



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

ARTHUR VIEIRA SANTOS

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEASE DA ALBUMINA-2S (Mo-CBP3)
DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA*

FORTALEZA

2025

ARTHUR VIEIRA SANTOS

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEASE DA ALBUMINA-2S (Mo-CBP3) DE
SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2025

ARTHUR VIEIRA SANTOS

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE NUCLEASE DA ALBUMINA-2S (Mo-CBP3) DE
SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em: 28/10/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thalles Barbosa Granjeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais, Marlene e Nonato.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, pela excelente orientação, paciência e por ter acreditado em um projeto novo.

Aos professores participantes da banca examinadora Thalles Barbosa Grangeiro e Felipe Domingos de Sousa pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Em especial ao professor Thalles, por ter me cedido infraestrutura, orientações e recursos para o início do projeto.

Ao Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa, que acreditou no potencial do projeto e deu todo o suporte necessário para sua finalização.

Aos amigos da pós-graduação Laís e Ariel, que me ajudaram com recursos e mãos nos experimentos sem nenhum questionamento.

À minha companheira Larissa Maria, que sem seu suporte, este trabalho não teria sido finalizado.

Aos amigos de laboratório, Beatriz Nogueira, José Edvar, Filipe Vieira, Abner, Caroline e Cecília, pelo café da tarde e pelas risadas compartilhadas.

Aos meus pais, que incondicionalmente me apoiaram na carreira que escolhi seguir.

À Universidade Federal do Ceará e ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela estrutura e docentes.

À Universidade de Fortaleza pela infraestrutura cedida.

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

“Não é o mais forte das espécies que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.” — Charles Darwin.

RESUMO

A planta *Moringa oleifera* (Moringaceae) está presente na região do semiárido. Suas sementes possuem elevado teor de lipídios e a farinha obtida a partir de suas sementes é utilizada para induzir a floculação de partículas sólidas em águas turvas, permitindo a remoção e melhorando a qualidade da água para consumo humano. Pelo menos três proteínas que se ligam a quitina, sem atividade quitinásica, foram detectadas e estudadas a partir das sementes de moringa. Entretanto, uma atividade nucleásica parece coexistir em uma das frações purificadas das proteínas ligantes de quitina. Esta foi a problemática que motivou esta pesquisa. Por meio de cromatografia de afinidade à quitina, uma fração proteica com afinidade (PAC) é obtida e esse pico cromatográfico foi submetido a troca iônica dando origem a 3 picos característicos, sendo o pico 3 (CM-PIII) designado como Mo-CBP3. Estudos preliminares com essa amostra demonstraram atividades nucleolíticas contra DNA plasmidial na quantidade de 1,25 µg de proteína e 1 µg de ácido nucléico. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% revelou 3 bandas previamente não descritas. Diferentes abordagens de purificação foram utilizadas para separar a Mo-CBP3 de seus contaminantes: cromatografia de fase reversa, filtração por ultra-centrifugação e cromatografia de exclusão molecular (SEC). A cromatografia por exclusão molecular utilizando PAC demonstrou a melhor recuperação de proteínas e apresentou 4 picos, que foram submetidos à análise por eletroforese. A eletroforese revelou a separação das proteínas desconhecidas das proteínas conhecidas como MOCBPs (*Moringa oleifera* chitin-binding proteins). Os picos da SEC foram submetidos a ensaios de clivagem de DNA e RNA plasmidiais obtidos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, apresentando atividade comparada às nucleases comerciais no pico 3 (P3-SE). Em resumo, a purificação refinada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) foi crucial para isolar a atividade biológica. Os resultados demonstraram que o P3-SE da SEC, correspondente à proteína Mo-CBP3, possui notável atividade nucleolítica contra DNA e RNA plasmidial de *Klebsiella pneumoniae*. Esta descoberta de uma nova atividade para a Mo-CBP3 amplia o vasto potencial das sementes de *Moringa oleifera* como uma fonte promissora para a bioprospecção de nucleases.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*; atividade nucleásica; proteínas de reserva vegetal.

ABSTRACT

The plant *Moringa oleifera* (Moringaceae) is present in the semi-arid region. Its seeds have a high lipid content, and the flour obtained from its seeds is used to induce the flocculation of solid particles in turbid waters, allowing for removal and improving water quality for human consumption. At least three chitin-binding proteins, without chitinase activity, have been detected and studied from moringa seeds. However, a nuclease activity seems to coexist in one of the purified fractions of the chitin-binding proteins. This was the problem that motivated this research. Through chitin affinity chromatography, a protein fraction with affinity (PAC) is obtained, and this chromatographic peak was subjected to ion exchange, giving rise to 3 characteristic peaks, with peak 3 (CM-PIII) designated as Mo-CBP3. Preliminary studies with this sample demonstrated nucleolytic activities against plasmidial DNA in the amount of 1,25 ug of protein and 1 ug of nucleic acid. 15% polyacrylamide gel electrophoresis revealed 3 previously undescribed bands. Different purification approaches were used to separate Mo-CBP3 from its contaminants: reverse phase chromatography, ultra centrifugation filtration, and size exclusion chromatography (SEC). Size exclusion chromatography using PAC showed the best protein recovery and presented 4 peaks, which were subjected to electrophoresis analysis. Electrophoresis revealed the separation of the unknown proteins from the known proteins as Mo-CBPs (*Moringa oleifera* chitin-binding proteins). The SEC peaks were subjected to plasmidial DNA and RNA cleavage assays obtained from *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, showing activity comparable to commercial nucleases in peak 3 (P3-SE). In summary, the refined purification by size exclusion chromatography (SEC) was crucial to isolate the biological activity. The results demonstrated that the P3-SE of the SEC, corresponding to the Mo-CBP3 protein, possesses remarkable nucleolytic activity against plasmidial DNA and RNA from *Klebsiella pneumoniae*. This discovery of a new activity for Mo-CBP3 expands the vast potential of *Moringa oleifera* seeds as a promising source for nuclease bioprospection.

Keywords: *Moringa oleifera*; nucleolytic activity; plants reserve proteins.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | - Aspectos morfológicos da <i>Moringa oleifera</i> | 15 |
| Figura 2 | - Modelo tridimensional da proteína Mo-CBP2 | 18 |
| Figura 3 | - Estrutura cristalográfica da Mo-CBP3..... | 19 |
| Figura 4 | - Modelo tridimensional da Mo-CBP4..... | 20 |
| Figura 5 | - Esquema de estratégias de purificação | 37 |
| Figura 6 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do CM-PIII da troca iônica..... | 39 |
| Figura 7 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da Mo-CBP3 | 40 |
| Figura 8 | - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando a ação do pico CM-PIII (troca iônica) sobre DNA | 41 |
| Figura 9 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% mostrando os picos da cromatografia por fase reversa | 42 |
| Figura 10 | - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando a ação dos picos RP-II e RP-PIII | 43 |
| Figura 11 | - Esquema de concentrador por ultracentrifugação mostrando as porções concentrada (C) e diluída (D)..... | 47 |
| Figura 12 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do CM-PIII após filtração concentrador de 30 kDa | 48 |
| Figura 13 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando os picos de cromatografia de exclusão molecular na presença de DTT | 50 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14 | - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando PAC e os picos de cromatografia de exclusão molecular na ausência de DTT | 51 |
| Figura 15 | - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a ação dos picos da SEC contra DNA plasmidial | 55 |
| Figura 16 | - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a atividade de PAC contra RNA em quantidades crescentes de proteína | 56 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 | - Cromatografia de afinidade à quitina | 38 |
| Gráfico 2 | - Cromatografia por troca iônica CM-Sepharose Fast Flow | 39 |
| Gráfico 3 | - Cromatografia por fase reversa do pico CM-PIII (troca iônica) | 42 |
| Gráfico 4 | - Gráfico de abundâncias normalizadas a partir da espectrometria de massas do RP-II da cromatografia de fase reversa | 45 |
| Gráfico 5 | - Gráfico de abundâncias normalizadas e desvio padrão de espectrometria de massas do pico 2 da cromatografia de fase reversa . | 46 |
| Gráfico 6 | - Cromatograma exclusão molecular do pico de afinidade à quitina | 52 |
| Gráfico 7 | - Picos encontrados na cromatografia de exclusão molecular de PAC | 53 |
| Gráfico 8 | - Altura e área dos picos de eluição obtidos na SEC | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | - Principais informações conhecidas das proteínas ligantes de quitina isoladas de sementes de <i>Moringa oleifera</i> | 21 |
| Tabela 2 | - Exemplos de nucleases vegetais..... | 24 |
| Tabela 3 | - Áreas e alturas SEC..... | 52 |
| Tabela 4 | - Dados adicionais SEC..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|----------------------------------------------------------------------|
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil |
| CBPs | Chitin-Binding Proteins (Proteínas Ligantes à Quitina) |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| FDR | Taxa de Falsa Descoberta |
| FPLC | Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas |
| IAA | Iodoacetamida |
| kDa | Quilo Dalton |
| LC-MS/MS | Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem |
| Mo-CBP2 | <i>Moringa oleifera</i> Chitin-Binding Protein 2 |
| Mo-CBP3 | <i>Moringa oleifera</i> Chitin-Binding Protein 3 |
| Mo-CBP4 | <i>Moringa oleifera</i> Chitin-Binding Protein 4 |
| m/z | Massa por carga |
| mAU | Mili-Unidade de Absorbância |
| PAC | Pico de Afinidade à Quitina |
| PDB | Protein Data Bank |
| pI | Ponto Isoelétrico |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| SARS-CoV-2 | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio |
| SEC | Cromatografia de Exclusão Molecular |
| TFA | Ácido Trifluoroacético |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| UNIFOR | Universidade de Fortaleza |
| UniProt | Banco de Dados de Sequência de Proteínas |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | <i>Moringa oleifera</i> | 17 |
| 2.2 | Frações ligantes à quitina | 18 |
| 2.2.1 | <i>Mo-CBP2</i> | 18 |
| 2.2.2 | <i>Mo-CBP3</i> | 19 |
| 2.2.3 | <i>Mo-CBP4</i> | 20 |
| 2.3 | Albuminas 2S | 22 |
| 2.4 | Atividade nucleolítica em proteínas vegetais | 23 |
| 2.5 | Mecanismos de resistência antimicrobiana | 25 |
| 2.6 | Aplicações biotecnológicas de nucleases vegetais | 26 |
| 2.6.1 | <i>Agricultura</i> | 26 |
| 2.6.2 | <i>Aplicações Terapêuticas e Medicinais</i> | 26 |
| 2.6.3 | <i>Bioprocessos Industriais e Biorremediação</i> | 27 |
| 2.6.4 | <i>Perspectivas futuras</i> | 28 |
| 3 | HIPÓTESE | 29 |
| 4 | OBJETIVOS | 29 |
| 4.1 | Objetivo Geral | 29 |
| 4.2 | Objetivos Específicos | 29 |
| 5 | METODOLOGIA | 30 |
| 5.1 | Material biológico | 30 |
| 5.1.1 | <i>Sementes de Moringa oleifera</i> | 30 |
| 5.1.2 | <i>Ácidos nucleicos</i> | 30 |
| 5.2 | Extração de proteínas das sementes | 30 |
| 5.3 | Estratégias de purificação | 31 |
| 5.3.1 | <i>Cromatografia de fase reversa</i> | 31 |
| 5.3.2 | <i>Filtração por ultracentrifugação</i> | 31 |
| 5.3.3 | <i>Cromatografia por exclusão molecular</i> | 32 |
| 5.4 | Atividade Nucleolítica | 32 |
| 5.5 | Espectrometria de Massas | 33 |
| 5.5.1 | <i>Digestão por Tripsina</i> | 33 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5.2 | <i>Processamento dos dados</i> | 34 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 6.1 | Separação das proteínas ligantes à quitina a partir do extrato protéico de farinha de sementes | 37 |
| 6.2 | Análise eletroforética das proteínas fracionadas por cromatografia de troca iônica | 38 |
| 6.3 | Ação nucleásica do pico CM-PIII | 40 |
| 6.4 | Picos da cromatografia de fase reversa | 41 |
| 6.5 | Espectrometria de massas dos picos da cromatografia por fase reversa | 44 |
| 6.5.1 | <i>RP-PI</i> | 44 |
| 6.5.2 | <i>RP-PII</i> | 45 |
| 6.6 | Pico CM-PIII em cromatografia por exclusão molecular | 47 |
| 6.7 | Purificação via filtração por ultracentrífuga | 47 |
| 6.8 | Exclusão molecular do pico de afinidade à quitina | 49 |
| 6.9 | Atividade nucleásica contra DNA com os picos da exclusão molecular com PAC | 54 |
| 6.10 | Atividade nucleásica contra RNA utilizando PAC | 56 |
| 7 | CONCLUSÃO | 30 |
| | REFERÊNCIAS | 30 |

1 INTRODUÇÃO

A corrida pela descoberta de novas moléculas bioativas frequentemente direciona os esforços científicos para ambientes extremos ou organismos exóticos, na esperança de encontrar compostos inéditos. No entanto, um potencial imenso e muitas vezes subestimado reside na reavaliação de fontes biológicas já exaustivamente exploradas, como plantas medicinais tradicionais, microrganismos comumente cultivados ou subprodutos da agroindústria. Nesse contexto, a prospecção de moléculas bioativas oriundas de fontes naturais já exploradas tem se mostrado uma abordagem promissora para a descoberta de novas funcionalidades em compostos já descritos. Entre essas funções, destaca-se a atividade nucleolítica, capaz de degradar ácidos nucleicos, um importante mecanismo de defesa de bactérias e plantas (SHARMA et al., 2019; WANG et al., 2018).

