTLs são pequenas proteínas (pesos moleculares variando de 6,5 a 10 kDa) que existem em todas as plantas terrestres. Elas possuem oito motivos de resíduos de cisteína que

formam quatro pontes dissulfeto conservadas, que ajudam a estabilizar a estrutura terciária do peptídeo, e muitas  $\alpha$ -hélices com uma cavidade hidrofóbica central capaz de se ligar a uma variedade de lipídeos. Quase todas as PTLs carregam um sinal N-terminal que localiza a proteína no nível subcelular (Gao *et al.*, 2022). As PTLs de plantas possuem atividade antimicrobiana altamente específica contra patógenos específicos. As PTLs isoladas de sementes de cebola exibiram forte atividade antifúngica contra diversos patógenos fúngicos, enquanto uma PTL de semente de rabanete demonstrou apenas um efeito moderado contra fungos. Já as PTLs de sementes de milho e trigo foram relatadas como ineficazes contra infecções fúngicas. Assim como outras classes de peptídeos antimicrobianos vegetais, a atividade antimicrobiana das PTLs também diminui na presença de soluções iônicas e seu nível de patogenicidade varia com o tipo de PTL (Iqbal *et al.*, 2023).

O estudo realizado por Liu e colaboradores (2025) sugeriu que as PTLs são capazes de inibir a germinação de esporos e retardar o alongamento das hifas em fungos fitopatogênicos sem induzir distorções morfológicas. As PTLs são capazes de realizar ligação reversível com diversos lipídeos como esteróis, derivados acil da coenzima A, ácidos graxos e outros. Essas características permitem que as PTLs atuem no transporte de lipídeos através das membranas, o que pode estar associado a permeabilização de membranas de fitopatógenos. No entanto, ainda não há esclarecimento acerca dos detalhes do mecanismo de ação envolvido na atividade antimicrobiana (Maximiano e Franco, 2021).

#### **1.4 Moringa (*Moringa oleifera*) e seu potencial biotecnológico**

A *Moringa oleifera* é uma árvore de rápido crescimento e resistente à seca, pertencente à família Moringaceae. É amplamente cultivada para o uso diversificado de suas vagens jovens e folhas verdes como vegetais e na medicina popular. É conhecida como a “árvore milagrosa” devido às suas diversas propriedades benéficas como, por exemplo, 10 vezes mais vitaminas do que cenouras, 7 vezes mais vitamina C do que laranjas, 17 vezes mais cálcio do que leite e 15 vezes mais potássio do que bananas (Islam *et al.*, 2021). A moringa prospera globalmente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais, mas acredita-se que seja nativa do Afeganistão, Bangladesh, Índia e Paquistão. A família da moringa engloba 13 espécies (*M. oleifera*, *M. arborea*, *M. rivae*, *M. ruspoliana*, *M. drouhardii*, *M. hildebrandtii*, *M. concanensis*, *M. borziana*, *M. longituba*, *M. pygmaea*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. stenopetala*), das quais a *M. oleifera* tornou-se bem conhecida por seu uso em nutrição, produção de biogás, fertilizantes etc. (Pareek *et al.*, 2023).

As abundantes propriedades bioativas e nutricionais desta planta a tornam útil em diversas áreas da vida, incluindo as indústrias da saúde, cosmética, agrícola e alimentícia. Pesquisas constataram que a presença de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais, flavonoides, fenóis, alcaloides, ácidos graxos, saponinas, óleos essenciais, folato, hidrocarbonetos aromáticos, esteróis, glucosinolatos e glicosídeos, entre outros, caracterizam o perfil nutricional da moringa e, como resultado, dão origem aos seus efeitos terapêuticos em feridas, alergias, obesidade, diabetes, inflamações, asma e assim por diante (Jikah e Edo, 2023). Além de ser uma espécie de árvore ornamental, a moringa possui um valor econômico significativo, visto que praticamente todas as suas partes, incluindo folhas, raízes e sementes, podem ser utilizadas como alimento. Devido à sua abundância de componentes ativos, ela também possui uma variedade de funções farmacológicas, como antioxidante, hipolipemiante, anticancerígena e antibacteriana (Cao *et al.*, 2023).

Devido à disponibilidade de nutrientes, aminoácidos essenciais e minerais como ferro, cálcio e potássio, as folhas são o componente mais estudado da árvore. Por conterem um número relativamente baixo de calorias, as folhas são um excelente complemento à dieta de indivíduos obesos (Gharsallah *et al.*, 2023). Além de serem utilizadas como alimento e ração, suas folhas também apresentam potenciais aplicações como alimentos funcionais nutracêuticos, devido aos fitoquímicos inatos, como ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e glucosinolatos. Ácido criptoclorogênico, isoquercetina e astragalina são os fitoquímicos significativos presentes nas folhas de moringa, aos quais são atribuídas atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias (Kashyap *et al.*, 2022).

As sementes de moringa têm recebido muita atenção da comunidade científica, pois os grãos de moringa possuem um teor significativo de óleo (até 40%), uma alta proporção de ácidos graxos (ácido oleico > 70%) e uma notável resistência à degradação oxidativa. Esse rico perfil de óleo torna as sementes de moringa ideais tanto para ingestão humana quanto para uso comercial (Gharsallah *et al.*, 2021). As sementes de moringa são uma alternativa promissora para suplementação alimentar. O uso da farinha de sementes de moringa como fortificante da farinha de trigo na produção de pães, biscoitos e bolachas, e também do extrato da semente como agente espessante na produção de iogurte de leite, são conhecidos por melhorar as qualidades nutricionais e reológicas dos alimentos (Gautier; Duarte; Sousa, 2022).

As sementes de moringa contêm proteínas funcionais com atividade purificadora de água turva e atividade antimicrobiana, sendo utilizadas na purificação de água de rios e na produção de água potável e doméstica. Além disso, as sementes de moringa contêm uma proteína de ligação à quitina de estrutura única, com atividade antifúngica contra *Candida spp.*, gênero de

microrganismos causadores da candidíase. Apesar das sementes de moringa serem conhecidas por conter altos níveis de proteínas e lipídeos, não são tão estudadas e exploradas quanto a soja (Aoki *et al.*, 2023).

#### 1.4.1 Proteínas Ligantes à Quitina de *Moringa oleifera*

As proteínas de ligação à quitina (CBPs) são moléculas geralmente relacionadas à defesa de plantas. Elas são compostas de uma cadeia polipeptídica pequena (3,8–4,6 kDa) e uma grande (7,9–8,4 kDa) ligadas por ligações dissulfeto e pertencem à classe de proteínas relacionadas à patogênese da família PR-4, apresentando atividade antifúngica. As CBPs antifúngicas perturbam a síntese e/ou a deposição de quitina na parede celular, afetando negativamente o crescimento e o desenvolvimento dos fungos (Garcia *et al.*, 2019).

Três proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera*, eluídas de uma matriz de troca catiônica com NaCl 0,4, 0,5 e 0,6 M, respectivamente, foram identificadas e denominadas *Mo-CBP<sub>2</sub>*, *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* (*Mo*: *M. oleifera*; *CBP*: “Proteína de Ligação à Quitina”), ambas de natureza glicoproteica. Foi relatado que a *Mo-CBP<sub>3</sub>* apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides*, fungos fitopatogênicos de culturas econômica e nutricionalmente importantes, enquanto a *Mo-CBP<sub>4</sub>* apresentou atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos (Neto *et al.*, 2017). Todas essas proteínas pertencem à família da albumina 2S, um dos três principais grupos de proteínas de armazenamento em sementes, juntamente com as prolaminas e as globulinas. As proteínas da albumina 2S são catiônicas, têm estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélice e são essenciais para as sementes da planta (Coelho; Pereira; Tavares, 2024). As albuminas 2S são geralmente proteínas heterodiméricas cuja estrutura é estabilizada por ligações dissulfeto estabelecidas através de um padrão Cys altamente conservado, o que lhes confere alta resistência a tratamentos térmicos e enzimáticos (Bueno-Díaz *et al.*, 2021).

*Mo-CBP<sub>3</sub>* é uma proteína antifúngica termoestável de 14 kDa capaz de inibir o desenvolvimento do ascomiceto *F. solani* e de outros fungos. O mecanismo antifúngico da *Mo-CBP<sub>3</sub>* contra *F. solani* envolve ligação à parede celular, desorganização da membrana plasmática e indução de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial. Essa proteína apresenta grande potencial na busca e no desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos ou culturas transgênicas com maior resistência a fungos fitopatogênicos (Freire *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2019). É relatado na literatura que *Mo-CBP<sub>3</sub>* pertence à família de proteínas da albumina 2S, caracterizada por

uma dobra compacta devido à presença de uma cadeia pequena e uma cadeia grande ligadas por quatro pontes dissulfeto, o que confere estabilidade à sua estrutura. Essa proteína é capaz de permanecer ativa para coagulação e/ou atividades antifúngicas mesmo após serem submetidas a condições consideradas desnaturantes para outras proteínas graças à sua estabilidade estrutural, não havendo mudanças na sua estrutura secundária após tratamento térmico ou variação de pH (Moulin *et al.*, 2019).

A *Mo-CBP<sub>4</sub>*, por sua vez, é uma proteína básica com ponto isoelétrico (pI) de 10,55, massa molecular de 11,78 kDa e que apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Além disso, também apresenta potencial antimicrobiano a partir da formação de poros na membrana plasmática de microrganismos e da indução da produção em excesso de EROs (Lopes *et al.*, 2020). A *Mo-CBP<sub>4</sub>* é estável em diferentes pHs e temperaturas, e comporta-se como uma glicoproteína, com 2,85% de teor de carboidratos, e é resistente à proteólise. É relatado, também, que a proteína demonstra capacidade de inibir a migração de leucócitos em modelos de cistite e pancreatite, bem como regular citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-10 em um modelo de ferida cutânea (Ferreira *et al.*, 2024).

A literatura disponível acerca das *Mo-CBPs* serviu como base para a criação da hipótese de que as proteínas *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* podem apresentar grande potencial no combate aos fungos fitopatogênicos *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*, causadores de antracnose e responsáveis por grandes perdas econômicas associadas às cultivares de melão e pitaya. Além disso, o presente estudo também objetivou esclarecer quais os mecanismos de ação dessas proteínas contra os fungos mencionados, com o intuito de fornecer maior amparo teórico para pesquisas futuras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antifúngico das proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>, isoladas das sementes de *Moringa oleifera*, contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*, causadores de doenças em melão e pitaya, e investigar seus respectivos mecanismos de ação.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Purificar e caracterizar as proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub> a partir de sementes de *Moringa oleifera* utilizando técnicas cromatográficas e eletroforese SDS-PAGE;
2. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub> contra *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*;
3. Avaliar a integridade da membrana plasmática dos fungos após tratamento com as proteínas, utilizando ensaios de permeabilização com iodeto de propídeo;
4. Investigar a produção de espécies reativas de oxigênio nos fungos tratados com as proteínas, utilizando o fluoróforo DCFH-DA;
5. Quantificar o vazamento de proteínas e açúcares intracelulares nos fungos submetidos aos tratamentos proteicos;
6. Analisar o efeito das proteínas no conteúdo total de lipídeos e ergosterol da membrana plasmática dos fungos, elucidando possíveis alvos moleculares.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Material

As sementes de *Moringa oleifera* foram coletadas de árvores situadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsicata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC) sob o número EAC34591. Os isolados de *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale* foram cedidos pelo Grupo de Pesquisa em Biotecnologia, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear (bioMASSNMR) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. Todos os produtos químicos e meios de cultura foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

#### 3.2 Purificação das proteínas *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>*

A purificação das proteínas foi realizada seguindo protocolo estabelecido por Pereira *et al.* (2011) e Gifoni *et al.* (2012). As sementes da moringa foram destegumentadas manualmente e suas amêndoas foram submetidas à trituração em liquidificador. A farinha resultante foi delipidada usando *n*-hexano na proporção de 1:10 (m/v). O processo de extração de proteínas foi realizado utilizando 30 g de farinha delipidada, que foram homogeneizados em 300 mL de tampão de extração Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, acrescido de NaCl 0,15 M e mantidos sob agitação por 4 horas, a 4 °C. A suspensão foi filtrada em tecido de *nylon*, e em seguida foi centrifugada a 15.000 x g, 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel filtro, e o filtrado foi chamado de extrato total. O extrato total foi dialisado contra água destilada por 2 dias, com 4 trocas diárias, e centrifugado a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C, em dias alternados, até a completa separação das porções insolúvel (globulina) e solúvel (albumina). Após remoção completa da porção insolúvel, a albumina foi congelada e liofilizada. Uma amostra de 1,0 g de albumina foi solubilizada em 30 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz de quitina, previamente equilibrada com o mesmo tampão de solubilização da amostra. As proteínas não retidas foram eluídas da matriz usando tampão de equilíbrio em um fluxo contínuo de 30 mL/hora. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com solução de ácido acético 50 mM, em fluxo de 60 mL/hora, e frações de 5,0 mL foram coletadas. A eluição das proteínas foi monitorada por

espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético foi dialisado contra água, liofilizado e denominado P<sub>AC</sub>.