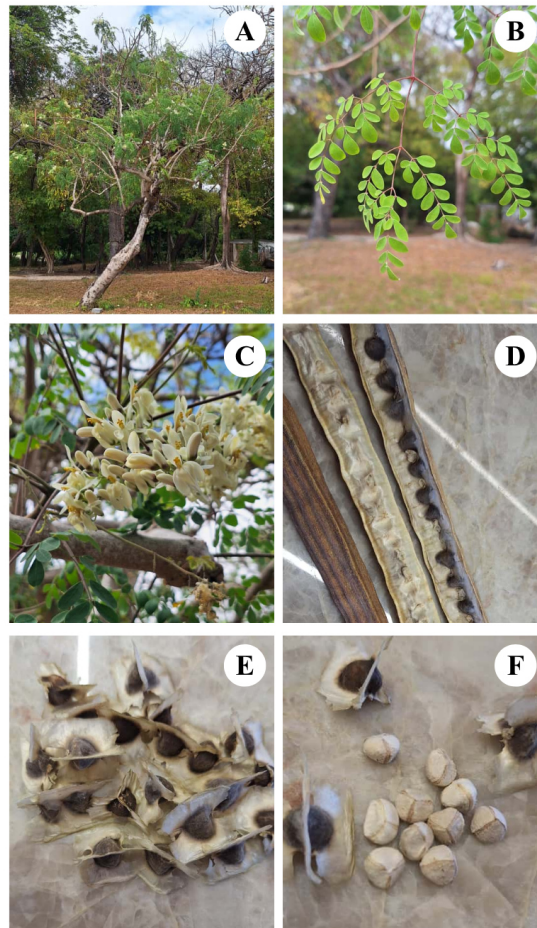
No reino vegetal, diversas proteínas com atividades que contribuem para a defesa demonstram multifuncionalidade, apresentando simultaneamente afinidade por carboidratos estruturais — como a quitina — e capacidade de degradar DNA e/ou RNA. (ITO; FUKUDA, 2002; LIN et al., 2008). Essa combinação de atividades pode ampliar o espectro de ação contra fungos, bactérias e vírus, permitindo que uma única proteína seja funcionalmente capaz de simultaneamente provocar danos à parede celular e, em sequência, danificar o material genético do microrganismo invasor. Apesar desse potencial, a diversidade e as aplicações dessas proteínas, as nucleases vegetais permanecem pouco exploradas, sobretudo em espécies tropicais como *Moringa oleifera* (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016).

A esse respeito, nucleases são enzimas que hidrolisam ligações fosfodiéster em ácidos nucleicos, sendo classificadas como dnases, que atuam em DNA, RNases, que atuam em RNA, ou mesmo capazes de atuar sobre os dois. Ainda, essas enzimas podem ser endonucleases, que hidrolisam ligações internas, dentro, da cadeia, ou exonucleases que clivam ligações covalentes pelas extremidades (GARCIA GONZALEZ; HERNANDEZ, 2022). As primeiras evidências da ocorrência dessas proteínas foram descobertas na década de 90, por químicos ainda em estudos para a descoberta da composição dos ácidos nucleicos (KUNITZ, 1939).

O estudo de novas proteínas nucleolíticas vegetais contribui não apenas para elucidar aspectos fundamentais da biologia e defesa das plantas, mas também para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, biopesticidas e ferramentas de biotecnologia molecular. Assim,

investigar proteínas nas sementes de *Moringa oleifera* (figura 1) representa uma oportunidade estratégica para a descoberta de compostos inovadores com potenciais aplicações em saúde, agricultura e indústria (PEREIRA et al., 2011; LOPES et al., 2017).

Figura 1 – Aspectos morfológicos da *Moringa oleifera*



Aspectos morfológicos da *Moringa oleifera*: (A) árvore adulta; (B) detalhe das folhas; (C) flores; (D) fruto (vagem com sementes em seu interior); (E) sementes de *Moringa oleifera*; (F) sementes destegumentadas. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Nas sementes de *M. oleifera*, existem proteínas de ligação à quitina (CBPs) de *Moringa oleifera* — Mo-CBP₂, Mo-CBP₃ e Mo-CBP₄ — são glicoproteínas básicas com propriedades antifúngicas e estruturais distintas. A Mo-CBP₂ tem cerca de 13,3 kDa, pI ~10,9, atua contra espécies de *Candida*, aumentando a permeabilidade celular, induzindo produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e causando danos ao DNA (NETO et al., 2017). A Mo-CBP₃, uma albumina 2S (~14 kDa, pI ~10,8), inibe fungos fitopatogênicos como *Fusarium solani*, é termoestável, e interfere na membrana plasmática dos fungos (BATISTA

et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019). Já a Mo-CBP4 (~28 kDa) apresenta forte atividade contra dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes*, além de propriedades anti-inflamatórias e analgésicas demonstradas em modelos animais, sem apresentar toxicidade (LOPES et al., 2020). Todas demonstram alta estabilidade e potencial aplicação nas áreas farmacêutica, agrícola e cosmética, e o extrato protéico das sementes passa por um processo laborioso até o isolamento destas proteínas (PEREIRA et al., 2011).

Diante do crescente desafio global da resistência antimicrobiana, que ameaça a eficácia dos tratamentos convencionais, as proteínas nucleolíticas vegetais emergem como alternativas promissoras devido à sua capacidade única de degradar ácidos nucleicos (GOBERT et al., 2021). As sementes de *Moringa oleifera*, em particular, têm revelado um rico repertório de proteínas multifuncionais, como as Mo-CBPs, que apresentam atividades antimicrobianas.

Até o início deste trabalho, três proteínas ligantes à quitina eram conhecidas no extrato de albuminas de sementes de *Moringa oleifera*. No entanto, estudos preliminares revelaram a presença de proteínas minoritárias co-purificadas na fração designada Mo-CBP3. Paralelamente a essas observações, foi observada uma atividade nucleolítica na referida fração (Mo-CBP3), levantando a dúvida se a função nucleásica é exercida pelo contaminante, ou a proteína Mo-CBP3 possui dupla atividade, possuindo ação catalítica. Diante destas observações, este estudo foi guiado pelo objetivo de confirmar a atividade nucleolítica da fração denominada Mo-CBP3 e identificar se a mesma estaria relacionada às proteínas minoritárias da amostra ou seria uma atividade catalítica presente na proteína Mo-CBP3, a qual tem capacidade de ligação a quitina, sem, entretanto realizar catálise.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Moringa oleifera*

A moringa ou árvore-de-rabanete, chama-se *Moringa oleifera*, uma planta com origem no norte da Índia, presente em regiões tropicais e subtropicais devido ao seu alto valor nutritivo e propriedades medicinais. Suas folhas, sementes, flores e raízes apresentam uma composição química rica em metabólitos, incluindo vitaminas, minerais, polifenóis e proteínas de alto valor biológico (ABD et al., 2022).

O gênero *Moringa* engloba treze espécies, que têm sido amplamente pesquisadas devido à presença de substâncias floculantes em suas sementes. Essas propriedades permitem seu uso no tratamento de água, tornando-a potável tanto para humanos quanto para animais. Dentre as espécies desse gênero, a *Moringa oleifera* se destaca não apenas por sua eficiência na purificação hídrica, mas também por sua resistência a pragas, adaptabilidade a diferentes condições de cultivo e crescimento acelerado (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016).

No Nordeste brasileiro, a *Moringa oleifera* foi introduzida nos anos 1950 e, desde então, tem sido amplamente utilizada para diferentes finalidades. Essa planta é bastante empregada na decoração de áreas verdes, como parques e jardins, além de servir como suplemento nutricional para animais e humanos. Também é conhecida por suas propriedades medicinais, sendo aproveitada na fitoterapia e na medicina popular (PINHEIRO et al., 2008).

Além das aplicações já mencionadas, a *Moringa oleifera* tem um histórico milenar de uso na medicina tradicional em diversas regiões do mundo. Esse fato tem motivado pesquisas científicas para a identificação e isolamento de compostos bioativos com aplicações biotecnológicas. Um estudo significativo conduzido por Lipipun comprovou a atividade antiviral do extrato etanólico das folhas dessa planta contra o HSV-1 (Herpes simplex vírus tipo 1) (2003). Os resultados demonstraram não apenas a inibição da replicação viral *in vitro*, mas também a redução da mortalidade em camundongos infectados experimentalmente com o vírus.

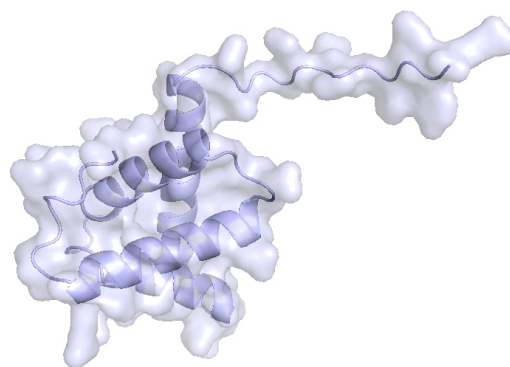
2.2 Frações ligantes à quitina

As sementes de *Moringa oleifera* são bastante estudadas por seu alto teor proteico, aproximadamente 37,8% de sua composição total, e a partir do extrato aquoso das sementes foram descobertas proteínas ligantes à quitina, denominadas de Mo-CBP's (*Moringa oleifera chitin binding proteins*). A nomenclatura representa “Moringa-Chitin-binding proteins” porque as proteínas foram retiradas do extrato salino proteico total por meio de cromatografia de afinidade em coluna de quitina. As proteínas ligantes a quitina foram eluídas e retidas na coluna, após eluídas com ácido acético, e são submetidas à uma cromatografia de troca iônica em coluna CM-Sepharose Fast Flow, por meio da qual 3 novas frações proteicas são obtidas e denominadas de Mo-CBP2, Mo-CBP3 e Mo-CBP4 (PEREIRA et al., 2011).

2.2.1 Mo-CBP2

Descrita por João X. S. Neto, Mo-CBP2 (Fig. 2) é uma glicoproteína básica (pI 10,9) com massa molecular de aproximadamente 13,3 kDa, capaz de formar oligômeros estáveis. Ademais, essa proteína apresenta atividade inibitória sobre leveduras *Candida*, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com seu mecanismo de ação incluindo o aumento da permeabilidade da membrana celular fúngica, a indução de estresse oxidativo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a degradação de ácidos nucleicos (NETO, 2020).

Figura 2 – Modelo tridimensional da proteína Mo-CBP2



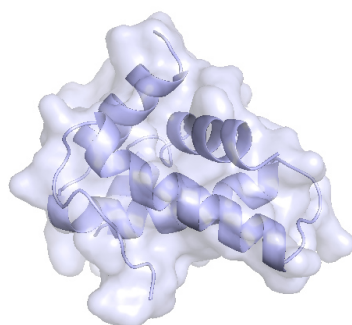
Fonte: criado pelo autor utilizando o programa PyMol e a sequência C0HKC5 do UniProt (2025).

2.2.2 Mo-CBP3

A Mo-CBP3 (Fig. 3), uma proteína termoestável de 14 kDa, presente nas sementes de *Moringa oleifera*, também apresenta atividades antifúngicas e antibacterianas. Os peptídeos sintéticos projetados com base na sequência da Mo-CBP3 demonstraram capacidade de inibir o crescimento de espécies patogênicas de *Candida*, e apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* (FREIRE et al., 2019). Além disso, há relatos na literatura acerca do potencial antiviral de peptídeos sintéticos desta proteína contra o vírus SARS-CoV-2 (SOUZA, 2020). Portanto, o potencial antimicrobiano destas proteínas já foi devidamente documentado.

Estudos conduzidos por Batista e colaboradores (2013) revelaram que essa proteína atua inibindo as bombas de prótons (H^+ -ATPase) da membrana plasmática fúngica, comprometendo o equilíbrio iônico e o gradiente eletroquímico essencial para a sobrevivência celular. Paralelamente, a proteína chamada de Mo-CBP3 induz alterações estruturais significativas na parede celular de fungos fitopatogênicos, levando a deformações que prejudicam sua integridade e função. Entre os patógenos sensíveis a essa proteína destacam-se importantes agentes de doenças em plantas, como fungos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides* (GIFONI et al., 2011). A ampla ação sobre diferentes espécies fúngicas, combinada com seu duplo mecanismo de ação - que atua simultaneamente na membrana e na parede celular -, sugere que a Mo-CBP3 possui grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento de agentes antifúngicos inovadores.

Figura 3 – Estrutura cristalográfica da Mo-CBP3



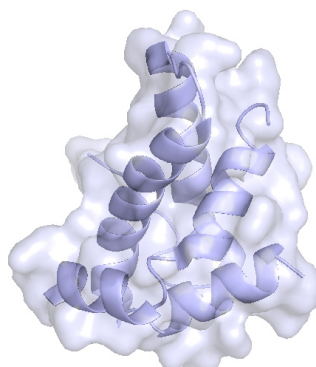
Fonte: criado pelo autor utilizando o programa PyMol e a sequência 5DOM do PDB (2025).

No estudo de Ullah, a estrutura cristalina da proteína Mo-CBP3 foi determinada com uma resolução de 1,7 Å. A análise estrutural revelou que a proteína é composta por duas cadeias α -helicoidais processadas proteoliticamente e estabilizadas por quatro pontes dissulfeto. Essa estrutura apresenta alta estabilidade, resistência a variações de pH e um ponto de fusão de aproximadamente 98 °C. Os resíduos de arginina, nas posições: 4, 14, 18, 21, 22, 63, 64, 68, 75, 81, 98, 103, 117 e 121; presentes na superfície, e a poliglutamina, conjunto de glutaminas sequenciais nas posições 1-3, 10-12, 87-90 e 94-95, são os principais fatores estruturais responsáveis por suas atividades de floculação, antibacteriana e antifúngica (FREIRE et al., 2019). Este estudo descreveu o primeiro modelo de uma albumina 2S baseado na proteína cristalizada, e esse modelo sugere modificações que ocorrem durante a formação da Mo-CBP3, além de demonstrar padrões da conformação e da distribuição de cargas que podem explicar suas diversas atividades biológicas (ULLAH et al., 2015).

2.2.3 Mo-CBP4

A proteína Mo-CBP4 (Fig. 4), isolada das sementes de *Moringa oleifera*, é uma glicoproteína ligante à quitina com importantes propriedades farmacológicas, sendo anti-inflamatória e reduzindo a sensibilidade à dor. Trata-se de uma proteína básica (pI \approx 10,55), com massa molecular aproximada de 11,78 kDa. Estudos demonstraram que a administração de Mo-CBP4 em modelos animais apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória significativa — tanto por via intraperitoneal (3,5 e 10 mg/kg) quanto oral (10 mg/kg) (PEREIRA et al., 2011).

Figura 4 – Modelo tridimensional da Mo-CBP4



Fonte: criado pelo autor utilizando o programa PyMol e a sequência 6VJ0 do PDB (2025).

Além disso, investigações publicadas em 2020 mostraram que o Mo-CBP4 possui forte potencial antidermatofítico, uma vez que, *in vitro*, a proteína reduziu em 50% a germinação de microconídios de *Trichophyton mentagrophytes* a 45 μM sem inibir o crescimento tubular, persistindo o efeito mesmo na presença de N-acetil-D-glucosamina, a unidade de carboidrato formadora da quitina. Os mecanismos envolvidos incluem aumento da permeabilidade de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dano à parede celular. Em modelos *in vivo* de dermatofitose, Mo-CBP4 (5, 10 e 20 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) reduziu tanto a gravidade quanto o tempo da infecção em modelo murino utilizando o fungo *Trichophyton mentagrophytes*. Essas evidências indicam seu potencial para desenvolvimento como tratamento antifúngico clínico, inclusive em forma de hidrogel tópico (LOPES et al., 2020). A Tabela 1 apresenta um conjunto suscrito das informações sobre o conjunto de proteínas ligantes de quitina que foram descritas estudadas a partir do extrato aquoso de farinha de sementes de *M. oleífera*.

Tabela 1 – Principais informações conhecidas das proteínas ligantes de quitina isoladas de sementes de *Moringa oleifera*

| Proteína | Massa molecular (kDa) | pI | Atividades conhecidas | Patógenos alvo | Referência |
|----------|-----------------------|------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|
| Mo-CBP2 | 13,3 | 10,9 | Antifúngica (<i>Candida</i> spp.), degradação de ácidos nucleicos | <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> | NETO et al., 2020 |
| Mo-CBP3 | 14 | - | Antifúngica, antibacteriana, antiviral (SARS-CoV-2) | <i>Fusarium</i> spp., <i>S. aureus</i> | SOUZA, 2020 |
| Mo-CBP4 | 11,8 | 10,5 | Antidermatofítica, anti-inflamatória | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | LOPES et al., 2020 |

Fonte: criado pelo autor (2025).

A tabela 1 apresenta um comparativo estrutural e funcional entre as proteínas Mo-CBP2, Mo-CBP3 e Mo-CBP4 de *Moringa oleifera*, destacando seu potencial biotecnológico diversificado. Enquanto a Mo-CBP2 (13,3 kDa; pI 10,9) demonstra atividade antifúngica específica contra *Candida* spp. e capacidade de degradação de ácidos nucleicos, a Mo-CBP3 (14 kDa) exibe um espectro de ação mais amplo, incluindo ação contra fungos (*Fusarium* spp.), bactérias (*S. aureus*) e até vírus (SARS-CoV-2). Já a Mo-CBP4 (11,8 kDa; pI 10,5) destaca-se por sua aplicação terapêutica, com efeitos anti dermatofíticos (contra *T. mentagrophytes*) e anti-inflamatórios comprovados *in vivo*.

2.3 Albuminas 2S

O termo "albumina" foi originalmente utilizado como uma denominação genérica para proteínas hidrossolúveis, conforme destacado por Mylne, Hara-Nishimura e Rosengren (2014). Historicamente, essas proteínas também receberam a designação de "arabinas", devido às suas semelhanças estruturais com a napina (*Brassica napus*), a primeira albumina 2S caracterizada na literatura científica (HEATH et al., 1986). As albuminas 2S, integrantes da superfamília das prolaminas, representam um grupo de proteínas de reserva predominantes em sementes e frutos com casca rígida. Sua ocorrência é amplamente documentada em espécies vegetais de diferentes grupos taxonômicos, incluindo tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (BREITENEDER; RADAUER, 2004; GUPTA; GAUR; SALUNKE, 2008).

As albuminas 2S vegetais constituem uma classe de proteínas de reserva de baixo peso molecular, geralmente formadas por heterodímeros estabilizados por pontes dissulfeto em uma proporção de 1:1, com uma subunidade pequena (~4 kDa) e uma maior (~10 kDa) (SOUZA, 2020). Embora tradicionalmente associadas à nutrição de sementes, estudos recentes têm revelado funções adicionais para essas proteínas. Em espécies como *Putranjiva roxburghii*, *Bougainvillea buttiana*, *Petunia inflata* e *Cucurbita sp.*, certas albuminas 2S demonstraram atividade nucleásica, ou seja, a capacidade de degradar ácidos nucleicos (CHOUDHARY; YADAV; LODHA, 2008; SINGH; AI; KAO, 1991; PRATAP et al., 2014; TOMAR et al., 2014). Essas descobertas ampliam o entendimento sobre a versatilidade funcional desse grupo de proteínas e levantam a hipótese de que outras albuminas 2S, como a Mo-CBP3 de *Moringa oleifera*, também possam desempenhar papéis semelhantes.

Tendo em vista que a Mo-CBP3 é uma albumina 2S com propriedades de inibição da germinação e crescimento de fungos fitopatogênicos, além de ser altamente termoestável e resistente a variações no pH (BATISTA et al., 2014), torna-se relevante investigar outras possíveis atividades dessa proteína, como sua ação nucleásica, a fim de ampliar o entendimento de seu potencial biotecnológico.

2.4 Atividade nucleolítica em proteínas vegetais

As nucleases são enzimas que promovem a clivagem de ligações fosfodiéster entre nucleotídeos, resultando na degradação de ácidos nucleicos. Tais proteínas podem ser classificadas como endonucleases, que atuam internamente na cadeia, ou exonucleases, que removem nucleotídeos das extremidades. Além disso, podem apresentar especificidade por DNA, RNA ou ambos, e diferir quanto à dependência de cofatores metálicos para a atividade catalítica (SHARMA et al., 2019). Em plantas, as nucleases desempenham funções vitais, incluindo reciclagem de ácidos nucleicos durante a senescência, diferenciação de tecidos, morte celular programada (PCD) e respostas de defesa contra patógenos. Diversos exemplos de nucleases vegetais ilustram sua diversidade funcional. A BFN1 (*Bifunctional Nuclease 1*) de *Arabidopsis thaliana* participa ativamente da degradação de DNA e RNA durante a senescência (FARAGE-BARHOM et al., 2008). Já a ZEN1 (*Zinnia Endonuclease 1*), presente em *Zinnia elegans*, está envolvida na clivagem de DNA nuclear durante a diferenciação de elementos traqueários, etapa essencial para a formação do xilema (ITO; FUKUDA, 2002). Outras nucleases, como a CaMNUC1, regulada por calmodulina em *Nicotiana tabacum*, estão associadas a respostas rápidas contra estresses bióticos e abióticos (MA et al., 2004). Em sementes, nucleases como a NUC1 de *Phaseolus vulgaris* auxiliam na mobilização de nucleotídeos durante a germinação (LAMBERT et al., 2016).

O mecanismo de ação das nucleases vegetais geralmente envolve a coordenação de íons metálicos (Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+}) no sítio ativo, promovendo o ataque nucleolítico à ligação fosfodiéster. Em alguns casos, essas enzimas podem ser multifuncionais, como observado em proteínas vegetais que combinam afinidade a polissacarídeos estruturais (ex.: quitina) e atividade nucleolítica, o que amplia seu potencial de defesa contra patógenos ao degradar tanto componentes da parede celular quanto o material genético invasor (SHARMA et al., 2019).

Tabela 2 – Exemplos de nucleases vegetais

| Nuclease vegetal | Tipo / Classe | Espécie de origem | Função fisiológica principal | Cofatores / Condições ótimas | Referência |
|-----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| BFN1 (<i>Bifunctional Nuclease 1</i>) | Endo/Exonuclease bifuncional | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Degrada DNA e RNA durante senescência e PCD | Zn ²⁺ ; pH ácido a neutro | FARAGE-BARHOM et al., 2008 |
| ZEN1 (<i>Zinnia Endonuclease 1</i>) | Nuclease S1-like | <i>Zinnia elegans</i> | Clivagem de DNA nuclear na diferenciação de elementos traqueários | Zn ²⁺ ; pH ~5,5 | ITO; FUKUDA, 2002 |
| CaMNUC1 | Nuclease dependente de calmodulina | <i>Nicotiana tabacum</i> | Resposta a estresse biótico/abiótico; defesa contra patógenos | Ca ²⁺ /Calmodulina | LIN et al., 2008 |
| NUC1 (Seed Nuclease) | Endonuclease ácida | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Mobilização de ácidos nucleicos durante germinação | Zn ²⁺ | MOURA et al., 2016 |
| S1-like nucleases | Endonuclease | <i>Arabidopsis thaliana</i> e outras | Diversas funções: defesa, reciclagem de nucleotídeos, senescência | Zn ²⁺ ou Mn ²⁺ | SHARMA et al., 2013 |

Fonte: criado pelo autor (2025).

O quadro 2 apresenta uma análise comparativa de nucleases vegetais, destacando sua diversidade funcional e mecanismos catalíticos. Enquanto a BFN1 (*Arabidopsis thaliana*) atua na degradação de DNA/RNA durante a senescência, dependendo de Zn²⁺ em pH ácido a neutro, a ZEN1 (*Zinnia elegans*) especializa-se na clivagem de DNA durante a formação do xilema, com atividade ótima em pH mais ácido (~5,5). Já a CaMNUC1 (*Nicotiana tabacum*), regulada por Ca²⁺/calmodulina, está associada à resposta a estresses bióticos e abióticos, revelando uma adaptação dinâmica a condições ambientais adversas. Em contraste, a NUC1 (*Phaseolus vulgaris*) atua principalmente na mobilização de nutrientes durante a germinação, dependente de Zn²⁺.

Essa comparação evidencia como as nucleases vegetais evoluíram para desempenhar funções distintas, desde a defesa contra patógenos até o desenvolvimento tecidual, oferecendo *insights* valiosos para aplicações biotecnológicas, como o desenvolvimento de enzimas para ferramentas de edição genética mais específicas ou agentes antimicrobianos. O estudo dessas diferenças estruturais e funcionais pode orientar a exploração de novas nucleases, como a proteína não caracterizada da *Moringa oleifera*, alvo desta pesquisa.

2.5 Mecanismos de resistência antimicrobiana

Conforme citado anteriormente, a resistência antimicrobiana (RAM) emergiu como um dos maiores desafios à saúde global no século XXI. Segundo o relatório de O'Neill (2016), estima-se que até 2050 a RAM poderá causar até 10 milhões de mortes anuais, superando o número de óbitos por câncer. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021) classificou este fenômeno como uma crise de saúde pública, particularmente preocupante devido ao surgimento de patógenos multirresistentes (MDR) que desafiam os tratamentos convencionais e aumentam significativamente os custos hospitalares.

No caso das bactérias, os mecanismos de resistência são particularmente diversificados. Peacock e Paterson (2015) demonstraram como mutações nas proteínas ligantes de penicilina (PBPs) conferem resistência à *Staphylococcus aureus* (MRSA). Paralelamente, Bush e Jacoby (2010) descreveram a ação das β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) em Enterobactérias, enquanto Blair et al. (2015) elucidaram os sistemas de efluxo ativo em *Salmonella enterica*. O caso do MRSA, analisado por Lakhundi e Zhang (2018), ilustra bem a gravidade do problema, mostrando resistência simultânea a β -lactâmicos, macrolídeos e fluoroquinolonas.

Os fungos patogênicos também desenvolveram estratégias sofisticadas de resistência. Pfaller e Diekema (2007) documentaram mutações no gene ERG11 em *Candida albicans*, enquanto Lockhart et al. (2017) descreveram a formação de biofilmes em *Candida auris*. Hagiwara et al. (2016) complementam este panorama ao analisarem os transportadores ABC em *Aspergillus fumigatus*. O CDC (2019) alerta para o caráter especialmente preocupante do *C. auris*, resistente a múltiplas classes de antifúngicos.

No âmbito viral, Clavel e Hance (2004) detalharam as mutações do HIV-1 contra antirretrovirais, enquanto Moscona (2005) analisou a resistência do vírus influenza ao oseltamivir. Tang e Shafer (2012) aprofundaram esta análise para o caso do HIV multirresistente (MDR-HIV).

Face a este cenário alarmante, Luepke et al. (2017) defendem a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas, incluindo o desenvolvimento de antimicrobianos inovadores, terapias combinadas e aplicação de inteligência artificial no desenho de fármacos. Ademais, a busca por novas biomoléculas com atividades promissoras no âmbito desse desenvolvimento é de suma importância. A compreensão detalhada dos mecanismos de resistência aqui

apresentados é fundamental para orientar pesquisas futuras e políticas públicas de controle da RAM, que se configura como uma das maiores ameaças à medicina moderna e à saúde global.