Uma amostra de 600 mg de P<sub>AC</sub> foi solubilizada em 30 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, e aplicado em matriz de troca iônica CM Sepharose™ *Fast Flow* previamente equilibrada com o tampão de solubilização da amostra. A eluição das proteínas que não interagiram com a matriz foi realizada utilizando o tampão de equilíbrio. As proteínas *Mo-CBP*<sub>2</sub>, *Mo-CBP*<sub>3</sub> e *Mo-CBP*<sub>4</sub> foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M, respectivamente. A cromatografia foi realizada em fluxo contínuo de 45 mL/hora, e foram coletadas frações de 4,5 mL. As amostras correspondentes às proteínas foram dialisadas contra água, liofilizados e utilizadas nas próximas etapas experimentais.

### 3.3 Quantificação de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (1976), que é baseado na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* e as macromoléculas de proteínas que contêm os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (cadeias polipeptídicas). Na reação, 100 µL de cada amostra diluída em água foram adicionados em diferentes tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução de Bradford. Os brancos foram preparados utilizando 100 µL de cada proteína purificada e 2,5 mL da solução de Bradford. Os tubos foram, então, agitados em vórtex por 10 s e a reação ocorreu ao longo de 10 min. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV-VIS a 595 nm utilizando cubetas de plástico. A concentração proteica foi mensurada a partir de curva padrão com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

### 3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O grau de pureza das proteínas foi avaliado através de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A metodologia descrita por Laemmli (1970), com adaptação para placas de 10,0 x 8,0 cm, foi utilizada para análise do grau de pureza da proteína. O gel de aplicação foi preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, contendo acrilamida 3,5% e SDS 10%. O gel de separação foi preparado em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo acrilamida 15% e SDS 10%. Aliquotas de 10 µL, contendo 1 µg de proteína (*Mo-CBP*<sub>3</sub> ou *Mo-CBP*<sub>4</sub>), foram preparadas adicionando tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, acrescido de SDS 10%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,1%), na proporção 1:2 (v/v). A amostra foi

agitada e centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos, a 25 °C, e aplicada nos poços da placa. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, em condições de 200 V, 20 mA e 10 W, por um período de 60 minutos. A massa dos marcadores moleculares utilizados variou de 116,0 a 14,4 kDa. A visualização das bandas proteicas foi realizada através de coloração por *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,025%, dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0 v/v/v), durante a noite. Por fim, o gel foi descorado com solução de metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0 v/v/v).

### 3.5 Atividade antifúngica

#### 3.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O fungo foi inicialmente cultivado em placas contendo o meio Agar Batata Dextrose (ABD) e incubado a 30 °C por 5 dias. A suspensão fúngica foi preparada em solução salina 0,9% estéril, e padronizada em 10<sup>6</sup> conídios/mL em câmara de Neubauer. Foram distribuídos uniformemente 50 µL de inóculo em cada um dos 24 poços das placas. As proteínas foram diluídas em meio ABD. Os poços A1 – C2, A3 – C4 e A5 – C6 apresentaram as concentrações proteicas que variaram de 1,0 - 0,01562 mg/mL. Os poços D2, D4 e D6 foram usados para controle de crescimento, apresentando apenas meio de cultivo e inóculo. As placas foram incubadas por 72 h a 30 °C. A concentração mínima de proteína capaz de inibir o crescimento micelial foi determinada qualitativamente, definida como concentração inibitória mínima (CIM). As placas para determinação da CIM foram organizadas de forma que a concentração proteica nos poços fosse decrescente.

#### 3.5.2 Integridade da membrana

A integridade da membrana celular foi avaliada conforme descrito por Silva Neto (2015) por meio da utilização do reagente iodeto de propídeo (IP), adaptando a metodologia para fungos. Inicialmente, uma suspensão fúngica padronizada em 10<sup>6</sup> conídios/mL foi submetida a tratamento com proteína em concentrações equivalentes ao valor da CIM, por um período de 24 h. Ao fim do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em solução salina 0,85% estéril. As amostras foram centrifugadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. O procedimento foi repetido 2 vezes para a lavagem das células. Por fim, 10 µL de IP (0,001 M) foram adicionados ao *pellet*. As amostras foram protegidas da luz e incubadas

por 30 min, 27 °C, com agitação constante. Em seguida, foram preparadas lâminas para análise em microscópio de fluorescência Olympus System Microscope BX 60 (comprimento de onda de excitação, 400 – 500 nm; comprimento de onda de emissão, 600 – 700 nm). As imagens foram obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio, com ampliação de 400x.

### 3.5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A avaliação da produção de EROs foi realizada utilizando o fluoróforo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Inicialmente, uma suspensão fúngica padronizada em  $10^6$  conídios/mL foi submetida a tratamento com proteína em concentrações equivalentes ao valor da CIM, por um período de 24 h. Ao fim do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em solução salina 0,85% estéril. As amostras foram centrifugadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. O procedimento foi repetido 2 vezes para a lavagem das células. Por fim, 10  $\mu$ L de DCFH-DA, na concentração de 0,5 mg/mL, foram adicionados ao *pellet*. As amostras foram protegidas da luz e incubadas por 30 min a 27 °C, com agitação. Em seguida, foram preparadas lâminas para análise em microscópio de fluorescência Olympus System Microscope BX 60 (comprimento de onda de excitação, 485 nm; comprimento de onda de emissão, 530 nm). As imagens foram obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio, com ampliação de 400x.

### 3.6 Vazamento de proteínas e açúcares intracelulares

O vazamento de proteínas e açúcares intracelulares foi realizado com base na metodologia descrita por Elsherbiny, Dawood e Safwat (2021). O fungo foi cultivado em meio ABD por 5 dias a 30 °C. O micélio foi coletado com o auxílio de um bisturi estéril, transferido para um tubo de ensaio e submetido a tratamento com solução proteica preparada na concentração equivalente à CIM. O controle foi preparado substituindo a solução proteica por água deionizada estéril (ddH<sub>2</sub>O). Foram preparados tubos de ensaios separados para a retirada de amostras ao longo de 4 dias. Todos os tubos foram incubados a 30 °C. Em cada dia, o respectivo tratamento foi filtrado através de uma membrana com poros de tamanho 0,22  $\mu$ m para separação de micélio e sobrenadante, e os sobrenadantes foram usados para quantificar o vazamento de proteína solúvel e açúcar. A proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford com Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão, enquanto a concentração de

açúcares solúveis foi determinada com base em uma curva padrão de glicose pelo método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956). Os valores para proteínas e açúcares solúveis foram expressos como mg por mL do sobrenadante. O ensaio foi realizado em triplicatas.

### 3.7 Efeito no conteúdo total de lipídeos

A extração de lipídeos foi conduzida conforme metodologia descrita por Thongdet e colaboradores (2024), adaptada para fungos. Inicialmente, o fungo foi cultivado em ABD por 5 dias a 30 °C sendo, posteriormente, transferido para tubo de ensaio e submetido a tratamento proteico em meio Caldo Batata Dextrose (CBD) na concentração equivalente à CIM, por 4 dias a 30 °C. Micélio não tratado foi utilizado como controle. Todos os tubos de ensaios utilizados foram pesados antes e após os procedimentos. O micélio foi transferido para um novo tubo de ensaio contendo 1,5 mL de solução clorofórmio-metanol 2:1 (v/v). Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min, a 25 °C. Por fim, os sobrenadantes foram transferidos para tubos previamente pesados e identificados, e levados para estufa de secagem a 70 °C até atingirem peso constante. O conteúdo total de lipídeos em cada amostra foi medido em mg por 100 mg de micélio seco, e calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Conteúdo Total de Lipídeos} = \frac{(P2 - P1) \times 100}{P}$$

Onde P se refere ao peso do micélio seco; P1 é o peso inicial do microtubo; e P2 é o peso constante do microtubo após secagem.

### 3.8 Efeito no conteúdo de ergosterol da membrana plasmática

O conteúdo de ergosterol na membrana plasmática do fungo foi detectado com base no método de Zhou e colaboradores (2018). O fungo foi cultivado em meio ABD por 5 dias a 30 °C. Cem microgramas de micélio foram coletados com o auxílio de um bisturi estéril e transferidos para um microtubo, sendo submetidos a tratamento com solução proteica em meio CBD preparada na concentração equivalente à CIM, por 4 dias, a 30 °C. O controle foi preparado apenas com meio CBD e micélio. Ao fim do período de incubação, o conteúdo nos

tubos foi filtrado em tecido de nylon e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 3,0 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio 25% ao micélio de cada tratamento e incubados em banho maria a 85 °C por 60 min. Ao fim da incubação, foram adicionados 1,0 mL de ddH<sub>2</sub>O estéril e 3,0 mL de éter de petróleo a cada amostra para a extração do ergosterol. As amostras foram misturadas por 2 min em vórtice e repousadas 1 h em temperatura ambiente para a separação das fases. A fase de éter de petróleo foi medida em espectrofotômetro na faixa de absorvância 200 - 300 nm. O conteúdo de ergosterol foi calculado usando a seguinte equação: **% Ergosterol = [(A280 / 290) - (A230 / 518)] / peso do micélio**. Os valores 290 e 518 são os valores E (porcentagens por centímetro) determinadas para ergosterol cristalino e desidroergosterol, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

### **3.9 Análises estatísticas**

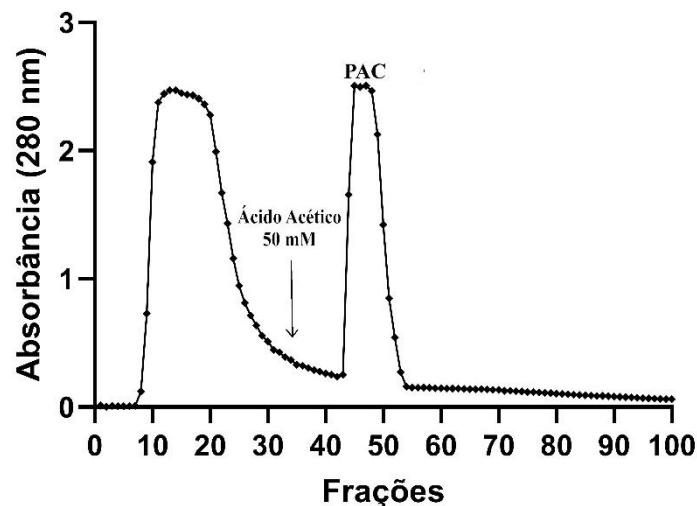
Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como média ± desvio padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Purificação das proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub> e eletroforese SDS-PAGE

O extrato total obtido a partir da farinha delipidada apresentou um teor de proteínas de  $201,83 \pm 2,34$  mgP/gF (proteína/farinha). Após a separação da porção solúvel e insolúvel, foi obtido um teor de albumina de cerca de  $102,54 \pm 1,73$  mgP/gF, correspondendo a 50,80% das proteínas presentes no extrato total. O cromatograma resultante da aplicação da fração albumínica em matriz de quitina, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,15 M, pH 8,0, está representado na Figura 2. O primeiro pico cromatográfico corresponde ao pico não retido, contendo proteínas que não se ligaram à matriz e que foram eluídas pelo próprio tampão. O segundo pico cromatográfico (P<sub>AC</sub>) foi obtido a partir da aplicação da solução de ácido acético 50 mM na coluna, o que resultou na eluição das proteínas que estavam ligadas à matriz através da mudança de pH no meio, da conformação proteica e, conseqüentemente, da desestabilização da ligação entre a proteína e a matriz. O rendimento da fração de P<sub>AC</sub> foi de  $60,44 \pm 3,16$  mgP/gF, representando cerca de 29,94% das proteínas presentes no extrato total.

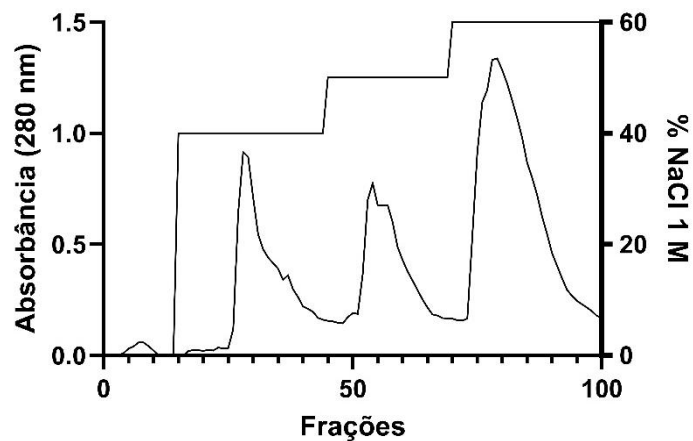
**Figura 2 - Cromatografia de afinidade em matriz de quitina**



**Fonte: a autora.** Albumina (1 g) extraída das sementes de moringa foi aplicada em coluna cromatográfica contendo matriz de quitina previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,15 M, pH 8,0. O primeiro pico representa o material não retido na matriz. O segundo pico (P<sub>AC</sub>) corresponde à fração proteica eluída com a solução de ácido acético 50 mM. A cromatografia foi realizada em fluxo de 60 mL/hora.

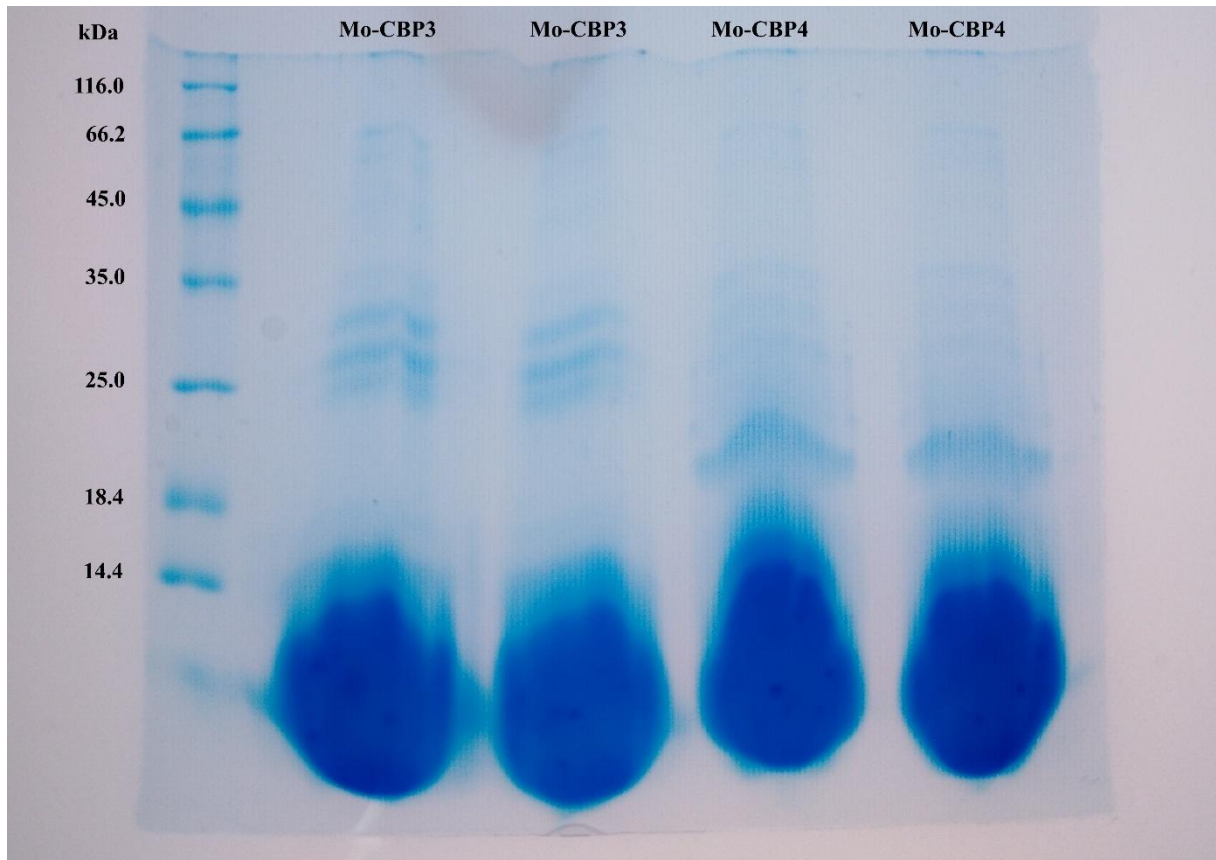
A fração referente ao pico  $P_{AC}$  foi dialisada, liofilizada e solubilizada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,2), sendo posteriormente aplicada em uma coluna de troca iônica CM Sepharose™ *Fast Flow*. O cromatograma obtido ao fim do ensaio está demonstrado na Figura 3. O primeiro pico cromatográfico representa as proteínas que não interagiram com a matriz, sendo eluídas pelo próprio tampão. O segundo pico cromatográfico, obtido ao acrescentar NaCl 0,4 M ao tampão de eluição, corresponde à *Mo*-CBP<sub>2</sub>, proteína descoberta e caracterizada por Neto e colaboradores (2017). O terceiro e o quarto picos cromatográficos foram obtidos ao se acrescentar NaCl 0,5 e 0,6 M ao tampão e correspondem, respectivamente, às proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>. A partir da fração  $P_{AC}$ , foi possível obter  $6,31 \pm 2,28$  mgP/gF de *Mo*-CBP<sub>3</sub> e  $8,0 \pm 2,43$  mgP/gF de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, equivalentes a cerca de 3,12% e 3,96% do extrato total.

**Figura 3 - Cromatografia de Troca Iônica em matriz CM Sepharose™ *Fast Flow***



**Fonte:** a autora.  $P_{AC}$  (600 mg) foi aplicado em coluna cromatográfica contendo matriz de troca iônica CM Sepharose™ *Fast Flow* previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. O primeiro pico representa o material não retido na matriz, eluído pelo próprio tampão. O segundo pico (*Mo*-CBP<sub>2</sub>) foi obtido ao se acrescentar NaCl 0,4 M ao tampão. O terceiro e o quarto picos correspondem, respectivamente, às proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>, eluídas ao se acrescentar NaCl 0,5 e 0,6 M ao tampão. A cromatografia foi realizada em fluxo de 45 mL/hora.

**Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**



**Fonte:** a autora. Amostras das frações obtidas da cromatografia de troca iônica aplicadas em gel de poliacrilamida 15%, em condições desnaturantes, referentes às proteínas *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>*.

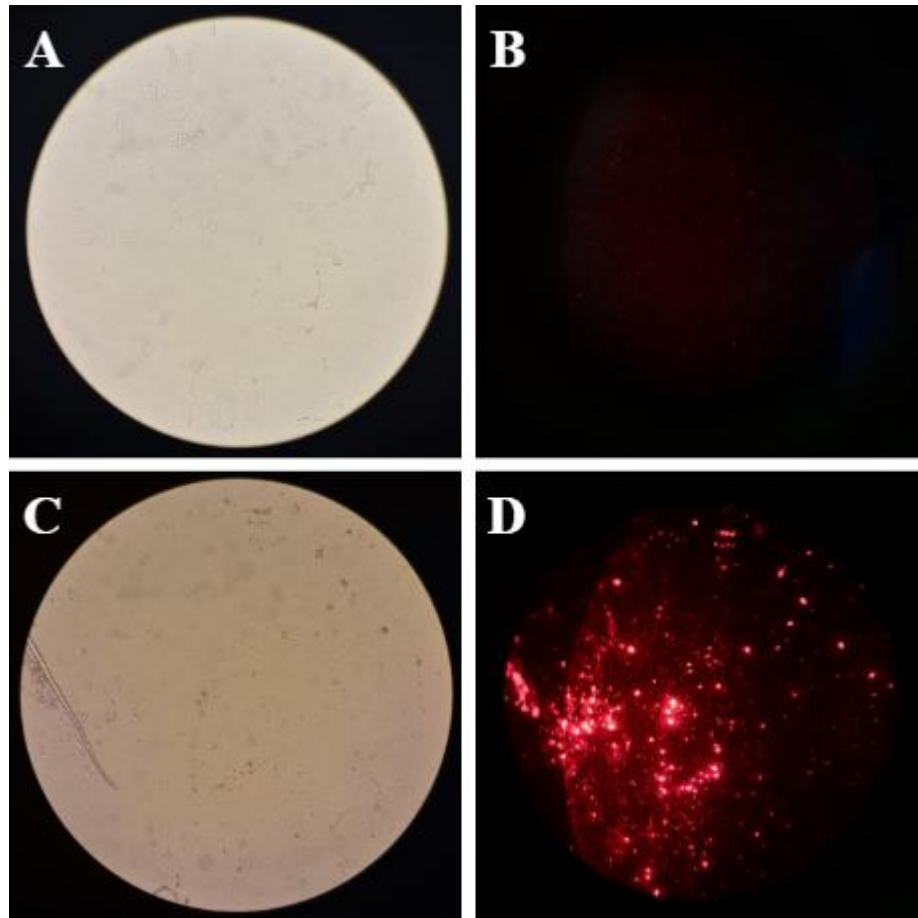
#### 4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os fungos *F. jinanense* e *C. tropicale* foram incubados com as proteínas *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* por 72 h a 30 °C, para que sua capacidade inibitória fosse avaliada. A proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi capaz de inibir o isolado de *F. jinanense* nas concentrações iguais ou acima de 0,25 mg/mL, mas não apresentou atividade inibitória contra o isolado de *C. tropicale* em nenhuma das concentrações testadas. A proteína *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi capaz de inibir o isolado de *C. tropicale* na concentração iguais ou acima de 0,25 mg/mL, mas não apresentou atividade inibitória contra o isolado de *F. jinanense* em nenhuma das concentrações testadas. Desta forma, com a capacidade inibitória de cada proteína definida, os próximos experimentos foram realizados apenas com os pares: *Mo-CBP<sub>3</sub>* x *F. jinanense* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* x *C. tropicale*, onde os tratamentos proteicos foram preparados com concentrações aos valores de CIM obtidos.

### 4.3 Integridade da membrana

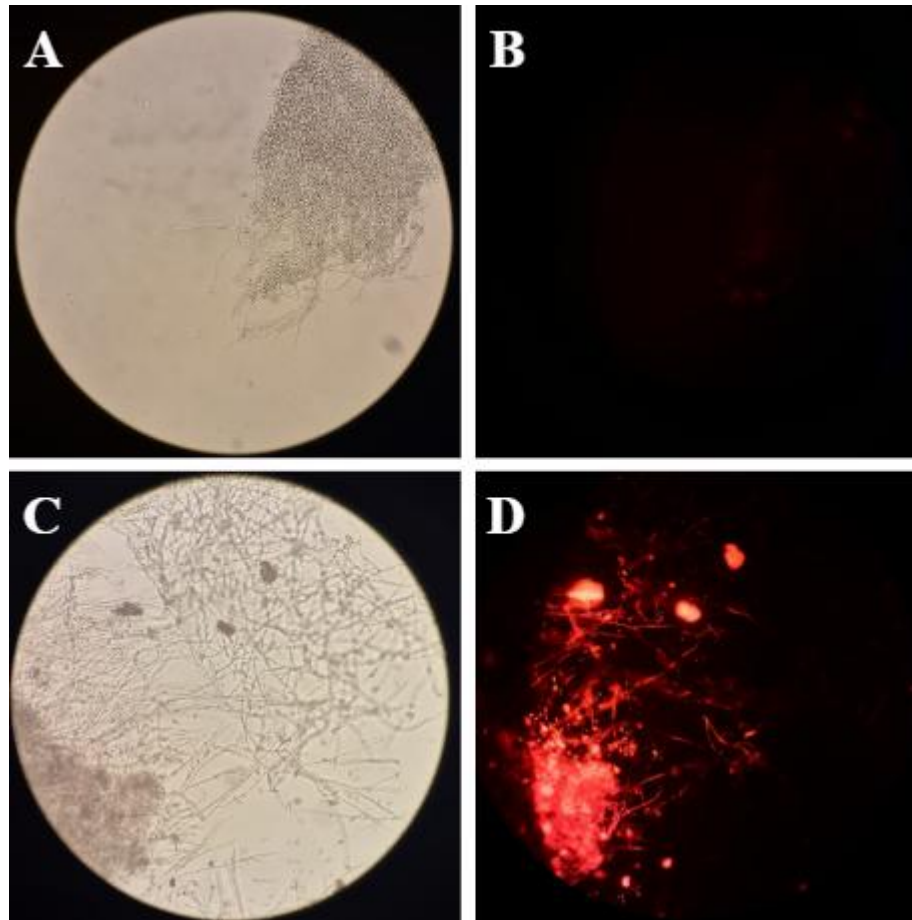
A integridade da membrana celular dos fungos após o tratamento proteico foi avaliada por fluorescência utilizando iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo é capaz de se ligar aos ácidos nucleicos que compõem o material genético da célula. Os resultados obtidos para ambos os tratamentos estão demonstrados nas Figuras 5 e 6. Fluorescência não foi detectada no controle negativo de ambos os fungos, que foram mantidos nas suas condições ideais de cultivo durante 24 h. A falta de fluorescência indica que o iodeto de propídeo não foi capaz de entrar nas células fúngicas, o que indica que não houve danos na sua membrana plasmática. Quanto aos tratamentos proteicos, também realizados ao longo de 24 h, em ambos é possível visualizar intensa emissão de fluorescência na cor vermelha após mudar do campo claro para o campo escuro. Isso indica que *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* foram capazes de causar danos na integridade da membrana dos fungos *F. jinanense* e *C. tropicale*, respectivamente. Esses resultados confirmam a hipótese de que essas proteínas são capazes de atuarem como agentes fungistáticos através de interações entre as proteínas e os componentes da membrana plasmática desses fitopatógenos.