2.6 Aplicações biotecnológicas de nucleases vegetais

2.6.1. Agricultura

As nucleases vegetais emergiram como ferramentas promissoras para o desenvolvimento de biopesticidas sustentáveis. Sharma et al. (2019) demonstraram que nucleases do tipo S1, isoladas de plantas, podem atacar seletivamente o DNA/RNA de insetos-praga, como *Spodoptera frugiperda*, sem afetar organismos não-alvo. Essa especificidade é atribuída às diferenças na composição de ácidos nucleicos entre pragas e mamíferos.

2.6.2 Aplicações Terapêuticas e Medicinais

Nucleases derivadas ou inspiradas por plantas, especialmente as da família RNase T2, têm despertado interesse em terapias para câncer, inflamação, infecções virais e outras doenças. A RNase T2 possui funções conservadas em plantas, animais e microrganismos, e estudos recentes indicam que pode atuar não só degradando RNA, mas também modulando o microambiente tumoral, a angiogênese e a resposta imune (WU et al., 2020).

Além disso, utilizam-se conceitos de imunotoxinas — em que RNases são conjugadas a anticorpos ou peptídeos direcionadores — para entregar seletivamente atividade citotóxica às células tumorais. Em paralelo, embora ainda incipiente, há o estudo de plataformas de entrega (como vesículas extracelulares derivadas de plantas) que poderão viabilizar o uso de nucleases ou moduladores de RNA em terapias humanas (AREZOO MESRI et al., 2025).

2.6.3. Bioprocessos Industriais e Biorremediação

As nucleases vegetais vêm ganhando destaque crescente em aplicações industriais e processos de biorremediação, oferecendo soluções sustentáveis para diversos desafios ambientais e produtivos. No campo da biorremediação, estudos pioneiros como o de Farage-Barhom et al. (2008) demonstraram a eficácia da nuclease BFN1 na degradação de ácidos nucleicos presentes em efluentes industriais. Avanços mais recentes, como os desenvolvidos por Akbarian e colaboradores (2022), elevaram essa tecnologia a novos

patamares através da imobilização dessas enzimas em biorreatores de fluxo contínuo, permitindo o tratamento eficiente de resíduos da indústria farmacêutica com redução significativa de contaminantes genômicos.

Contudo, a plena implementação dessas tecnologias enfrenta desafios consideráveis. O escalonamento industrial ainda se depara com altos custos de produção (ZHAO et al., 2023), enquanto questões de estabilidade enzimática em condições operacionais exigem melhorias, particularmente no que diz respeito à termotolerância (GONZALEZ et al., 2023). Além disso, o marco regulatório para organismos geneticamente modificados que expressam nucleases requer avaliações ambientais mais abrangentes, como destacado pela EFSA (2023).

2.6.4. Perspectivas futuras

As perspectivas futuras são animadoras, com abordagens inovadoras como a predição estrutural assistida por inteligência artificial (AlphaFold3) e sistemas CRISPR de última geração (JINEK et al., 2023) acelerando o desenvolvimento de nucleases vegetais com propriedades otimizadas. Esses avanços sugerem um cenário promissor para a aplicação dessas biomoléculas em soluções biotecnológicas sustentáveis, capazes de aliar eficiência produtiva com menor impacto ambiental.

3 HIPÓTESE

Neste trabalho, formulou-se a seguinte hipótese:

“A atividade nucleásica detectada na fração proteica é mediada por uma proteína desconhecida co-purificada junto a Mo-CBP3, uma proteína ligante a quitina presente nas sementes de *Moringa oleifera*, sugerindo que Mo-CBP3 mantém sua funcionalidade primária (ligação à quitina/atividade antifúngica) e não possui dupla funcionalidade.”

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Purificar a proteína Mo-CBP3 das demais proteínas minoritárias co-isoladas com essa e identificar a origem da atividade nucleásica presente na fração proteica estudada, determinando se esta função é intrínseca à proteína ligante à quitina (Mo-CBP3) ou se é atribuída à proteína desconhecida co-purificada.

4.2 Objetivos Específicos

- 1- Purificar e isolar a proteína contaminante da fração Mo-CBP3, buscando obter cada componente de forma separada.
- 2 - Buscar outras estratégias de purificação em adição ao protocolo já estabelecido a fim de se ter proteínas purificadas.
- 3 - Caracterizar as proteínas isoladas.
- 4- Avaliar a atividade nucleásica das proteínas isoladas.

5 METODOLOGIA

5.1 Material biológico

5.1.1 Sementes de *Moringa oleifera*

Sementes maduras de *Moringa oleifera*, foram obtidas de árvores que crescem naturalmente no Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. Exemplares de exsicatas (Voucher specimens – EAC 54112) foram depositados no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará. Como *M. oleifera* é uma espécie introduzida e não nativa do Brasil, não foram necessárias permissões específicas das autoridades locais para a obtenção das amostras utilizadas neste trabalho. Os estudos de campo não envolveram espécies ameaçadas ou protegidas. Após a colheita, as sementes maduras foram armazenadas a temperatura ambiente (25 °C) em sacos fechados até o processamento que será abordado na seção Extração de proteínas das sementes.

5.1.2 Ácidos nucleicos

O material genético utilizado neste trabalho, compreendendo DNA e RNA, foi obtido a partir de cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. A extração de ácidos nucleicos foi realizada conforme as instruções do fabricante, utilizando-se o Kit Miniprep para DNA plasmidial da HiPurA para o DNA e o SV Total RNA Isolation da Promega para o RNA. Após a extração, o material foi quantificado por espectrometria no equipamento Nanodrop e armazenado a -20°C até seu uso.

5.2 Extração de proteínas das sementes

A extração das proteínas ligantes à quitina foi realizada segundo protocolo descrito por Neto (2015). Sementes de *M. oleifera* foram destegumentadas, trituradas e a farinha obtida foi delipidada com hexano (1:10, m/v). Para a extração, 30 g de farinha delipidada foram homogeneizados em 300 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, sob agitação por 4 h a 4 °C. A suspensão foi filtrada em tecido de nylon e centrifugada (15.000 × g, 30 min, 4 °C). O sobrenadante, denominado extrato total, foi filtrado, dialisado contra água destilada por 2 dias (4 trocas diárias) e centrifugado em dias alternados, permitindo a separação da fração insolúvel (globulina) e solúvel (albumina). A fração solúvel foi congelada e liofilizada.

Uma alíquota de 1 g de albumina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, e submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada no mesmo tampão. As proteínas não retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio, enquanto as adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,05 M, em fluxo de 60 mL/h, coletando-se frações de 4,5 mL. A eluição foi monitorada a 280 nm e o pico obtido, denominado PAC, foi dialisado contra água e liofilizado.

Uma amostra de 400 mg do PAC foi solubilizada em 20 mL tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e aplicada em coluna de troca iônica utilizando a matriz CM Sepharose™ Fast Flow previamente equilibrada no mesmo tampão. As proteínas não ligadas foram eluídas com tampão de equilíbrio, e as proteínas Mo-CBP2, Mo-CBP3 e Mo-CBP4 foram eluídas sequencialmente com o tampão contendo NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M, respectivamente. A cromatografia foi conduzida a 45 mL/h, coletando-se frações de 4,5 mL. Os picos obtidos, denominados P1-TI, P2-TI e P3-TI, foram dialisados contra água, liofilizados (exceto P1) e utilizados em etapas experimentais subsequentes.

5.3 Estratégias de purificação

5.3.1 Cromatografia de fase reversa

A partir do pico P2-TI, vindo da cromatografia de troca iônica, uma cromatografia por fase reversa foi realizada. Uma coluna RESOURCE RPC 3 mL da GE Healthcare acoplada a um equipamento acoplada à um sistema Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (ÄKTApurifier - FPLC). Os parâmetros da cromatografia foram fluxo de 1 mL/min, frações de 1 mL por tubo, eluente A 0,1% TFA + 5% Acetonitrila e eluente B 0,1% TFA + 80% Acetonitrila. Assim, 1 mL do P2-TI foi injetado no equipamento, a coluna foi equilibrada previamente com 12 mL do eluente A, e a cromatografia seguiu um gradiente linear de 0-100% do eluente B por 30 minutos.

5.3.2 Filtração por ultracentrifugação

A partir do PAC, ressuspendido em água na proporção de 400 mg em 20 mL, foi utilizado um Amicon de 30 kDa, em repetidas centrifugações de 2000 G, 4°C por 30 minutos, até que o volume do concentrado fosse de 0,5 mL. A fração superior concentrada e a fração inferior foram submetidas à SDS-PAGE para avaliar a pureza das bandas.

5.3.3 Cromatografia por exclusão molecular

Adicionalmente também a partir do PAC, ressuspendido em tampão PBS 0,05 M + NaCl 0,15 M na concentração de 10 mg/mL, uma cromatografia de exclusão molecular foi realizada utilizando uma coluna Superdex 75 10/300 GL da GE Healthcare, acoplada à um sistema Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (ÄKTApurifier - FPLC) utilizando o mesmo tampão o qual a amostra foi ressuspendida. Foi criado um método de Exclusão Molecular no software UNICORN 5.11, com fluxo de 0,5 mL/min, quantidade de amostra injetada 1 mL e as frações coletadas foram de 1 mL, o volume total da cromatografia foi de 25 mL totalizando 50 minutos. Os picos coletados foram chamados de P1-SE, P2-SE, P3-SE e P4-SE, e foram submetidos à SDS-PAGE para averiguar as massas moleculares aparentes das bandas, seguindo o protocolo, com adaptações, de Laemmli (1970).

A partir disso, foi realizada a quantificação utilizando o kit de fluorimetria “Qubit Protein Assay Kit” da Introvigen e o equipamento de leitura Qubit™ da Thermo Fisher Scientific seguindo as orientações do fabricante indicadas na embalagem do produto.

5.4 Atividade nucleolítica

A atividade nucleolítica, tanto para DNA quanto para RNA, foi determinada realizando a incubação da proteína contaminante em concentrações graduais (10 ng - 3 ug) contra 1 ug de ácidos nucleicos. Essa mistura então foi submetida a temperatura de 37 °C por 30 minutos e a reação foi parada com uma solução 5 mM de EDTA. As amostras foram analisadas em gel de agarose (1,5%), as quais foram coradas com brometo de etídio e visualizadas em um transiluminador UV. Protocolo baseado no ensaio nucleolítico de Stefan (2011) com adaptações.

Utilizando a concentração mínima de atividade nucleolítica da proteína contaminante (1,2 ug), foi incubado 1 ug de DNA e 1 ug de RNA, em tubos separados. As amostras foram mantidas a 37 °C para que a reação pudesse ocorrer naturalmente. Utilizando um equipamento NanoDrop, uma primeira leitura foi realizada na absorvância de 260 nm, e a partir disso, a cada minuto uma nova leitura foi realizada até um total de 30 minutos, e então a reação foi finalizada com uma solução de 5 mM de EDTA. Para controles, dnase I (2 U/uL) da Ambion foi utilizada como controle positivo da atividade contra DNA, e rnase III (1 U/uL) da Ambion foi utilizada como controle positivo na atividade contra RNA. Para controles negativos, ambos os ácidos nucleicos foram incubados com água ultrapura. As leituras foram

documentadas para análise da degradação do material genético ao longo do tempo, minuto a minuto.

5.5 Espectrometria de massas

5.5.1 Digestão por tripsina

Um volume correspondente a 50 μL de amostra (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi depositado em um tubo para microcentrífuga lacrado. O tubo foi colocado em um bloco térmico a 80 °C e aquecido por 15 minutos. Após o aquecimento, o tubo foi retirado do bloco térmico e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). Em seguida, foram adicionados 2,5 μL de ditioneitol (DTT 100 mM, 15,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para abrir a estrutura das proteínas, tornando-as mais acessíveis para a alquilação e digestão. A mistura foi agitada vigorosamente em equipamento vórtex e aquecida a 60 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, o tubo foi retirado e deixado esfriar até a temperatura ambiente (25 °C), sendo centrifugado novamente.

Na sequência, foi adicionada então uma solução de 2,5 μL de iodoacetamida (IAA 300 mM, 55,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a mistura foi vortexada e deixada em repouso em ambiente escuro à temperatura ambiente por 30 minutos para permitir a reação. Após esse tempo, foram adicionados 10 μL de uma solução de tripsina da Promega em 50 mM de bicarbonato de amônio (preparada adicionando 400 μL de 50 mM bicarbonato de amônio a um frasco de 20 μg de tripsina Promega, PART No. V511A), e a mistura foi novamente vigorosamente agitada. A digestão ocorreu a 37 °C em bloco térmico durante a noite (19-21 horas).

Os tubos foram incubados a 37 °C por 90 minutos e depois centrifugados a 10.000 xg, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo, mediu-se o volume total e o solvente foi evaporado completamente. Foi retirada uma alíquota de 5 μL para determinar a concentração de peptídeos utilizando o Micro BCA™ Protein Assay Kit.

Por fim, as amostras foram ressuspensas em uma solução de 0,1% de ácido fórmico em água grau LC-MS, ajustando a concentração de peptídeos para 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e transferidas para um frasco de recuperação total da Waters (Waters PART No. 186000385C, 100/pKg, com tampas de PTFE/silicone pré-cortadas).

Após isso, as amostras foram aplicadas no equipamento de espectrometria de massas SYNAPT XS da empresa Waters segundo as recomendações do fabricante.