**Figura 5 – Avaliação da integridade da membrana celular de *F. jinanense* após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>3</sub>**



**Fonte:** a autora. As imagens A e B representam o controle negativo das células de *F. jinanense*, sem qualquer tipo de tratamento. As imagens em C e D representam as células após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,25 mg/mL. Campo claro: A e C. Campo escuro: B e D.

**Figura 6 – Avaliação da integridade da membrana celular de *C. tropicale* após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>4</sub>**



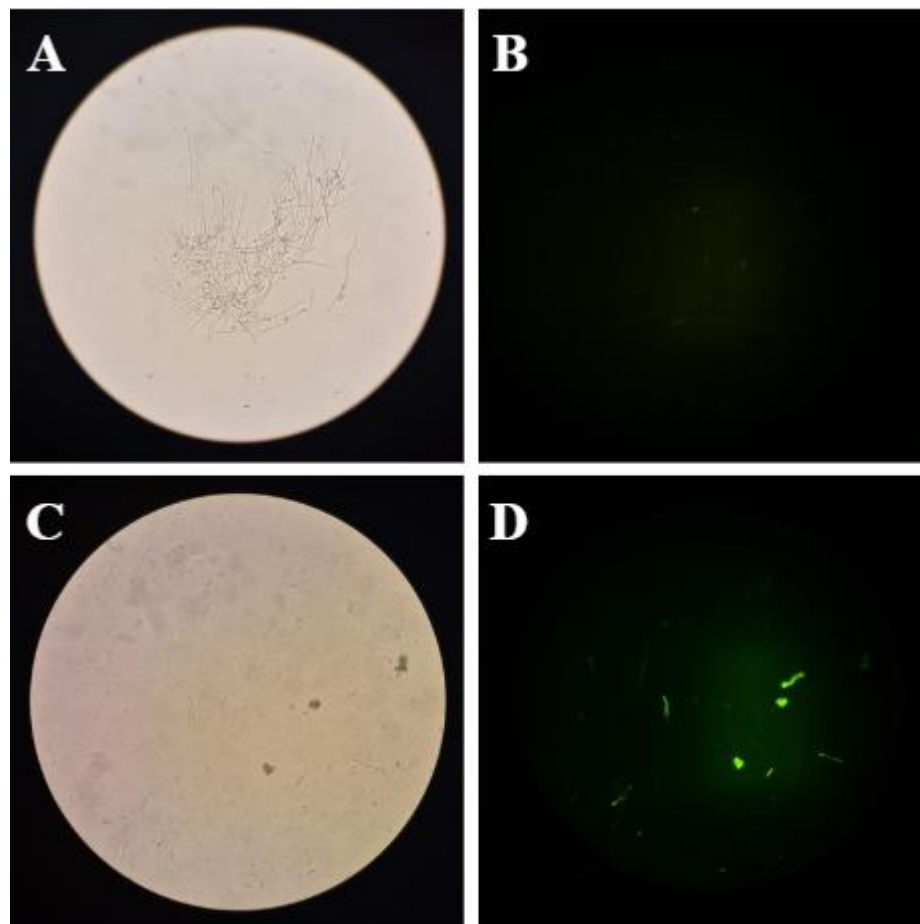
**Fonte:** a autora. As imagens A e B representam o controle negativo das células de *C. tropicale*, sem qualquer tipo de tratamento. As imagens em C e D representam as células após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>4</sub> na concentração de 0,25 mg/mL. Campo claro: A e C. Campo escuro: B e D.

#### 4.4 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs nas células tratadas foi realizada utilizando DCFH-DA. O DCFH-DA não apresenta fluorescência e consegue entrar facilmente na célula, sendo posteriormente hidrolisado por uma esterase intracelular. Após a hidrólise, o DCFH é oxidado por EROs para produzir 2',7'-diclorofluoresceína, que emite fluorescência esverdeada. Os resultados obtidos após os tratamentos proteicos estão demonstrados nas Figuras 7 e 8. Nas células usadas para controle negativo de *F. jinanense*, não foi observada emissão de fluorescência, indicando que não houve a reação de formação do composto fluorescente no interior das células. No controle negativo de *C. tropicale*, foi possível observar emissão de fluorescência, mas com intensidade inferior ao tratamento. Esses resultados indicam que EROs não foram produzidas com o fungo

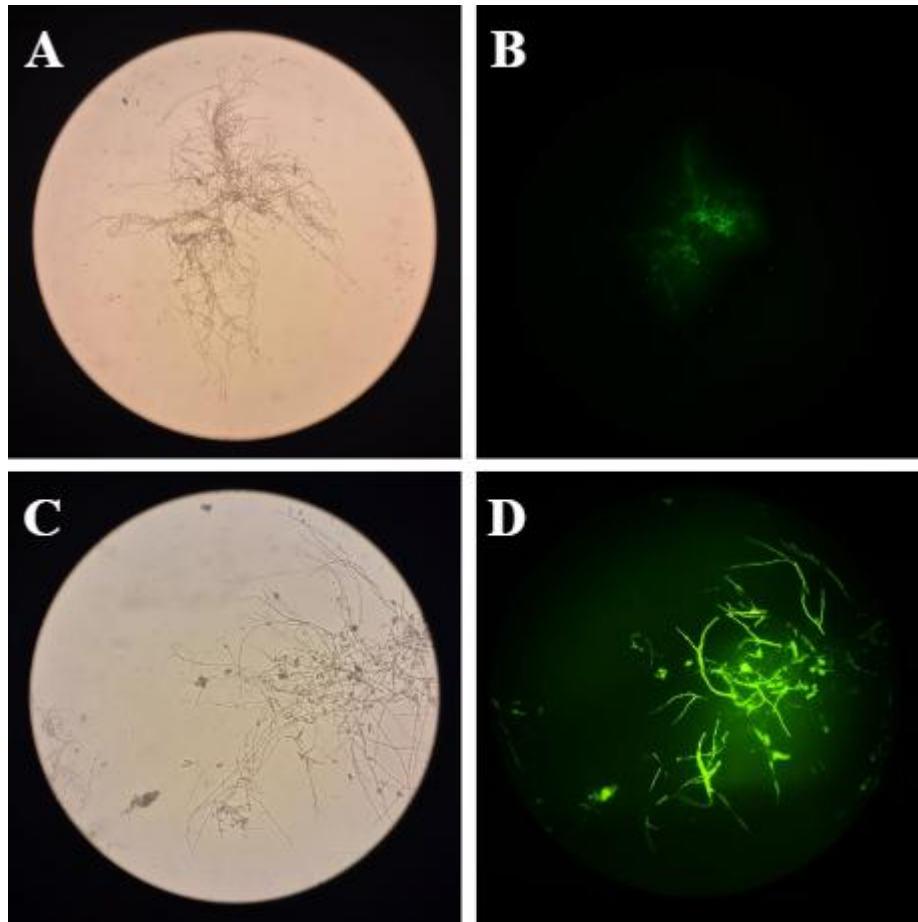
mantido nas suas condições ideais de cultivo para o fungo *F. jinanense*. Já para *C. tropicale*, é possível que o fungo tenha sofrido estresse durante o cultivo ou durante as etapas de preparo para análise. O tratamento com *Mo*-CBP<sub>3</sub> realizado nas células de *F. jinanense* resultou em poucas células fluorescentes, que confirmaram a influência da proteína. O tratamento com *Mo*-CBP<sub>4</sub> realizado nas células de *C. tropicale* resultou em imagem com intensa emissão de fluorescência, indicando que EROs foram produzidas em grandes quantidades. Esses resultados indicam que as proteínas utilizadas no presente trabalho são capazes de induzir a formação de EROs no interior das células desses fitopatógenos.

**Figura 7 – Produção de espécies reativas de oxigênio em *F. jinanense* após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>3</sub>**



Fonte: a autora. As imagens em A e B representam o controle negativo das células de *F. jinanense*, sem qualquer tipo de tratamento. As imagens C e D representam as células após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,25 mg/mL. Campo claro: A e C. Campo escuro: B e D.

**Figura 8 – Produção de espécies reativas de oxigênio em *C. tropicale* após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>4</sub>**



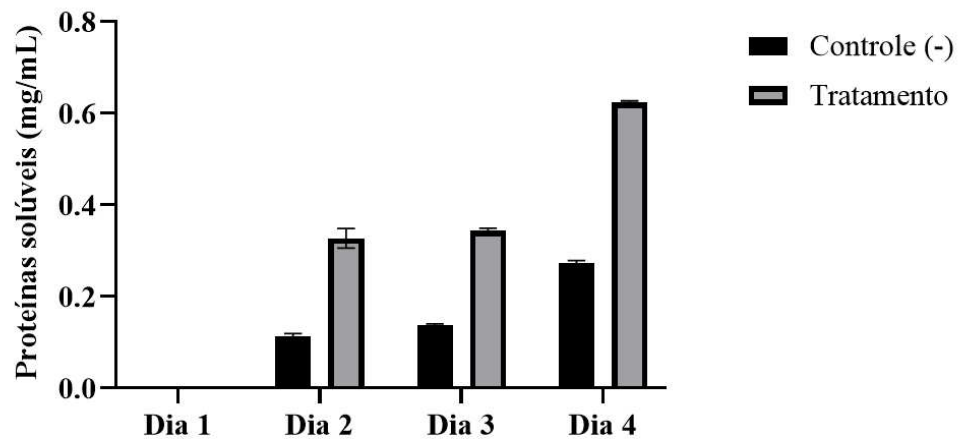
**Fonte:** a autora. As imagens em A e B representam o controle negativo das células de *C. tropicale*, sem qualquer tipo de tratamento. As imagens C e D representam as células após tratamento proteico com *Mo*-CBP<sub>4</sub> na concentração de 0,25 mg/mL. Campo claro: A e C. Campo escuro: B e D.

#### 4.5 Vazamento de proteínas e açúcares intracelulares

O acompanhamento do vazamento de proteínas e açúcares intracelulares das amostras sob tratamento proteico foi acompanhado ao longo de 4 dias. Os resultados obtidos referentes aos teores de proteínas estão representados nas Figuras 9 e 10. O teor de açúcares foi indetectável em todos os tratamentos realizados (*Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub>) e controle, ao longo dos 4 dias. Quanto ao teor de proteínas, nenhuma das amostras do primeiro dia apresentou quantidades detectáveis de proteínas no seu sobrenadante. O controle negativo de *F. jinanense* apresentou nos dias 2, 3 e 4, respectivamente,  $0,113 \pm 0,006$ ,  $0,137 \pm 0,003$  e  $0,273 \pm 0,005$  mg de proteína/mL. Os valores após tratamento proteico obtidos para o mesmo fungo nos dias 2, 3 e 4 foram, respectivamente,  $0,327 \pm 0,021$ ,  $0,343 \pm 0,006$  e  $0,624 \pm 0,003$  mg de proteína/mL.

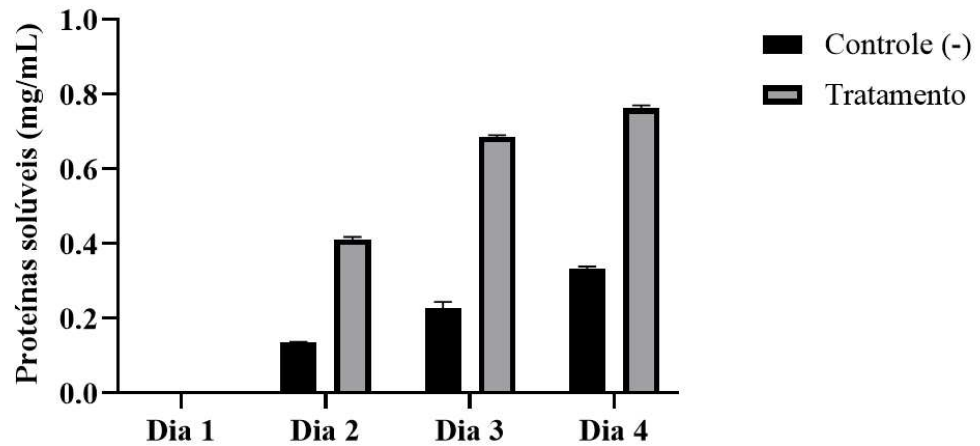
Para as amostras de controle negativo de *C. tropicale*, os teores de proteínas obtidos para os dias 2, 3 e 4 foram de, respectivamente,  $0,136 \pm 0,001$ ,  $0,228 \pm 0,016$  e  $0,334 \pm 0,005$  mg/mL. Por fim, em relação aos tratamentos proteicos de *C. tropicale*, os valores obtidos foram de  $0,411 \pm 0,007$ ,  $0,685 \pm 0,005$  e  $0,762 \pm 0,008$  mg/mL. Esses valores demonstram que houve um aumento na quantidade de proteínas solúveis nas amostras tratadas e que, ao longo dos dias, a diferença entre elas e os controles se tornou mais perceptível. Esses valores corroboram com a hipótese de que as proteínas são capazes de causar danos às células fúngicas, uma vez que é possível observar vazamento de conteúdo intracelular.

**Figura 9 – Teor de proteínas solúveis do sobrenadante das amostras de *F. jinanense***



**Fonte:** a autora. O gráfico apresenta o teor de proteínas solúveis detectadas no sobrenadante do controle negativo e das amostras de *F. jinanense* tratadas com *Mo-CBP3* na concentração de 0,25 mg/mL, ao longo de 4 dias.

**Figura 10 – Teor de proteínas solúveis do sobrenadante das amostras de *C. tropicale***

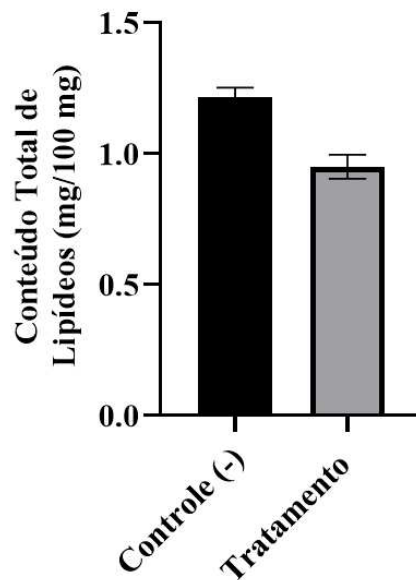


**Fonte:** a autora. O gráfico apresenta o teor de proteínas solúveis detectadas no sobrenadante do controle negativo e das amostras de *C. tropicale* tratadas com *Mo-CBP4* na concentração de 0,25 mg/mL, ao longo de 4 dias.

#### 4.6 Efeito no conteúdo total de lipídeos

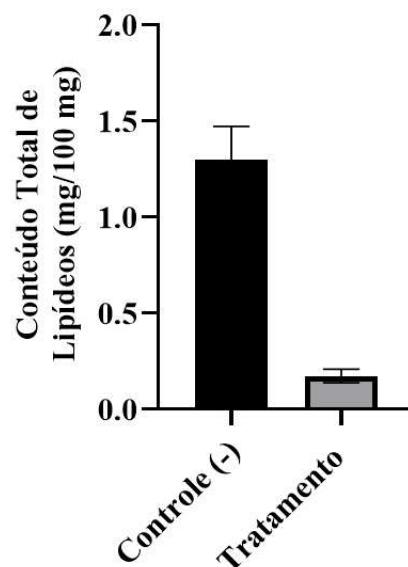
O conteúdo total de lipídeos presente nas amostras tratadas e não tratadas com as proteínas foi determinado para definir se elas foram ou não capazes de degradar lipídeos presentes na membrana plasmática dos fungos. Os valores obtidos estão representados nas Figuras 11 e 12. O conteúdo de lipídeos na amostra de controle negativo do isolado de *F. jinanense* foi de  $1,216 \pm 0,351$  mg/100 mg. Quanto ao tratamento realizado com a proteína *Mo-CBP3*, o valor obtido foi de  $0,95 \pm 0,045$  mg/100 mg. O conteúdo de lipídeos na amostra de controle negativo do isolado de *C. tropicale* foi de  $1,3 \pm 0,172$  mg/100 mg. O tratamento realizado com a proteína *Mo-CBP4* resultou em um valor de  $0,173 \pm 0,035$ . O resultado de ambos os tratamentos demonstrou uma queda na quantidade total de lipídeos das amostras em relação ao controle, o que indica que as proteínas foram capazes de interagir com os lipídeos da membrana plasmática dos fungos e degradá-los.

Figura 11 - Conteúdo total de lipídeos do isolado de *F. jinanense* com e sem tratamento proteico



Fonte: a autora. A primeira coluna representa o controle negativo, onde o micélio de *F. jinanense* não recebeu tratamento e foi mantido em meio CBD. A segunda coluna representa o tratamento do micélio fúngico com a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* na concentração equivalente à CIM (0,25 mg/mL).

Figura 12 - Conteúdo total de lipídeos do isolado de *C. tropicale* com e sem tratamento proteico

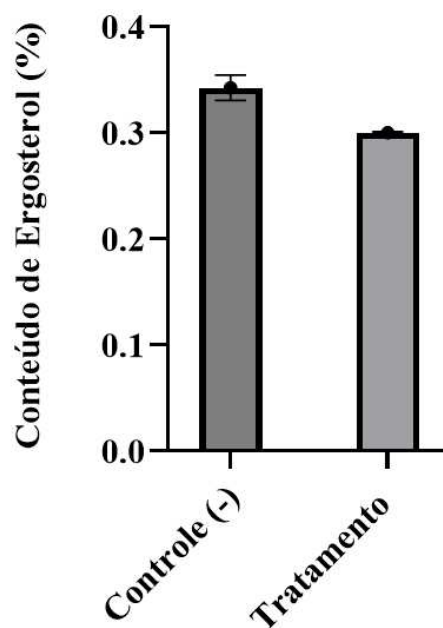


Fonte: a autora. A primeira coluna representa o controle negativo, onde o micélio de *C. tropicale* não recebeu tratamento e foi mantido em meio CBD. A segunda coluna representa o tratamento do micélio fúngico com a proteína *Mo-CBP<sub>4</sub>* na concentração equivalente à CIM (0,25 mg/mL).

#### 4.7 Efeito no conteúdo de ergosterol da membrana plasmática

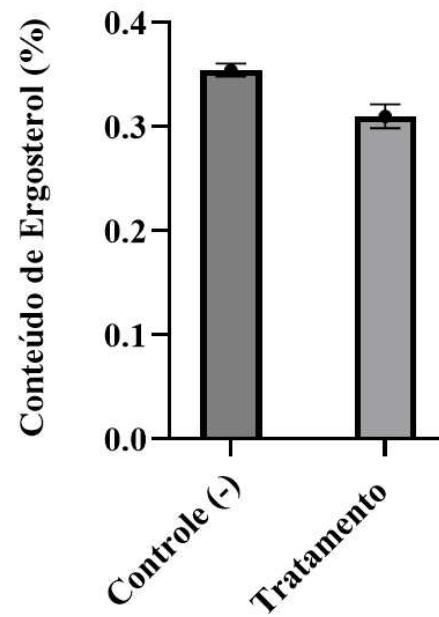
O conteúdo de ergosterol presente nas amostras tratadas e não tratadas com as proteínas *Mo-CBP<sub>3</sub>* e *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi determinado para definir se elas foram ou não capazes de degradar o ergosterol presente na membrana plasmática dos fungos. A porcentagem de conteúdo de ergosterol obtida para o controle negativo de *F. jinanense* foi de  $0,3426 \pm 0,0120$ , maior do que a quantidade obtida para o tratamento do micélio fúngico com a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>*, que foi de  $0,3001 \pm 0,0009$ . Em relação ao fungo *C. tropicale*, o valor obtido para o controle negativo foi de  $0,3543 \pm 0,0061$  e o valor referente ao tratamento do micélio fúngico com a proteína *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi de  $0,3099 \pm 0,0115$ . Os resultados estão representados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 – Conteúdo de ergosterol na membrana plasmática de *F. jinanense*



Fonte: a autora. A primeira coluna representa o controle negativo, onde o micélio de *F. jinanense* não recebeu tratamento e foi mantido em meio CBD. A segunda coluna representa o tratamento do micélio de *F. jinanense* com a proteína *Mo-CBP<sub>3</sub>* na concentração de 0,25 mg/mL.

Figura 14 - Conteúdo de ergosterol na membrana de *C. tropicale*



Fonte: a autora. A primeira coluna representa o controle negativo, onde o micélio de *C. tropicale* não recebeu tratamento e foi mantido em meio CBD. A segunda coluna representa o tratamento do micélio de *C. tropicale* com a proteína *Mo-CBP<sub>4</sub>* na concentração de 0,25 mg/mL.

## 5 DISCUSSÃO

A purificação das proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi realizada seguindo protocolo já estabelecido por Pereira e colaboradores (2011) substituindo a etapa de precipitação com sulfato de amônia por cromatografia de troca iônica, modificação já relatada em outros trabalhos (Freire *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2020). A partir da farinha delipídada de moringa, foi possível obter  $6,31 \pm 2,28$  mgP/gF de *Mo*-CBP<sub>3</sub> e  $8,0 \pm 2,43$  mgP/gF de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, equivalentes a cerca de 3,12% e 3,96% do extrato total. Posteriormente, foi realizada uma etapa de eletroforese em condições desnaturantes para a verificação do grau de pureza das proteínas. Como demonstrado na Figura 4, foram detectadas bandas indesejadas e as proteínas não demonstraram o padrão esperado, além de sofrer um longo arraste ao final do gel. Esse resultado indica a presença de contaminantes na amostra, sugerindo a necessidade de uma etapa cromatográfica adicional para a retirada dos contaminantes ou uma nova etapa de purificação.

A capacidade inibitória das proteínas foi avaliada contra dois isolados de fungos fitopatogênicos: *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*. A proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi capaz de inibir o isolado de *F. jinanense* nas concentrações iguais ou acima de 0,25 mg/mL, mas não apresentou atividade inibitória contra o isolado de *C. tropicale* em nenhuma das concentrações testadas. Já a proteína *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi capaz de inibir o isolado de *C. tropicale* na concentração iguais ou acima de 0,25 mg/mL, mas não apresentou atividade inibitória contra o isolado de *F. jinanense* em nenhuma das concentrações testadas. Gifoni e colaboradores (2012) relataram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> na concentração de 0,05 mgP/mL apresenta forte atividade inibitória contra os fungos fitopatogênicos *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*, todos de relevância econômica. Os autores afirmam também que a proteína se comporta tanto como agente fungicida quanto agente fungistático, dependendo da concentração utilizada. Batista e colaboradores (2014) selecionaram um isolado de *F. solani* para estudar os mecanismos de ação e o efeito da temperatura e do pH na atividade antifúngica da *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Os autores relataram que, mesmo após aquecimento a 100 °C por 60 min, a proteína mantém sua capacidade antifúngica. Garcia e colaboradores (2019) também demonstraram que os isolados de *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum* e *F. solani* foram inibidos quando tratados com *Mo*-CBP<sub>3</sub> e *Mo*-CBP<sub>4</sub> na concentração de 0,1 mg/mL. Lopes e colaboradores (2020) também relataram atividade antifúngica da *Mo*-CBP<sub>4</sub> contra *Trichophyton mentagrophytes*, espécie causadora de dermatofitose, na concentração de 45 µM. A falta de atividade inibitória de cada proteína contra um dos isolados fúngicos pode estar associada a diversos fatores. Karim e colaboradores (2024) investigaram a sensibilidade de 39 isolados de *C. fructicola* e 41 isolados de *C. siamense* a

alguns fungicidas comumente utilizados, como carbendazim, iprodiona, fluopiram e propiconazol., e demonstraram que organismos da mesma espécie isolados de locais diferentes podem apresentar diferentes níveis de resistência ao mesmo fungicida, afirmando que isso pode ser consequência de mutações induzidas por fatores associados ao ambiente em que o fungo se desenvolve. Além disso, e apesar das proteínas utilizadas no presente estudo pertencerem à mesma família e apresentarem certo nível de similaridade, a falta de atividade antifúngica contra um dos isolados pode estar associada a algum aspecto estrutural inerente à proteína, o que não pode ser confirmado pelos resultados apresentados e requer uma investigação mais aprofundada.

A integridade da membrana celular e a produção de EROs após tratamento proteico foram avaliadas. A integridade da membrana foi avaliada por fluorescência utilizando iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo (IP) é um corante fluorogênico de ligação ao DNA, e é impermeável às membranas celulares quando estão intactas. A permeabilização das membranas é necessária para que IP consiga adentrar na célula e interagir com o DNA microbiano (Gan *et al.*, 2025). A presença de EROs foi avaliada utilizando o fluoróforo DCFH-DA. O DCFH-DA não possui fluorescência e pode penetrar livremente na membrana celular. Uma vez na célula, o DCFH-DA é hidrolisado pela esterase intracelular para produzir diclorodihidrofluoresceína (DCFH). O DCFH é, então, oxidado por EROs para produzir 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente. A intensidade da fluorescência do DCF é usada para quantificar o nível de EROs (Yu *et al.*, 2021).