5.5.2 Processamento dos dados

A análise de aquisição independente de dados (DIA) por LC-MS/MS teve início com a quantificação das amostras utilizando Kits de Ensaio de Proteínas Pierce™ BCA, definindo a carga total para cada amostra em 50 µg de proteína, que foi digerida por tripsina na proporção de 1:50 (Promega Corporation), descrita na seção acima. Para o perfil quantitativo de expressão proteica livre de rótulos (label-free), utilizou-se o sistema ACQUITY UPLC M-Class acoplado ao espectrômetro de massa SYNAPT XS (Waters).

A separação cromatográfica de 1 µL (1 µg) de peptídeos tripticos ocorreu em uma coluna de fase reversa HSS T3 C18 (106 Å de poro, 1,8 µm de partícula, 75 mm×200 mm, Waters Corp) a um fluxo de 300 nl/min e 37 °C. O processo durou 112 min com um gradiente água/acetonitrila de 0–85% (solvente A: 0,1% ácido fórmico em água; solvente B: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila). As amostras foram analisadas em triplicatas, com o equipamento operando em modo "V" com resolução ≥ 18.000 m/z e polaridade positiva.

As configurações do instrumento foram otimizadas no *software* MassLynx (versão 4.1, SCN870). A calibração foi realizada por meio de infusão de canal de nanoLockSpray probe (500 nl/min) de Glu–Fib (Glu1), derivado do fibrinopeptídeo B humano ($(M + 2H)^{2+} = 785.2486$). Os fragmentos MS/MS Glu–Fib foram empregados para a calibração final, cobrindo o intervalo de massa de 50 a 1.500.

Para a identificação e quantificação proteica, as massas de peptídeos geradas foram pesquisadas no banco de dados de sequência de proteínas espécie-específica UniProt usando o Progenesis QI V2.0 (QIfp) (Nonlinear Dynamics/Waters). O *software* realizou a extração de características, alinhamento cromatográfico/espectral, filtragem de dados e análise estatística. Foram filtradas características dentro das faixas de tempo de retenção de 0–5 min e 90–112 min, bem como aquelas com carga $\geq +8$. Um fator de normalização foi calculado para cada corrida para corrigir as diferenças de carga de amostra.

O algoritmo, com o delineamento experimental agrupando injeções por corrida, calculou e tabulou as abundâncias brutas e normalizadas, a máxima variação (max fold change) e os valores de ANOVA. Os requisitos mínimos para o pareamento de íons foram ≥ 2 fragmentos por peptídeo, ≥ 5 fragmentos por proteína e ≥ 1 peptídeo por proteína. Os parâmetros de busca no banco de dados incluíram: Carbamidometil (Cys, fixa) e Oxidação (Met, variável) como modificações; tolerância de massa de peptídeo de ± 20 ppm; e tolerância

de massa de fragmento de $\pm 0,4$ Da. A busca foi realizada com Decoy search (busca isca) para calcular a Taxa de Falsa Descoberta (FDR), estabelecendo o limiar de significância do escore iônico com base em uma FDR de 1% ou menos.

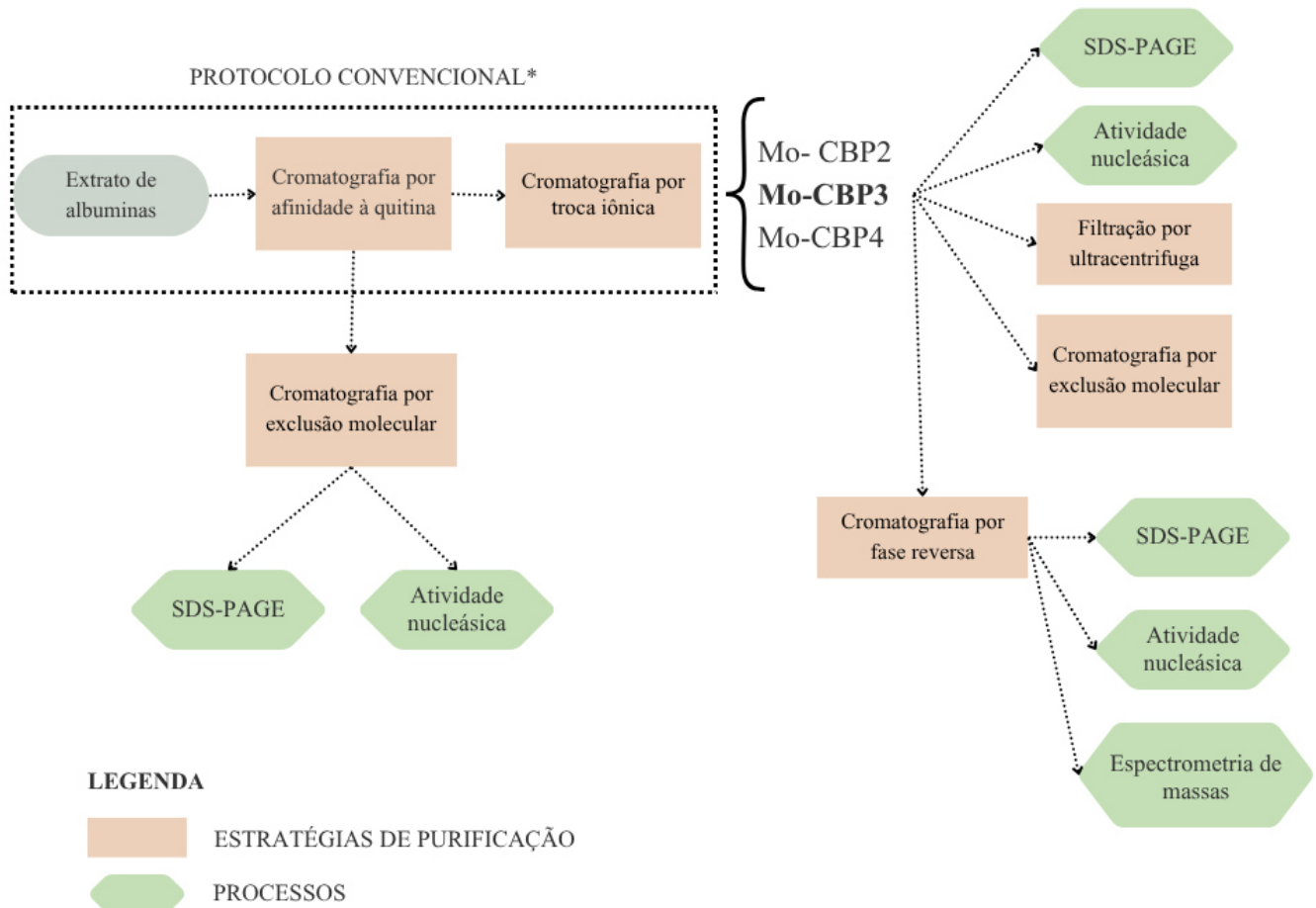
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A purificação das proteínas ligadas à quitina de sementes de *Moringa oleifera* (Mo-CBPs) é uma etapa crucial para a elucidação de suas propriedades biológicas e potenciais aplicações. Conforme o protocolo estabelecido, o extrato bruto foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de quinta, seguida de cromatografia de troca iônica, resultando na separação de três frações protéicas distintas já descritas na literatura: Mo-CBP2, Mo-CBP3 e Mo-CBP4.

No entanto, a análise da fração Mo-CBP3 revelou um achado intrigante: a co-purificação de uma proteína, com bandas diferentes da Mo-CBP3 no SDS-PAGE, que até então não havia sido caracterizada. Ademais, estudos preliminares desta mistura (Mo-CBP3) haviam demonstrado uma clara atividade nucleásica, sugerindo que o contaminante, ou a Mo-CBP3, possui algum mecanismo de degradação de ácidos nucleicos. Esta questão em aberto foi abordada neste estudo.

Diante desse cenário, esta seção de Resultados e Discussão abordará a investigação de duas frentes: (1) o desenvolvimento e a implementação de uma estratégia cromatográfica visando a separação e por conseguinte, a purificação da Mo-CBP3 e da proteína desconhecida da proteína; e (2) caracterização e análise da atividade nucleásica observada, correlacionando-a com a presença da proteína desconhecida ou atribuindo a mesma a já conhecida proteína denominada Mo-CBP3. O sucesso na separação desses componentes é mandatório para a atribuição inequívoca das atividades biológicas à Mo-CBP3 isolada, bem como para a caracterização individual da nova proteína nucleásica da semente de *M. oleifera*.

Figura 5 - Esquema de estratégias de purificação



* Protocolo descrito por Neto (2015) Fonte: elaborado pelo autor (2025).

6.1 Separação das proteínas ligantes à quitina a partir do extrato protéico de farinha de sementes

Utilizando 1 grama do extrato liofilizado das albuminas das sementes de *Moringa Oleifera*, dissolvido em Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,15 M, pH 8,0, foi realizada uma cromatografia de afinidade à quitina, o pico eluído foi chamado de PAC (Pico afinidade à quitina), apresentando leituras de 2800 mAU no comprimento de onda de 280 nm, sendo observado no gráfico 01 abaixo. Esse resultado está de acordo com o protocolo descrito por Neto (2015).

Gráfico 01 - Cromatografia de afinidade à quitina.

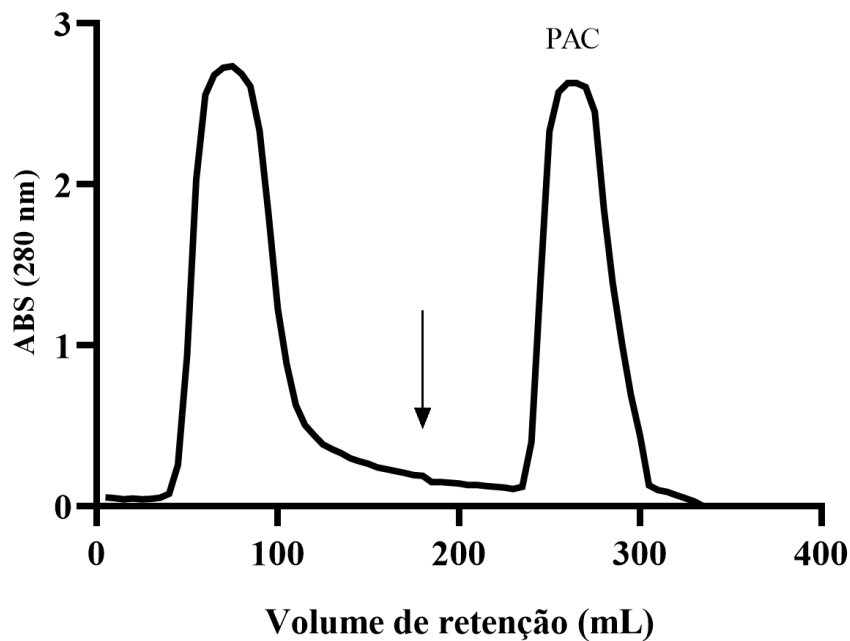


Gráfico da leitura da absorvância a 280 nm (eixo vertical) pelo volume de retenção (eixo horizontal), com velocidade de 1 mL/min, durante o processo de cromatografia de afinidade à quitina. Fonte: elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8 (2025).

6.2 Análise eletroforética das proteínas fracionadas por cromatografia de troca iônica

A partir da cromatografia de afinidade à quitina, um pico de afinidade à quitina (PAC) foi gerado, e a partir dele uma cromatografia de troca iônica foi feita gerando 3 picos, chamados de CM-PII, CM-PIII e CM-PIV, equivalentes à Mo-CBP2, Mo-CBP3 e Mo-CBP4 (GIFONI, 2009). A partir do pico equivalente a Mo-CBP3 (CM-PIII), um SDS-PAGE dessa amostra (Fig. 01) revelou 3 bandas, chamadas de B1, B2 e B3. A banda B3, chama atenção por seu característico arrasto e difusão para outras raias do gel, e posicionamento abaixo da banda de 14,4 kDa do marcador. Esse perfil eletroforético é muito parecido com o perfil da proteína Mo-CBP3 (Fig. 02) descrita na literatura no trabalho de Batista (2013), apresentando o mesmo arrasto e posicionamento abaixo de 14 kDa no respectivo marcadores. Além de B3, apareceram bandas desconhecidas e não descritas na literatura, com pesos moleculares aparentes de 65 kDa em B1 e ~26 kDa em B2.

Gráfico 02 - Cromatografia por troca iônica CM-Sepharose Fast Flow.

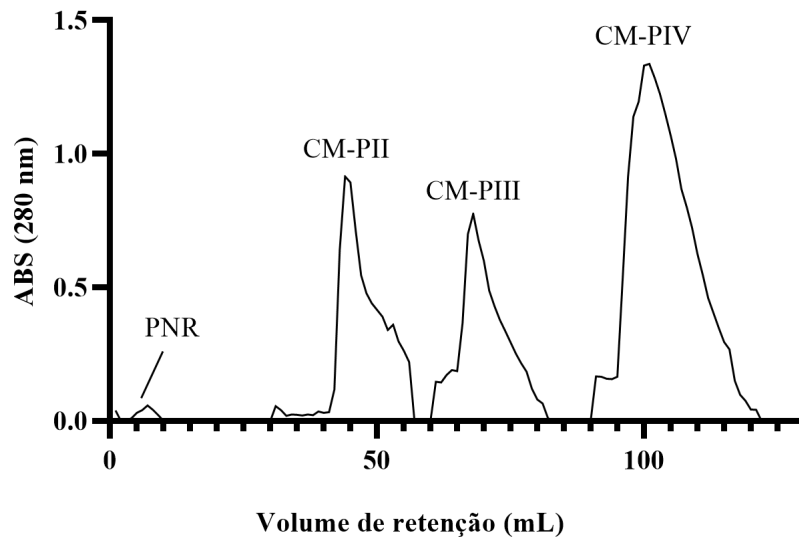
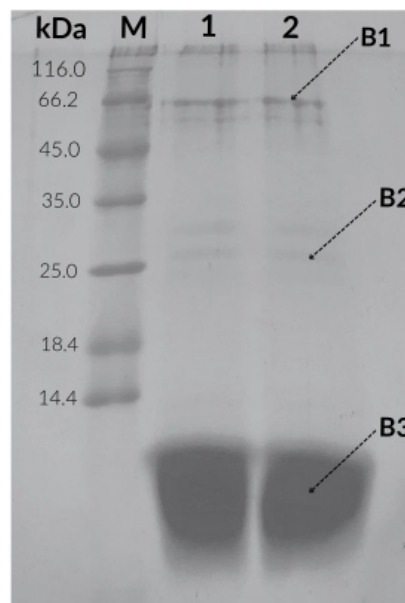


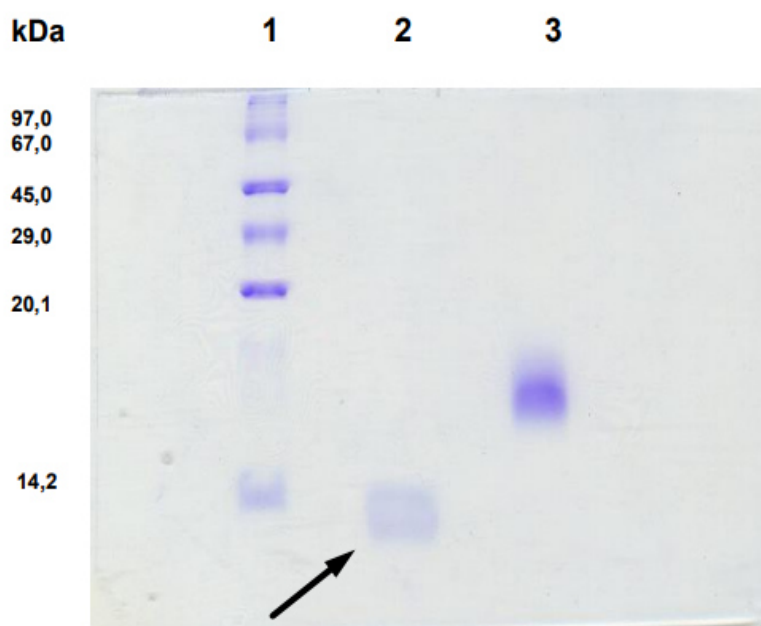
Gráfico da leitura da absorvância a 280 nm (eixo vertical) ao do volume de retenção (eixo horizontal) com frações de 4,5 mL, com velocidade de 0,75 mL/min, durante o processo de cromatografia por troca iônica. Fonte: elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8 (2025).

Figura 06 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do CM-PIII da troca iônica



Gel de poliacrilamida 15% separando proteínas e corado com Coomassie coloidal (G-250 0,1%). A raia M representa o marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker da Thermo Fischer, nas raias 1 e 2 temos a mesma amostra mostrando 3 bandas, B1 próximo a 66 kDa, B2 próximo de 26 kDa e B3 próximo de 9 kDa, na presença de beta-mercaptoetanol. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Figura 07 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da Mo-CBP3

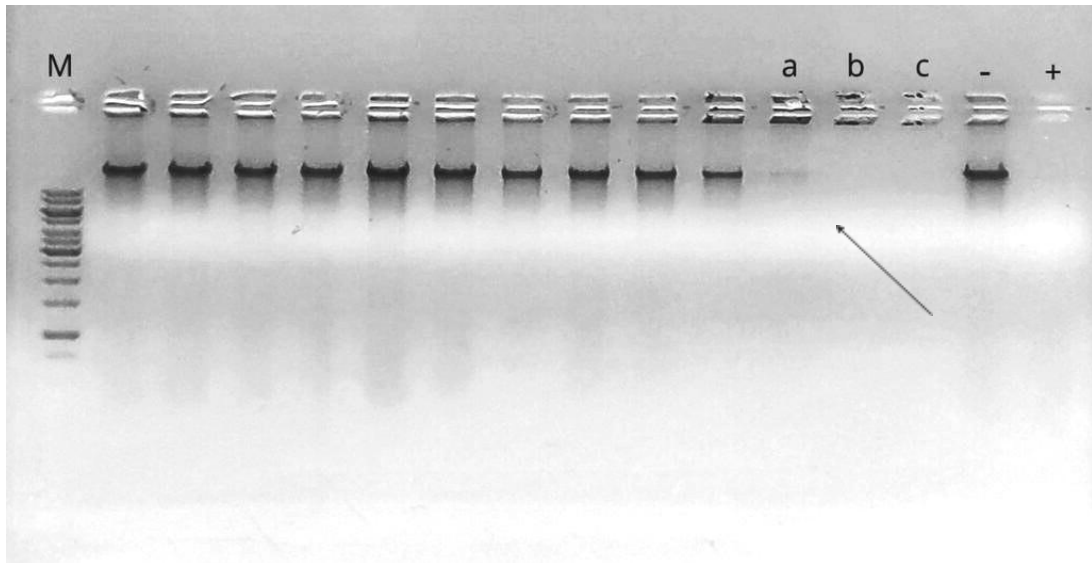


Marcador molecular na raia 1; Mo-CBP3 na presença de beta-mercaptoetanol na raia 2; Mo-CBP3 na ausência de beta-mercaptoetanol. Fonte: extraído de Batista (2013).

6.3 Ação nucleásica do pico CM-PIII

A atividade nucleásica do pico CM-PIII, vindo da cromatografia por troca iônica, foi avaliada com concentrações graduais da proteína, iniciando em nanogramas (Fig. 03), que apresenta um gel de agarose corado com brometo de etídio. Na raia (a), a quantidade de proteína é de 1,25 ug, na qual a degradação de DNA começa a ficar mais evidente, na raia (b), com 1,75 ug, a degradação se equipara ao controle positivo (raia +), onde nenhuma fluorescência é notada. O mesmo ocorre na raia (c), com 2,25 ug. A atividade nucleásica é intrigante pois a proteína presente no pico 3, Mo-CBP3, cuja sequência de aminoácidos e estrutura cristalográfica já foram determinadas por Ullah (2015) e não apresenta nenhum domínio catalítico descrito que sugira essa atividade catalítica. Levanta-se o questionamento das outras bandas visualizadas, B1 e B2 na figura 01, se essas outras proteínas estão realizando essa atividade, mesmo que em concentrações baixas, pois nucleases como a dnase I recombinante humana conseguem realizar suas atividades enzimáticas em quantidades baixíssimas (9,5 ng) contra ácidos nucléicos na quantidade de 0,5 ug (PRINCE et al., 1998).

Figura 08 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando a ação do pico CM-PIII (troca iônica) sobre DNA

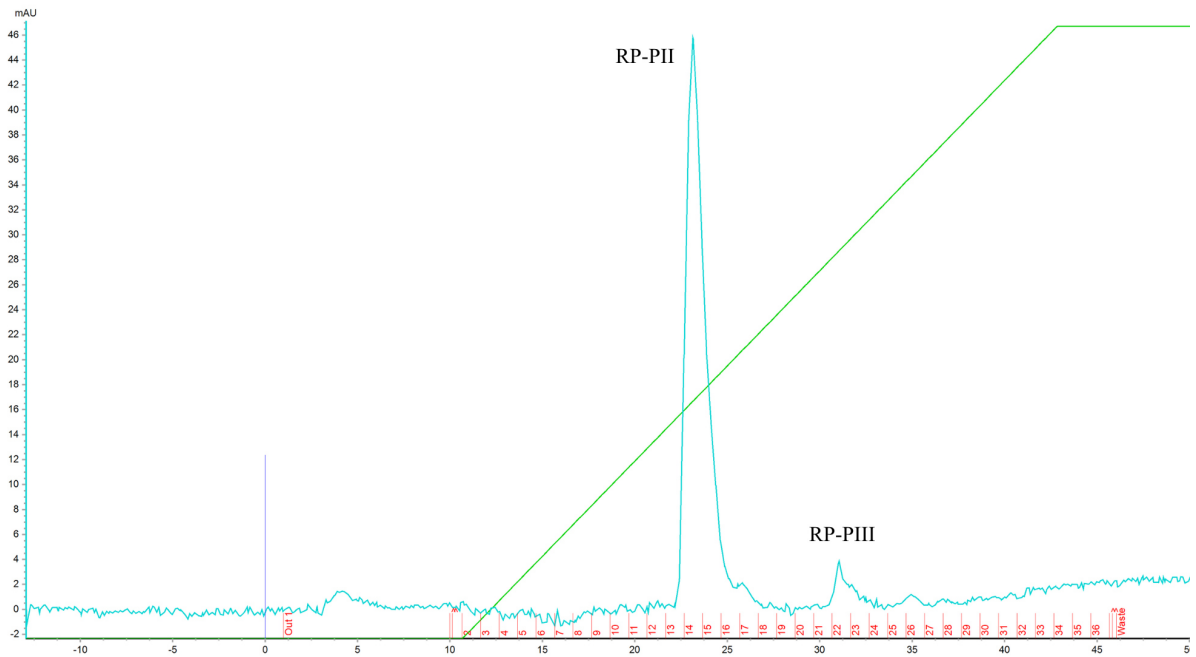


Quantidades graduais de CM-PIII contra 1 ug de DNA genômico em cada poço. Nas raias a, b e c, temos uma atividade mais pronunciada, com 1,25, 1,75 e 2,25 ug de CM-PIII. As raias (-) e (+) representam os controles negativos, com DNA incubado com água e positivos, DNA incubado com dnase I comercial, onde atividade de CM-PIII pode ser equiparada a dnase comercial. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

6.4 Picos da cromatografia de fase reversa

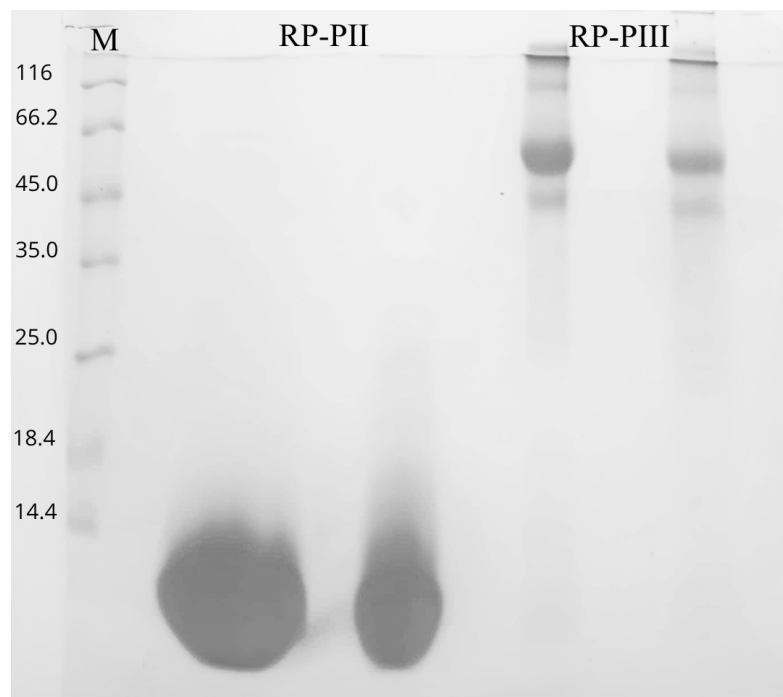
Com os questionamentos acerca da pureza da amostra utilizada para realizar os ensaios nucleásicos, diferentes abordagens de purificação foram testadas a fim de conseguir separar de forma eficiente a Mo-CBP3 (B3) de seus contaminantes (B1 e B2). *A priori* uma cromatografia de fase reversa utilizando uma coluna RESOURCE RPC foi realizada gerando 2 picos distintos, como observados na figura abaixo, chamados de RP-II e RP-PIII. Na figura 4, RP-II apresentou as mesmas características de arrasto e difusão no SDS-PAGE, indicando a presença purificada de Mo-CBP3. Já em RP-PIII, uma banda proeminente se mostra próximo a linha da banda 66,2 kDA do marcador, e outras bandas antes não visualizadas começam a aparecer, muito provavelmente pela concentração mais elevada.

Gráfico 03 - Cromatografia por fase reversa do pico CM-PIII (troca iônica)



Fonte: elaborado pelo autor utilizando o programa UNICORN 7. (2025).

Figura 09 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% mostrando os picos da cromatografia por fase reversa

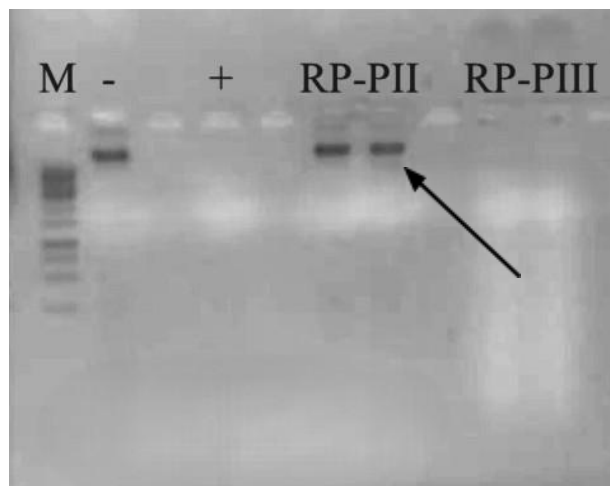


As raias RP-II e RP-PIII representam os picos da fase reversa, mostrando bandas separadas nas faixas de 9 kDa e 60 kDa.