Nos resultados do presente estudo, fluorescência não foi ou foi fracamente detectada nos controle negativos de ambos os fungos tanto para o ensaio de integridade da membrana quanto para o ensaios de EROs, o que indica que não houve danos na membrana plasmática e indução de produção de EROs nas condições ideais de cultivo. Os resultados de integridade de membrana após tratamento proteico demonstrou que nas amostras tratadas de ambos os fungos é possível visualizar células fluorescentes avermelhadas após mudar do campo claro para o campo escuro, o que indica que ambas as proteínas foram capazes de causar danos na membrana celular nos seus respectivos tratamentos. Os resultados do ensaio de EROs após tratamento proteico demonstrou que houve produção de EROs em ambos os tratamentos proteicos, mesmo com apenas poucas células fluorescentes sendo detectadas nas amostras de *F. jinanense*. Isso indica que houve a produção de EROs, mas em baixa quantidade, o que pode ou não estar relacionado ao tratamento proteico. Lopes de colaboradores (2020) relataram que a proteína *Mo-CBP4* na concentração de 45  $\mu$ M contra *T. mentagrophytes* promoveu um grande acúmulo de EROs detectado pela formação de grânulos escuros dentro e ao redor dos microconídios,

além de induzir a formação de poros na membrana. Batista e colaboradores (2014) avaliaram a interação eletrostática da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com a membrana do fungo *F. solani* e a indução da produção de EROs. Observaram também se, após essa ligação inicial aos componentes da membrana fúngica, houve efeitos secundários induzidos internamente na célula. Com tratamento proteico na concentração de 0,1 mg/mL, os autores relataram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> induziu a produção de EROs, revelada pela presença de um *pellet* marrom-avermelhado dentro dos esporos de *F. solani*, em contraste com os controles negativos (água e BSA). Os autores também afirmaram que na membrana de *F. solani* as interações eletrostáticas da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, uma proteína catiônica, provavelmente ocorrem com o fosfolípido fosfatidilinositol, que é carregado negativamente. Não há registro do uso de *Mo*-CBP<sub>4</sub> contra espécies de *Colletotrichum*, mas outras substâncias de origem vegetal já são investigadas para uso contra o fungo. Pereira e colaboradores (2021) utilizaram extrato vegetal de pimenta (*Capsicum annuum* L.) para inibir o crescimento de *C. scovillei*, relatando que alguns dos extratos provenientes de folhas e raízes na concentração de 200 µg/mL foram capazes de inibir 100% do crescimento do fungo, e que na concentração de 100 µg/mL induziram a superprodução de EROs, o que poderia estar associado à permeabilização da membrana e a eventual morte celular.

A permeabilização da membrana celular ocasiona o vazamento do conteúdo intracelular para o exterior da célula. A quantificação dos compostos vazados pode ser usada para a corroborar os resultados referentes aos danos causados à membrana celular, e até mesmo o aumento da quantidade de células mortas. Com base nisso, o presente trabalho incluiu metodologias para quantificação do vazamento de proteínas e de açúcares das células fúngicas após os tratamentos proteicos. Levando em consideração que os tratamentos foram feitos com proteínas e a sua detecção poderia afetar os resultados obtidos utilizando o protocolo experimental de Bradford, as proteínas foram utilizadas como branco. O teor de açúcares foi indetectável em todos os tratamentos realizados ao longo dos 4 dias. Quanto ao teor de proteínas, nenhuma das amostras do primeiro dia apresentou quantidades detectáveis de proteínas no seu sobrenadante. Quanto aos dias 2, 3 e 4, os valores obtidos das amostras de *F. jinanense* e *C. tropicale* tratadas foram 2x maiores do que os valores obtidos nas amostras de controle negativo. Esses valores corroboram com os resultados apresentados anteriormente, e confirmam que as *Mo*-CBPs foram capazes de causar danos à membrana fúngica.

Tanto lipídeos quanto proteínas (e suas moléculas de carboidratos associadas) são constituintes importantes da membrana celular. O conteúdo de lipídeos das células é essencial para o funcionamento celular, especialmente por serem flexíveis e influenciarem na fluidez da membrana plasmática (Das, 2021). Sabe-se que, para bactérias, alterações nos lipídios da

membrana celular afetam a suscetibilidade aos antibióticos por meio da carga de superfície, permeabilidade, fluidez e estabilidade da membrana bacteriana (Nikolic e Mudgil, 2023). Para os fungos, a homeostase da membrana celular não está apenas intimamente relacionada às proteínas da membrana, mas também depende dos lipídios da membrana, que apresentam importante papel na modulação da patogenicidade dos fungos (Peng e Chen, 2024). Por conta disso, os lipídeos presentes nas membranas celulares de fungos tem se tornado moléculas-alvo de antifúngicos. O conteúdo total de lipídeo presentes nas amostras tratadas e não tratadas foi avaliado no presente trabalho. O conteúdo de lipídeos na amostra de controle negativo do isolado de *F. jinanense* foi de  $1,216 \pm 0,351$  mg/100 mg, enquanto o valor obtido após tratatamento proteico com *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi de  $0,95 \pm 0,045$  mg/100 mg. Referente ao isolado de *C. tropicale*, o conteúdo total de lipídeos quantificados no controle negativo foi de  $1,3 \pm 0,172$  mg/100 mg, enquanto as amostras tratadas com *Mo*-CBP<sub>4</sub> apresentaram um valor de  $0,173 \pm 0,035$ . Esses resultados mostram uma redução no conteúdo total de lipídeos em relação aos controles negativos no tempo de incubação determinado, após ambos os tratamentos. Esses resultados indicam que as proteínas são capazes de interagir com lipídeos presentes no meio. Essa interação pode ocorrer por conta da carga positiva total das proteínas, proporcionando interação eletrostática inicial com componentes carregados negativamente da parede celular e da membrana fúngica. Essa interação pode estar diretamente ligada à degradação lipídica pelas proteínas, ou pode ser indiretamente responsável ao desencadear respostas celulares secundárias. Além disso, a redução nos valores obtidos pode estar associada à peroxidação lipídica. As EROs conseguem interagir com diferentes componentes celulares, como DNA, proteínas e lipídeos. Os ácidos graxos poli-insaturados são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres de oxigênio, o que leva à peroxidação lipídica que, por sua vez, degrada diretamente os fosfolipídios de membrana e é usada como um sinal de morte celular (Wang *et al.*, 2023). No entanto, para a confirmação se esses fatores estão relacionados, sugere-se que pesquisas futuras incluam uma etapa experimental para quantificação da peroxidação lipídica usando como base o malondialdeído, um produto gerado pela peroxidação lipídica e que geralmente é utilizado como biomarcador de estresse oxidativo.

O ergosterol é um componente integral da membrana celular que desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade e fluidez da estrutura da membrana, e tem sido um alvo importante dos fungicidas químicos comuns, uma vez que reduzir o conteúdo de ergosterol resulta em uma funcionalidade anormal da membrana (OuYang *et al.*, 2021). O presente trabalho também analisou o conteúdo de ergosterol nas amostras tratadas e não tratadas. A porcentagem de conteúdo de ergosterol obtida para o micélio de *F. jinanense* tratado com *Mo*-

CBP<sub>3</sub> foi 14,16% menor em relação a quantidade obtida para controle negativo. Em relação ao fungo *C. tropicale*, o valor obtido para o tratamento do micélio fúngico com a proteína Mo-CBP<sub>4</sub> foi 14,32% menor que o valor obtido para o controle negativo. Os resultados, no geral, indicaram uma redução do conteúdo de ergosterol nas amostras tratadas, o que pode resultar em danos irreversíveis para a membrana celular fúngica. O trabalho desenvolvido por Uwineza e colaboradores (2024) é um dos diversos trabalhos que objetivam o uso de produtos vegetais utilizados para alvejar o conteúdo de ergosterol na membrana fúngica. Nele, os autores testaram o efeito do extrato das flores de urtiga-branca (*Lamium album*) contra um isolado de *Fusarium culmorum*, o conteúdo de ergosterol como um indicador de biomassa fúngica, demonstrando nas mudas não infectadas, o controle sem tratamento com o extrato apresentou o maior nível de ergosterol nas folhas e raízes, contrário às mudas tratadas com 5 e 10% do extrato, que apresentaram valores significativamente menores, indicando que fungos endofíticos estavam presentes no tecido vegetal. Em ambos os casos (raízes e folhas), o extrato inibiu o desenvolvimento fúngico dentro da planta. Um outro trabalho encontrado na literatura, desenvolvido por Yuan e colaboradores (2024), utiliza o óleo essencial de alecrim contra *Colletotrichum gloeosporioides*, o patógeno causador da antracnose em nozes. Os autores relataram que após o tratamento com o óleo essencial, o teor de ergosterol em *C. gloeosporioides* diminuiu, e demonstraram que quanto maior a concentração do óleo, menor o teor de ergosterol. Em comparação com o grupo controle, o teor de ergosterol reduziu em 18,75%, 40,63% e 65,63% após os tratamentos com o óleo essencial nas concentrações de  $\frac{1}{2}$ -CIM, CIM e 2CIM, respectivamente. Os resultados obtidos pelos autores sugeriram que o óleo essencial foi capaz de reduzir o teor de ergosterol na membrana plasmática de *C. gloeosporioides* e isso pode estar ligado diretamente com mudanças causadas na integridade da membrana plasmática.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que as proteínas Mo-CBP<sub>3</sub> e Mo-CBP<sub>4</sub> exibiram, respectivamente, significativa atividade antifúngica contra os isolados fúngicos *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*, reconhecidos como importantes fitopatógenos que infectam cultivares de melão e pitaya, ocasionando substanciais perdas na produção agrícola e impactos econômicos relevantes. A análise dos mecanismos de ação demonstrou que essas proteínas apresentam múltiplos efeitos sobre a fisiologia fúngica. Observou-se que ambas as proteínas são capazes de: (1) induzir alterações estruturais na integridade da membrana plasmática, comprometendo sua função de barreira seletiva; (2) causar estresse oxidativo, resultando na produção excessiva de EROs; (3) promover redução nos teores de lipídios

estruturais e ergosterol, componente essencial da membrana fúngica; e (4) desencadear processos de morte celular programada. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação dessas proteínas é multifatorial, no qual a interação das proteínas com componentes da membrana celular desestabiliza a homeostase fúngica, resultando em danos estruturais irreversíveis e, conseqüentemente, na inibição do crescimento microbiano.

## 6 CONCLUSÃO

As proteínas *Mo*-CBP<sub>3</sub> (CIM = 0,25 mg/mL) e *Mo*-CBP<sub>4</sub> (CIM = 0,25 mg/mL) demonstraram atividade antifúngica específica contra *Fusarium jinanense* e *Colletotrichum tropicale*, respectivamente. Seus mecanismos de ação incluíram danos à membrana plasmática, redução do conteúdo de lipídeos e ergosterol, e produção de EROs. Os resultados destacam o potencial dessas proteínas como alternativas sustentáveis aos fungicidas químicos para o controle de doenças em culturas economicamente importantes. Estudos adicionais são necessários avaliar sua eficácia em condições de campo. Em suma, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre proteínas vegetais com atividade antifúngica, abrindo caminho para futuras pesquisas e aplicações práticas dessas proteínas no manejo de doenças agrícolas causadas por fungos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS. 2024. Dados de exportação. Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados, Brasília, Brasil. <https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/#abaixo>. Acesso em: 19/04/2025.
- AJMAL, M. *et al.* Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 10, 21 dez. 2022.
- AMADOR, V. C. *et al.* Lipid Transfer Proteins (LTPs)—Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1281, 21 out. 2021.
- AOKI, H. *et al.* Analysis of functional ingredients of tempe-like fermented *Moringa oleifera* seeds (*Moringa tempe*) prepared with *Rhizopus* species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 135, n. 4, p. 306–312, abr. 2023.
- ARGE, L. W. P. *et al.* Uncovering the transcriptional molecular dynamics of shelf life extension and lignin-based resistance induction to *Fusarium pallidoroseum* in melon fruit by the use of pulsed-light. **Postharvest Biology and Technology**, v. 216, p. 113036, out. 2024.
- AZMI, S.; HUSSAIN, M. K. Analysis of structures, functions, and transgenicity of phytopeptides defensin and thionin: a review. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 5, dez. 2021.
- BASHIR, M. A. *et al.* Osmotin: A Cationic Protein Leads to Improve Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 992, 4 ago. 2020.
- BATISTA, Adelina B. *et al.* New Insights into the Structure and Mode of Action of Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein of *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111427, 27 out. 2014.
- BELLO, S. *et al.* Control in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de la pitaya amarilla de Huambo (*Selenicereus megalanthus*). **Idesia (Arica)**, v. 40, n. 3, p. 75–80, 2022.
- BOUFLEUR, T. R. *et al.* Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393–409, abr. 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROWN, H. E.; ESHER, S. K.; ALSPAUGH, J. A. Chitin: A “Hidden Figure” in the Fungal Cell Wall. Em: LATGÉ, J.-P. (Ed.). **The Fungal Cell Wall**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2019. v. 425p. 83–111.
- BUENO-DÍAZ, C. *et al.* Characterization of Relevant Biomarkers for the Diagnosis of Food Allergies: An Overview of the 2S Albumin Family. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1235, 29 maio 2021.

- CAO, J. *et al.* Moringa oleifera leaf protein: Extraction, characteristics and applications. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 119, p. 105234, jun. 2023.
- CERESINI, P. C. *et al.* Strategies for managing fungicide resistance in the Brazilian tropical agroecosystem: Safeguarding food safety, health, and the environmental quality. **Tropical Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 36–70, 18 mar. 2024.
- CHEAIB, A.; KILLINY, N. Photosynthesis Responses to the Infection with Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 38, n. 1, p. 9–29, 1 jan. 2025.
- CHEN, D. *et al.* Role of Promising Secondary Metabolites to Confer Resistance Against Environmental Stresses in Crop Plants: Current Scenario and Future Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 881032, 9 maio 2022.
- CHEN, Y. *et al.* Characterization of the chitinase gene family in Saccharum reveals the disease resistance mechanism of ScChiVIII1. **Plant Cell Reports**, v. 43, n. 12, p. 299, dez. 2024.
- CHEVALIER, L. *et al.* Cell wall dynamics stabilize tip growth in a filamentous fungus. **PLOS Biology**, v. 21, n. 1, p. e3001981, 17 jan. 2023.
- CHIU, T.; POUCKET, T.; LI, Y. The potential of plant proteins as antifungal agents for agricultural applications. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 1075–1083, dez. 2022.
- CHOY, H. L.; GAYLORD, E. A.; DOERING, T. L. Ergosterol distribution controls surface structure formation and fungal pathogenicity. **mBio**, p. e01353-23, 6 jul. 2023.
- COELHO, N.; PEREIRA, A. S.; TAVARES, P. Moringa oleifera Seed Cake: A Review on the Current Status of Green Nanoparticle Synthesis. **Applied Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 197–212, 29 abr. 2024.
- DAS, Lopamudra. Biological activity of plant anti-microbial proteins – thionin. **International Journal of Agriworld**, vol. 5, n. 2, 2024
- DE FREITAS, M. D. *et al.* Unraveling the antifungal composition of bitter orange decoction against the melon pathogen Fusarium jinanense. **Food Chemistry**, v. 455, p. 139769, out. 2024.
- DENG, H. *et al.* Novel Multiresistant Osmotin-like Protein from Sweetpotato as a Promising Biofungicide to Control *Ceratocystis fimbriata* by Destroying Spores through Accumulation of Reactive Oxygen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 1487–1499, 24 jan. 2024.
- DHAMI, D. S. *et al.* Characterization of multiple disease resistance in melons (*Cucumis melo* L.) against *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and tomato leaf curl Palampur virus. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 22, n. 1, p. 27–36, fev. 2024.
- DOS SANTOS, C.; FRANCO, O. L. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2226, 5 jun. 2023.

DOS SANTOS, M. H. *et al.* Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose on pitaya (*Hylocereus* spp.) in Brazil. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 138, p. 102657, jul. 2025.

EJAZ, M. R. *et al.* An examination of how climate change could affect the future spread of *Fusarium* spp. around the world, using correlative models to model the changes. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103177, ago. 2023.

EL-BAKY, N. A.; AMARA, A. A. A. F. Recent Approaches towards Control of Fungal Diseases in Plants: An Updated Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 900, 25 out. 2021.

ELSHARBINY, A.; DAWOOD, H.; SAFWAT, N. A. Antifungal action and induction of resistance by  $\beta$ -aminobutyric acid against *Penicillium digitatum* to control green mold in orange fruit. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 171, p. 104721, jan. 2021.

FANG, S. *et al.* A cell wall-localized  $\beta$ -1,3-glucanase promotes fiber cell elongation and secondary cell wall deposition. **Plant Physiology**, v. 194, n. 1, p. 106–123, 30 dez. 2023.

FENG, L.; WEI, S.; LI, Y. Thaumatin-like Proteins in Legumes: Functions and Potential Applications—A Review. **Plants**, v. 13, n. 8, p. 1124, 17 abr. 2024.

FAO. 2023. FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 19/04/2025.

FERREIRA, K. Q. *et al.* **Therapeutic effects of a purified chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds on irinotecan-induced intestinal mucositis in mice.** *Pharmacology and Toxicology*, , 29 nov. 2024.

FINKINA, E. I. *et al.* Antifungal Plant Defensins as an Alternative Tool to Combat Candidiasis. **Plants**, v. 13, n. 11, p. 1499, 29 maio 2024.

FREIRE, J. E. C. *et al.* Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds, Is a Member of the 2S Albumin Family. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119871, 19 mar. 2015.

FREIRE, J. E. C. *et al.* Mo-CBP3, a 2S albumin from *Moringa oleifera*, is a complex mixture of isoforms that arise from different post-translational modifications. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 68–77, jul. 2019.

GAN, Bee-Ha *et al.* Synergistic Effect of Propidium Iodide and Small Molecule Antibiotics with the Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL against Gram-Negative Bacteria. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5643, 30 nov. 2020.

GAO, F. *et al.* Exploring the antifungal mechanism of  $\beta$ -1,3-glucanase for effectively inhibiting the food contamination by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. **LWT**, v. 187, p. 115342, set. 2023.

GAO, H. *et al.* Lipid transfer proteins involved in plant-pathogen interactions and their molecular mechanisms. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 12, p. 1815–1829, dez. 2022.

- GARCIA, T. B. *et al.* Gene expression and spatiotemporal localization of antifungal chitin-binding proteins during *Moringa oleifera* seed development and germination. **Planta**, v. 249, n. 5, p. 1503–1519, maio 2019.
- GARCÍA, Y. H. *et al.* Toward Understanding the Molecular Recognition of Fungal Chitin and Activation of the Plant Defense Mechanism in Horticultural Crops. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6513, 28 out. 2021.
- GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2993, 9 jan. 2020.
- GAUTIER, A.; DUARTE, C. M.; SOUSA, I. *Moringa oleifera* Seeds Characterization and Potential Uses as Food. **Foods**, v. 11, n. 11, p. 1629, 31 maio 2022.
- GHARSALLAH, K. *et al.* Chemical composition and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 475–482, mar. 2021.
- GHARSALLAH, K. *et al.* *Moringa oleifera*: Processing, phytochemical composition, and industrial applications. **South African Journal of Botany**, v. 160, p. 180–193, set. 2023.
- GHOSH, P.; ROYCHOUDHURY, A. Plant Peptides Involved in Abiotic and Biotic Stress Responses and Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 5, p. 1410–1427, maio 2024.
- GIFONI, Juliana 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, jan. 2012.
- GONG, Z.; ZHANG, S.; LIU, J. Recent Advances in Chitin Biosynthesis Associated with the Morphology and Secondary Metabolite Synthesis of Filamentous Fungi in Submerged Fermentation. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 205, 4 fev. 2023.
- GOW, N. A. R.; LENARDON, M. D. Architecture of the dynamic fungal cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 248–259, abr. 2023.
- HASIM, S.; COLEMAN, J. J. Targeting the Fungal Cell Wall: Current Therapies and Implications for Development of Alternative Antifungal Agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 869–883, abr. 2019.
- HOF, H.; SCHRECKER, J. *Fusarium* spp.: infections and intoxications. **GMS Infectious Diseases**, 2024, Vol. 12, ISSN 2195-8831.
- HÖNG, K. *et al.* The thionin family of antimicrobial peptides. **PLOS ONE**, v. 16, n. 7, p. e0254549, 14 jul. 2021.
- HÖNIG, M. *et al.* Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1146577, 8 maio 2023.
- HUANG, Y. *et al.* Maturation Process, Nutritional Profile, Bioactivities and Utilisation in Food Products of Red Pitaya Fruits: A Review. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2862, 18 nov. 2021.

IBE, C.; MUNRO, C. A. Fungal cell wall: An underexploited target for antifungal therapies. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009470, 22 abr. 2021.

INOKUTI, E. M. *et al.* First Report of *Colletotrichum tropicale* Causing Anthracnose on Pitaya (*Hylocereus costaricensis*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 108, n. 3, p. 797, 1 mar. 2024.

IQBAL, A. *et al.* Lipid transfer proteins: structure, classification and prospects of genetic engineering for improved disease resistance in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 153, n. 1, p. 3–17, abr. 2023.

ISLAM, Z. *et al.* Moringa oleifera is a Prominent Source of Nutrients with Potential Health Benefits. **International Journal of Food Science**, v. 2021, p. 1–11, 10 ago. 2021.

JAIN, M. *et al.* Insights into biological role of plant defense proteins: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102293, mar. 2022.

JIANG, Y. *et al.* Advances in molecular enzymology of  $\beta$ -1,3-glucanases: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 135349, nov. 2024.

JIKAH, A. N.; EDO, G. I. Moringa oleifera: a valuable insight into recent advances in medicinal uses and pharmacological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 103, n. 15, 2023.

KANG, Y. *et al.* Structural basis of lipid transfer by a bridge-like lipid-transfer protein. **Nature**, 23 abr. 2025.

KARIM, Mohammad Mazharul *et al.* Fungicide resistance in *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum siamense* causing peach anthracnose in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 203, p. 106006, ago. 2024.

KASHYAP, P. *et al.* Recent Advances in Drumstick (*Moringa oleifera*) Leaves Bioactive Compounds: Composition, Health Benefits, Bioaccessibility, and Dietary Applications. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 402, 16 fev. 2022.

KAUR, A. *et al.* Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* using in-silico approaches. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0239836, 28 set. 2020.

KAUR, S. *et al.* How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 2, p. 485–504, fev. 2022.

KHAN, R. S. *et al.* Plant chitinases: Types, structural classification, antifungal potential and transgenic expression in plants for enhanced disease resistance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 3, mar. 2024.

KOCYIGIT, E. *et al.* Plant Toxic Proteins: Their Biological Activities, Mechanism of Action and Removal Strategies. **Toxins**, v. 15, n. 6, p. 356, 24 maio 2023.

KOZOME, D. *et al.* Structural Analysis and Construction of a Thermostable Antifungal Chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 12, 28 jun. 2022.

KURSA, W. *et al.* Antifungal Effect of Plant Extracts on the Growth of the Cereal Pathogen *Fusarium spp.*—An In Vitro Study. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 3204, 16 dez. 2022.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LATGÉ, J.-P.; WANG, T. Modern Biophysics Redefines Our Understanding of Fungal Cell Wall Structure, Complexity, and Dynamics. **mBio**, v. 13, n. 3, p. e01145-22, 28 jun. 2022.

LI, X.-H. *et al.* Recent advances in the application of CRISPR/Cas-based gene editing technology in Filamentous Fungi. **Biotechnology Advances**, v. 81, p. 108561, jul. 2025.

LIU, D. *et al.* Insights into the functional mechanism of the non-specific lipid transfer protein nsLTP in *Kalanchoe fedtschenkoi* (Lavender scallops). **Protein Expression and Purification**, v. 226, p. 106607, fev. 2025.

LIU, X. *et al.* Plant Defensin-Dissimilar Thionin *OsThi9* Alleviates Cadmium Toxicity in Rice Plants and Reduces Cadmium Accumulation in Rice Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 8367–8380, 7 jun. 2023.

LOPES, T. D. P. *et al.* Mo-CBP4, a purified chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a potent antidermatophytic protein: In vitro mechanisms of action, in vivo effect against infection, and clinical application as a hydrogel for skin infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 432–442, abr. 2020.

MAHMOOD, T. *et al.* Improved physiological responses and stress tolerance in cotton against *Fusarium* wilt with *Trichoderma harzianum* treatment. **Plant Protection**, v. 8, n. 2, p. 217–228, 27 jun. 2024.

MANGHWAR, H.; HUSSAIN, A. Mechanism of tobacco osmotin gene in plant responses to biotic and abiotic stress tolerance: A brief history. **BIOCELL**, v. 46, n. 3, p. 623–632, 2022.

MANZANARES, P. *et al.* Fighting pathogenic yeasts with plant defensins and anti-fungal proteins from fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 277, dez. 2024.

MARERI, L.; PARROTTA, L.; CAI, G. Environmental Stress and Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5416, 12 maio 2022.

MAXIMIANO, M. R.; FRANCO, O. L. Biotechnological applications of versatile plant lipid transfer proteins (LTPs). **Peptides**, v. 140, p. 170531, jun. 2021.