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Os picos RP-P1I e RP-P1III foram submetidos ao mesmo ensaio de atividade nucleásica (Fig. 05) nas mesmas condições que as atividades iniciais. RP-P1I, ou Mo-CBP3, apresentou atividade, enquanto RP-P1III, os contaminantes, não tiveram nenhuma atividade nucleásica sobre DNA. Contudo, uma cromatografia de fase reversa é um processo muito agressivo que pode desnaturar proteínas de forma irreversível, a Mo-CBP3 é uma proteína muito estável, resistente a temperatura e mudanças no pH, o que corrobora com sua atividade nucleásica ter sido mantida mesmo após a fase reversa (ULLAH, 2015; AKBARIAN; CHEN, 2022). Já os contaminantes podem ter sido desnaturados de forma permanente, ainda deixando dúvidas quanto à atividade nucleásica que essas proteínas também podem apresentar, apesar da atividade mostrada pela Mo-CBP3 ter sido bastante significativa.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando a ação dos picos RP-P1I e RP-P1I da fase reversa contra DNA.



Raia M representa o marcador GeneRuler; (-) controle negativo com DNA incubado somente com água; (+) controle positivo com dnase I; P2-FR representando o pico 2 da fase reversa; P1-FR o pico 1 da fase reversa. A ação é clara em P1-FR e se equipara a dnase comercial. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

6.5 Espectrometria de massas dos picos da cromatografia por fase reversa

6.5.1 RP-PI

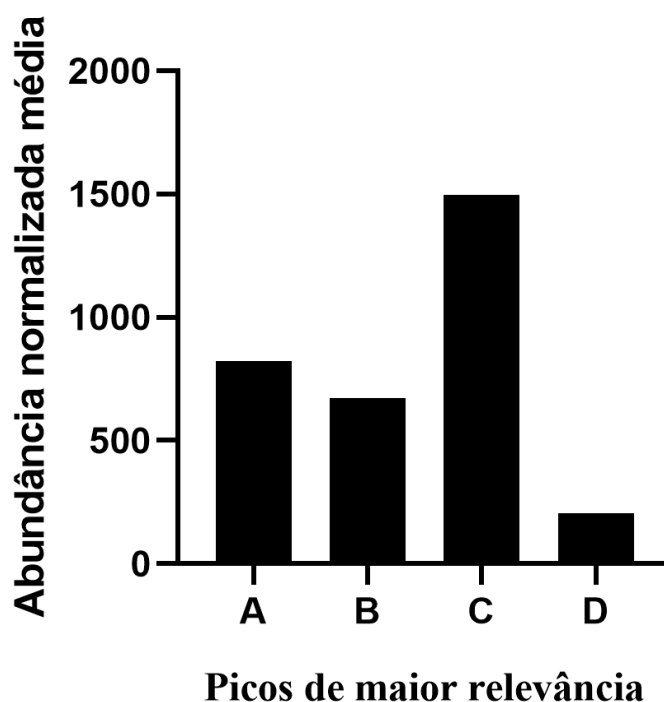
A análise proteômica, realizada via aquisição DDA (Data-Dependent Acquisition) e digestão não específica, permitiu a identificação e quantificação de 3 peptídeos na amostra. A quantificação foi baseada na média das abundâncias normalizadas dos peptídeos identificados para cada uma dessas proteínas, em triplicata biológica, refletindo a composição proteica majoritária da amostra.

A amostra revelou uma distribuição de abundância dominada por componentes de interesse e contaminantes. A ATP synthase epsilon chain, chloroplastic foi a proteína com a maior Abundância Normalizada Média de 1498,24 , sendo identificada por 1 peptídeo. Esta proteína, sendo um componente cloroplástico, sugere a persistência de material celular fotossinteticamente ativo na amostra. Em seguida, foi identificado um fragmento de Proteína ligante à quitina 2, uma das proteínas extraídas de sementes de *Moringa oleifera*, importante na defesa da planta com uma Abundância Normalizada Média de 820,73 (NETO, 2015).

Por fim, foram detectadas entradas para a Proteína ligante à quitina 3, de *Moringa oleifera*, uma outra proteína ligante de quitina. A entrada A0A3G6IGT2 teve uma Abundância Normalizada Média de 671,08 , identificada por 1 peptídeo (íon 3354) com um Score de 6,84.

Em resumo, a espectrometria de massas sugere a presença das proteínas ligantes de quitina Mo-CBP2 e Mo-CBP3 na amostra, o que se justifica, pois a Mo-CBP2 é estruturalmente muito parecida com a Mo-CBP3, e quando submetidas a uma digestão não específica podem apresentar peptídeos em comum (NETO, 2015). Assim, a presença de peptídeos de Mo-CBP3 que a purificação foi bem sucedida.

Gráfico 04 - Gráfico de abundâncias normalizadas a partir da espectrometria de massas do RP-PII da cromatografia de fase reversa



A: Proteína ligante de quitina 2 (Fragmento); B: Proteína ligante a quitina 3; C: ATP sintase cadeia epsilon; D: Proteína ligante à quitina 3.

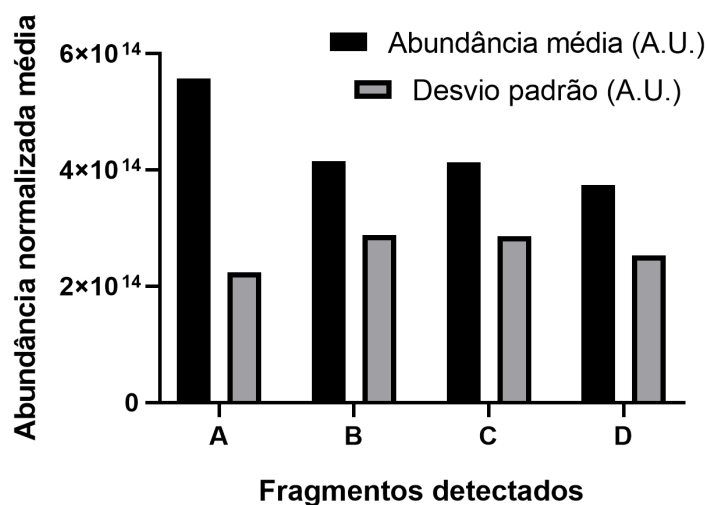
Fonte: elaborado pelo autor no programa GraphPad Prism 8 (2025).

6.5.2 RP-PII

A análise proteômica, realizada via aquisição DDA (Data-Dependent Acquisition) e digestão não específica, permitiu a identificação e quantificação de 4 peptídeos na amostra. A quantificação foi baseada na média das abundâncias normalizadas dos peptídeos identificados para cada uma dessas proteínas, em triplicata biológica, refletindo a composição proteica majoritária da amostra.

A amostra revelou uma distribuição de abundância claramente dominada por quatro componentes, sendo a Proteína de Ligação a Quitina 2, ou Mo-CBP2 (Chitin-binding protein 2, Accession: C0HKC5) a mais proeminente, apresentando a maior abundância média normalizada, como é possível observar no gráfico 02. Assim, tal proteína é associada a mecanismos de defesa celular, sugerindo que os peptídeos da porção proteica analisada são ricos em componentes relacionados à proteção e resposta a estresses ambientais (NETO, 2015).

Gráfico 05 - Gráfico de abundâncias normalizadas e desvio padrão de espectrometria de massas do RP-PIII da cromatografia de fase reversa



A: Proteína ligante de quitina 2 (Fragmento); B: Cadeia grande da ribulose bisfosfato carboxilase (Fragmento) ; C: Inositol-1-monofosfatase; D: Cadeia alfa de tubulina (Fragmento) Fonte: elaborado pelo autor no programa GraphPad Prism 8 com os dados gerados pela espectrometria de massas (2025).

Em seguida, foi identificada em alta abundância a Cadeia Grande da Rubisco (Ribulose biphosphate carboxylase large chain, P48708). Sendo a enzima essencial para a fixação de carbono na fotossíntese, sua alta concentração confirma a origem vegetal da amostra e sua riqueza em proteínas de metabolismo primário, servindo como um controle positivo para a presença de material fotossinteticamente ativo (RODMAN et al., 1993).

As outras duas proteínas identificadas — a Inositol-1-monofosfatase (A0A097ZMQ1) e a Tubulina alfa (I3VF83) — também são vitais para o funcionamento celular. A Inositol-1-monofosfatase participa de vias de sinalização importantes e metabolismo de fosfolípidios, enquanto a Tubulina alfa é um componente estrutural fundamental do citoesqueleto. A presença dessas proteínas de metabolismo e estrutura celular confirma a complexidade e a natureza funcional da amostra proteica analisada (HERWIG PONSTINGL et al., 1981; NOURBAKSH; COLLAKOVA; GILLASPY, 2015).

A análise proteômica, embora tecnicamente bem-sucedida ao identificar e quantificar quatro peptídeos majoritários — fragmentos de Mo-CBP2, Cadeia Grande da Rubisco, Inositol-1-monofosfatase e Tubulina alfa — não resultou na identificação da proteína desconhecida, pois muitos peptídeos de menor abundância não foram identificados. Contudo, a ausência de peptídeos de Mo-CBP3 nos confirma que a separação da fração CM-PIII foi bem sucedida, separando Mo-CBP3 de seus contaminantes.

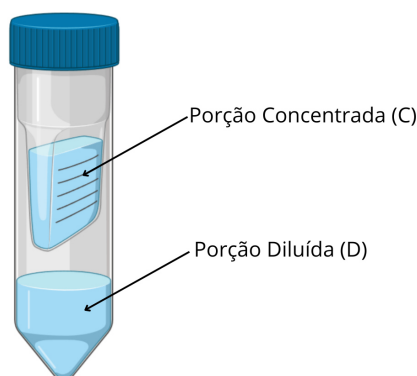
6.6 Pico CM-PIII em cromatografia por exclusão molecular

Outra abordagem utilizada para separar as proteínas observadas na fração CM-PIII, procedente da cromatografia de troca iônica, realizada na coluna CM-Sepharose Fast Flow, foi uma cromatografia de exclusão molecular, pois baseados nas massas aparentes do SDS-PAGE inicial (Fig. 01), as massas das bandas B1, B2 e B3 poderiam ser eluídas em frações separadas. A cromatografia foi realizada e gerou 4 picos, porém as leituras (Gráfico 03) foram muito baixas, e a recuperação dessas proteínas não foi possível ser feita de forma eficiente. Métodos de quantificação convencionais como Bradford e BCA foram utilizados mas sem sucesso. SDS-PAGE também foi feito mas nenhuma banda foi possível ser visualizada.

6.7 Purificação via filtração por ultracentrifuga

Uma das abordagens a fim de separar a Mo-CBP3 de seus contaminantes foi a utilização de um concentrador por ultracentrifuga de 30 kDa, pois a Mo-CPB3 apresenta pelo molecular de 14 kDa e seus contaminantes uma massa próxima de 60 kDa. Como descrito na metodologia, seguiu-se as recomendações do fabricante para a separação e recuperação das proteínas, no esquema abaixo (Fig. 06), as frações estão sendo mostradas como porção concentrada (C) e porção diluída (D).

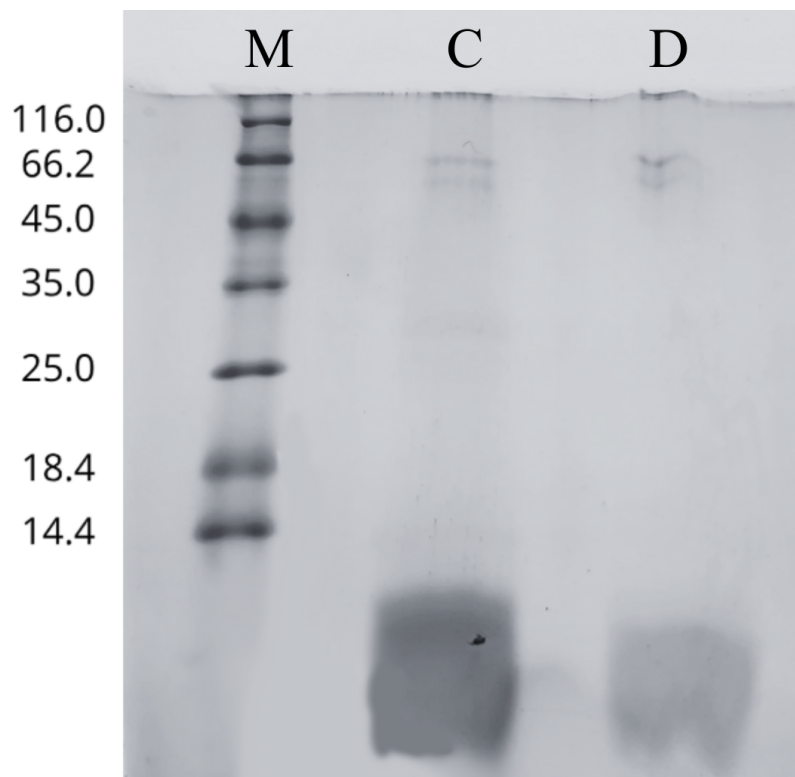
Figura 11 - Esquema de concentrador por ultracentrifugação mostrando as porções concentrada (C) e diluída (D).



Fonte: elaborado pelo autor no Biorender (2025).

Contudo, como é possível observar na figura abaixo (Fig. 7), a separação não foi eficaz, moléculas maiores que 30 kDa estão presentes na porção filtrada. Esse fenômeno é descrito e pode ocorrer por alguns fatores, o limite de exclusão molecular (MWCO) das membranas não representa um valor absoluto, mas uma média estatística — definida geralmente como a massa molecular em que 90% das moléculas são retidas. Assim, uma fração de moléculas maiores pode atravessar a membrana, especialmente sob altas forças centrífugas, que aumentam a pressão hidrostática e promovem deformação temporária dos poros. Além disso, fatores como tempo excessivo de centrifugação, degradação da membrana, adsorção ou repulsão eletrostática entre proteína e material do filtro, e o acúmulo de proteínas na interface da membrana podem alterar a seletividade do sistema e favorecer a passagem de macromoléculas (HANEY; HERTING; SMITH, 2013). Então mesmo utilizando concentradores novos, a separação foi inefetiva.

Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do CM-PIII após filtração concentrador de 30 kDa.



Raia M: marcador molecular de proteínas; Raia C: porção concentrada; Raia D: porção diluída

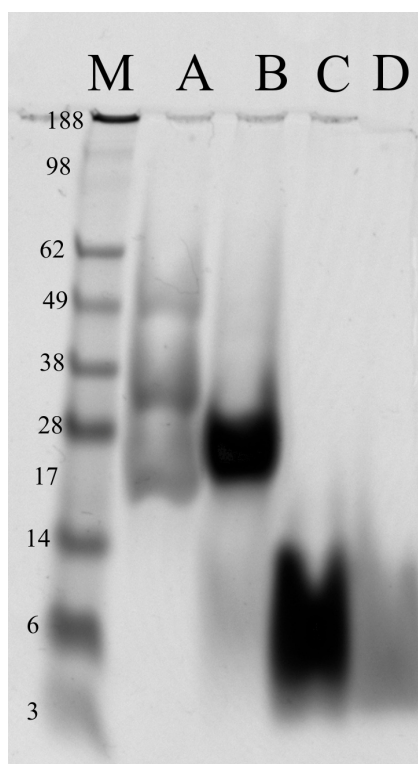
Fonte: elaborado pelo autor(2025).

6.8 Exclusão molecular do pico de afinidade à quitina

O perfil cromatográfico do pico de afinidade à quitina (PAC) submetido à uma cromatografia de exclusão molecular (SEC), revelou a presença de quatro picos distintos, conforme ilustrado no gráfico 4 e resumido nas tabelas 1 e 2 . A separação ocorreu de acordo com o princípio da SEC, na qual as espécies de maior massa molecular e volume hidrodinâmico eluem primeiro, enquanto as menores ficam retidas nos poros da fase estacionária por mais tempo. O cromatograma apresentou 53 picos apontados pelo software UNICORN 5.11, porém, 4 picos apresentaram 99,76% da área total dos picos, como mostrado nas tabelas 1 e 2 abaixo.

O Pico 1 (P1-SE) representou a primeira fração eluída e, sua eluição precoce confirma que ele compreende as espécies moleculares de maior massa que foram fracionadas com sucesso pela matriz. Contudo, analisando esta fração por SDS-PAGE (em condições desnaturantes) revelou um perfil de quatro bandas peptídicas distintas, indicando que P1-SE não é homogêneo, mas sim um complexo proteico. Na condição nativa da SEC, essas quatro subunidades estavam associadas, resultando em um único volume hidrodinâmico grande o suficiente para eluir no início da separação. Esse padrão de 4 bandas é muito parecido com o padrão de bandas apresentado nas figuras 8 e 9, o que confirma a separação dos contaminantes co-purificados por cromatografia de afinidade à quitina inicialmente. Sua área representou 10.94% da área total dos 4 picos relevantes no cromatograma mostrado na tabela 1, que se refletiu na recuperação de proteína, que após concentração por evaporação, foram atingidas concentrações de 1-1,5 mg/mL.

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando picos de cromatografia de exclusão molecular na presença de DTT.

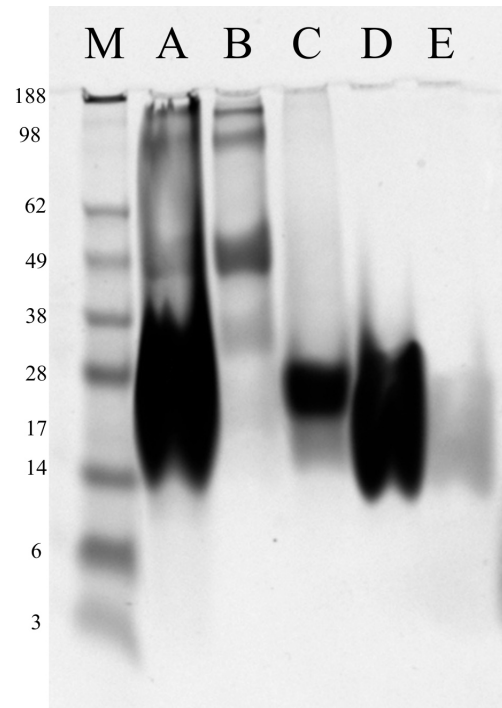


Raia M: marcador molecular para proteínas; A: P1-SE; B: P2-SE; C: P3-SE; D: P4-SE.

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

P3-SE constitui o resultado mais significativo desta etapa de purificação, representando 80,02% (tabela 1) da área total dos picos relevantes. Sua alta abundância na SEC está de acordo com estudos anteriores, onde a MoCBP3 é a proteína ligante à quitina mais abundante. Para confirmar a pureza desta fração, o material correspondente ao Pico 3 foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Conforme demonstrado nas figuras 8 e 9, a análise revelou a presença de uma única banda polipeptídica com um perfil eletroforético que mimetiza padrão da proteína Mo-CBP3 previamente caracterizada. Ainda, a ausência de outras bandas no gel desta fração é um forte indicativo do sucesso da purificação, atendendo ao critério de homogeneidade analítica frequentemente exigido para a caracterização de proteínas. Ademais, a recuperação foi alta, com concentrações variando de 2,5-3,5 mg/mL após concentração por evaporação.

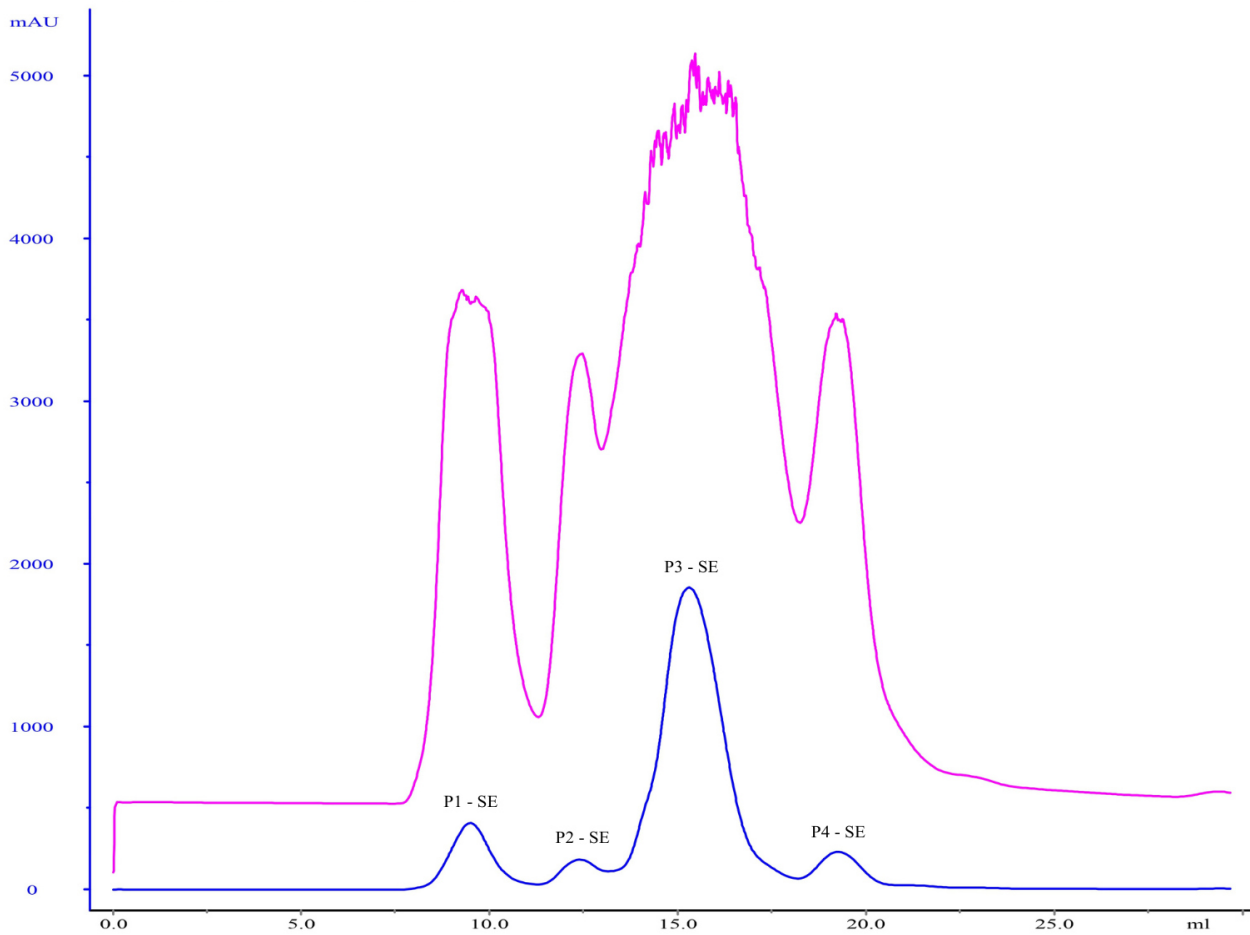
Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando PAC e os picos de cromatografia de exclusão molecular na ausência de DTT.



Raia M: marcador molecular para proteínas; A: pico de afinidade à quitina; B: P1-SE; C: P2-SE; D: P3-SE; E: P4-SE. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Os picos P2-SE e P4-SE, apresentaram as menores leituras de 138,25 e 191,55 mAU, respectivamente, o que se refletiu na recuperação das proteínas, que após concentradas por evaporação apresentaram concentrações de 215 ng/mL e 333 ng/mL respectivamente. Contudo, P2-SE apresentou uma banda forte na altura de 20 kDa e ainda uma mancha arrastada, tanto na presença (fig. 8), quanto na ausência de DTT (fig. 9). Essa banda corrobora com a literatura, que, em condições desnaturantes, Mo-CBP2 apresenta o mesmo perfil, de uma banda forte na altura de 20 kDa (NETO, 2015). Ademais, P4-SE, apresentou um perfil eletroforético com uma banda arrastada e fraca.

Gráfico 06 - Cromatografia de exclusão molecular do pico de afinidade à quitina.



Cromatograma revelando 4 picos em diferentes volumes de eluição, com P3-SE sendo o mais abundante.

Fonte: extraído do programa UNICORN 5.11. (2025).

Tabela 3 - Áreas e alturas SEC

| Picos | Retenção (mL) | Área (mAU*mL) | Altura (mAU) | % (Área do pico/ área total) |
|-------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| P1-SE | 9,48 | 461,625 | 384,502 | 10,94 |
| P2-SE | 12,4 | 145,0419 | 138,255 | 3,44 |
| P3-SE | 15,3 | 3377,07 | 1801,83 | 80,02 |
| P4-SE | 19,27 | 236,4882 | 191,578 | 5,6 |

Fonte: elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos do programa UNICORN 5.11. (2025).

Tabela 4 - Dados adicionais SEC

| Parâmetro | Valor |
|---------------------------------------------------|----------|
| Total de picos detectados | 53 |
| Área total (mAU*mL) | 4.229,99 |
| Área dos picos avaliados (mAU*mL) | 4.220,24 |
| Razão da área dos picos avaliados / área total | 0,997696 |
| Total de picos (mL) | 12,5 |
| Altura da coluna (cm) | 30 |
| Coluna V_0 (mL) | ~24 |

Fonte: elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos do programa UNICORN 5.11. (2025).

Gráfico 07 - Picos encontrados na cromatografia de exclusão molecular de PAC.

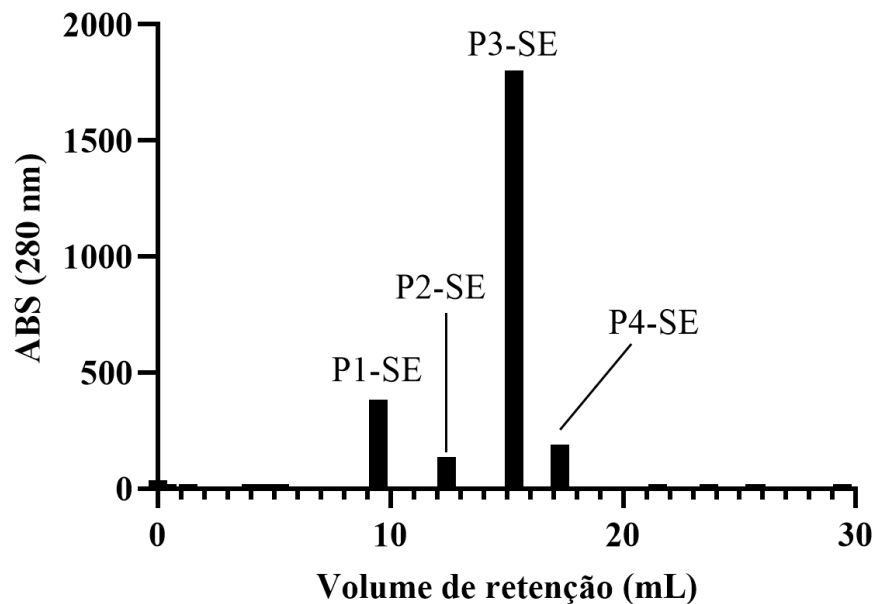