MISHRA, V.; MISHRA, R.; SHAMRA, R. S. Ribosome inactivating proteins – An unfathomed biomolecule for developing multi-stress tolerant transgenic plants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 210, p. 107–122, jun. 2022.

MOULIN, M. *et al.* Towards a molecular understanding of the water purification properties of Moringa seed proteins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 554, p. 296–304, out. 2019.

MOUSSIAN, B. Chitin: Structure, Chemistry and Biology. Em: YANG, Q.; FUKAMIZO, T. (Eds.). **Targeting Chitin-containing Organisms**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2019. v. 1142p. 5–18.

SILVA NETO, João Xavier da. **Purificação, caracterização bioquímica e atividade contra Candida spp. de uma nova proteína ligante à quitina de sementes de Moringa oleifera LAM.** 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

NETO, J. X. S. *et al.* A Chitin-binding Protein Purified from Moringa oleifera Seeds Presents Anticandidal Activity by Increasing Cell Membrane Permeability and Reactive Oxygen Species Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 980, 6 jun. 2017.

NIKOLIC, Philip; MUDGIL, Poonam. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of Staphylococcus aureus and Their Role in Antibiotic Resistance. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 259, 19 jan. 2023.

NISHAD, R. *et al.* Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1298, 3 jul. 2020.

NUÑEZ-GARCÍA, P. R. *et al.* First Report of *Colletotrichum tropicale* Causing Anthracnose on Pitahaya Fruit in Mexico. **Plant Disease**, v. 107, n. 7, p. 2235, 1 jul. 2023.

OUYANG, Qiuli *et al.* Citronellal Exerts Its Antifungal Activity by Targeting Ergosterol Biosynthesis in Penicillium digitatum. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 432, 29 maio 2021.

PASSOTH, V. Lipids of Yeasts and Filamentous Fungi and Their Importance for Biotechnology. Em: SIBIRNY, A. A. (Ed.). **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**. Cham: Springer International Publishing, p. 325–350, 2017.

PAREEK, A. *et al.* Moringa oleifera: An Updated Comprehensive Review of Its Pharmacological Activities, Ethnomedicinal, Phytopharmaceutical Formulation, Clinical, Phytochemical, and Toxicological Aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2098, 20 jan. 2023.

PENG, Y.; CHEN, B. Role of cell membrane homeostasis in the pathogenicity of pathogenic filamentous fungi. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2299183, 31 dez. 2024.

PEREIRA, L. S. *et al.* Identification of enzyme inhibitors and antimicrobial activities from Capsicum annuum L. protein extracts against Colletotrichum scovillei. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 62, n. 3, p. 493–506, jun. 2021.

PEREIRA, M. L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de Moringa oleifera com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral.** 2014. 211 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

- PEREIRA, M. L. *et al.* Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, n. 11, p. 1078–1085, 1 nov. 2011.
- PERROT, T.; PAULY, M.; RAMÍREZ, V. Emerging Roles of  $\beta$ -Glucanases in Plant Development and Adaptative Responses. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1119, 20 abr. 2022.
- POWERS-FLETCHER, M. V. *et al.* Filamentous Fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, p. 4.3.23, 6 maio 2016.
- RAJNINEC, M. *et al.* Basic  $\beta$ -1,3-Glucanase from *Drosera binata* Exhibits Antifungal Potential in Transgenic Tobacco Plants. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1747, 23 ago. 2021.
- RESENDE, L.M. *et al.* Defensin-like peptides from *Capsicum chinense* induce increased ROS, loss of mitochondrial functionality, and reduced growth of the fungus *Colletotrichum scovillei*. **Pest Management Science**, vol. 80, n. 7, p. 3567-3577, 2024.
- RIQUELME, M. *et al.* Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 2, p. e00068-17, jun. 2018.
- ROBERSON, R. Hyphal structure. Em: BORKOVICH, K. A.; EBBOLE, D. J. (EDS.). **Cellular and molecular biology of filamentous fungi**. Washington, DC: ASM Press, 2010.
- SALOTTI, I.; JI, T.; ROSSI, V. Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 953760, 22 jul. 2022.
- SAMANTA, I. General Characteristics of Fungi. Em: SAMANTA, I. (Ed.). **Veterinary Mycology**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 3–8.
- SEEPE, H. A.; NXUMALO, W.; AMOO, S. O. Natural Products from Medicinal Plants against Phytopathogenic *Fusarium* Species: Current Research Endeavours, Challenges and Prospects. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6539, 29 out. 2021.
- SHARMA, A. *et al.* Effectiveness of fungal, bacterial and yeast antagonists for management of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 135, dez. 2021.
- SHARMA, A. *et al.* Molecular Characterization Revealed the Role of Thaumatin-Like Proteins of Bread Wheat in Stress Response. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 807448, 11 jan. 2022.
- SHARMA, A. *et al.* Expanding role of ribosome-inactivating proteins: From toxins to therapeutics. **IUBMB Life**, v. 75, n. 2, p. 82–96, fev. 2023.
- SHOBADE, S. O.; ZABOTINA, O. A.; NILSEN-HAMILTON, M. Plant root associated chitinases: structures and functions. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1344142, 1 fev. 2024.
- SONG, L. *et al.* Regulation of Ergosterol Biosynthesis in Pathogenic Fungi: Opportunities for Therapeutic Development. **Microorganisms**, v. 13, n. 4, p. 862, 10 abr. 2025.

- SOUZA, T. M. *et al.* First Report of *Colletotrichum tropicale* Causing Leaf Spot on *Cariniana legalis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 2, p. 578, 1 fev. 2023.
- TAIF, S. *et al.* A  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Panax notoginseng* confers resistance in tobacco to *Fusarium solani*. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111947, jan. 2020.
- TAKASHIMA, T. *et al.* Characterization of an antifungal  $\beta$ -1,3-glucanase from *Ficus microcarpa* latex and comparison of plant and bacterial  $\beta$ -1,3-glucanases for fungal cell wall  $\beta$ -glucan degradation. **Planta**, v. 258, n. 6, p. 116, dez. 2023.
- TALHINHAS, P.; BARONCELLI, R. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109–198, set. 2021.
- THIND, T. S. Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 4, p. 875–883, dez. 2021.
- TIKU, A.R. Antimicrobial Compounds (Phytoanticipins and Phytoalexins) and Their Role in Plant Defense. Em: Merillon, JM., Ramawat, K. (Ed.) *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Cham: Springer, **Reference Series in Phytochemistry**, 2020.
- TSEDALEY, B.; ALEMU, K. Genotypes at Assosa Zone, Western Ethiopia. 2025.
- URBAR-ULLOA, J. *et al.* Cell surface display of proteins on filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 6949–6972, set. 2019.
- UWINEZA, Pascaline Aimee *et al.* Efficacy of *Lamium album* as a natural fungicide: impact on seed germination, ergosterol, and mycotoxins in *Fusarium culmorum*-infected wheat seedlings. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1363204, 23 fev. 2024.
- VAGHELA, B. *et al.* Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 159, p. 110055, set. 2022.
- VIEIRA, N. Q. B. *et al.* Cultivation of yellow melon subjected to different irrigation levels and application of arbolina® biostimulant. **Revista Caatinga**, v. 37, p. e12452, 2024.
- WESTRICK, N. M.; SMITH, D. L.; KABBAGE, M. Disarming the Host: Detoxification of Plant Defense Compounds During Fungal Necrotrophy. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 651716, 30 abr. 2021.
- XUAN, C. *et al.* Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Chitinase Genes in Watermelon under Abiotic Stimuli and *Fusarium oxysporum* Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 638, 4 jan. 2024.
- YIN, Y. *et al.* Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. **Phytopathology®**, v. 113, n. 4, p. 707–718, abr. 2023.

YU, Daliang *et al.* Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 339, p. 129878, jul. 2021.

YUAN, Tiantian *et al.* Efficacy and Antifungal Mechanism of Rosemary Essential Oil against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Forests**, v. 15, n. 2, p. 377, 18 fev. 2024.

ZAKARIA, L. Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops—A Review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 30 mar. 2021.

ZHANG, S. *et al.* Characterization and Pathogenicity of *Colletotrichum truncatum* Causing *Hylocereus undatus* Anthracnose through the Changes of Cell Wall-Degrading Enzymes and Components in Fruits. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 9, p. 652, 13 set. 2024.

ZHAO, Y. *et al.* Thaumatin-like protein family genes VfTLP4-3 and VfTLP5 are critical for faba bean's response to drought stress at the seedling stage. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 206, p. 108243, jan. 2024.

ZHENG, Y. *et al.* Study on the Antifungal Activity of Gallic Acid and Its Azole Derivatives against *Fusarium graminearum*. **Molecules**, v. 29, n. 9, p. 1996, 26 abr. 2024.

ZIELIŃSKI, K.  $\beta$ -1,3-Glucanases and chitinases participate in the stress-related defence mechanisms that are possibly connected with modulation of arabinogalactan proteins (AGP) required for the androgenesis initiation in rye (*Secale cereale* L.). **Plant Science**, 2021.

## ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM COAUTORIA COM A ORIENTADORA

Probiotics and Antimicrobial Proteins  
<https://doi.org/10.1007/s12602-025-10744-7>

## RESEARCH



## Advancing the Understanding of the *Mo*-CBP<sub>2</sub> Protein: Unraveling Its Antifungal and Antibiofilm Properties Against *Candida* Species

João Xavier da Silva Neto<sup>1</sup> · Laís Oliveira Leite<sup>1</sup> · Ana Paula Apolinário da Silva<sup>2</sup> · Maria Izabel Florindo Guedes<sup>2</sup> · Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa<sup>1</sup>

Received: 26 May 2025 / Accepted: 21 August 2025  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2025

### Abstract

*Candida* spp. are opportunistic fungi capable of forming biofilms, a key factor contributing to their resistance to conventional antifungals. This highlights the need for novel compounds with distinct mechanisms of action to combat fungal infections. This study aimed to evaluate the antifungal activity of *Mo*-CBP<sub>2</sub>, a chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds, against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, with a specific focus on its effects on planktonic cells and biofilms, and to investigate its mechanism of action. *Mo*-CBP<sub>2</sub> was purified via affinity and ion-exchange chromatography. Antifungal activity was assessed using microdilution, CFU counts, and MTT assays for planktonic cells, and crystal violet staining for biomass quantification in both early-stage and mature biofilms. Mechanistic studies included aggregation assays, sorbitol protection tests, and ergosterol quantification. Against planktonic cells, *Mo*-CBP<sub>2</sub> exhibited potent antifungal activity, with MIC<sub>50</sub> values ranging from 20–45 μM, reducing metabolic activity and CFUs by up to 90%. Additionally, it promoted aggregation of fungal cells, indicating interaction with cell wall components, and showed a fungistatic profile. Regarding biofilms, *Mo*-CBP<sub>2</sub> significantly inhibited biomass formation in both initial adhesion and mature stages (CIB<sub>50</sub> = 20 μM), with greater efficacy than nystatin. Mechanistic assays revealed that its antibiofilm effect is independent of ergosterol biosynthesis or cell wall synthesis pathways, as no alterations were observed in the presence of sorbitol or in sterol content. *Mo*-CBP<sub>2</sub> presents strong antifungal and antibiofilm activities against *Candida* spp., acting through a novel, non-conventional mechanism.

**Keywords** Candidiasis · Plant lectins · Fungistatic · Alternative mechanism · Cellular interaction · Fungal resistance · Emerging therapeutics

### Introduction

Infections caused by fungi, mainly yeasts of the genus *Candida*, can place an enormous burden on healthcare systems worldwide [1–4]. *Candida* spp. are commensal yeasts in the natural human microbiota, but in some cases, they can cause

infections (superficial or systemic) [5–8]. Risk factors for developing these infections include the presence of diabetes [9, 10], immunosuppression (due to disease or medical treatment) [11–13], skin lesions, among others [14–16].

Several species of the *Candida* genus are responsible for human infections, including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and, more recently, *C. auris* [17–22]. The distribution and frequency of these species can vary considerably according to geographical, epidemiological and population factors, with no single species being predominant worldwide. Despite these variations, all of these species are clinically relevant, being associated with severe manifestations, resistance to antifungal drugs and having a significant impact on immunocompromised patients. Additionally, each species exhibits unique characteristics pertaining to pathogenicity mechanisms, resistance profiles, susceptibility to treatments and tropism for distinct tissues [23–27]. Yeasts of the genus *Candida*, as well as other yeast-like fungi, have

João Xavier da Silva Neto and Laís Oliveira Leite contributed equally to this work.

✉ João Xavier da Silva Neto  
 xaviersnn@outlook.com; xavierbiol@hotmail.com

✉ Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
 daniele.sousa@ufc.br

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Biotechnology and Molecular Biology, Health Sciences Center, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil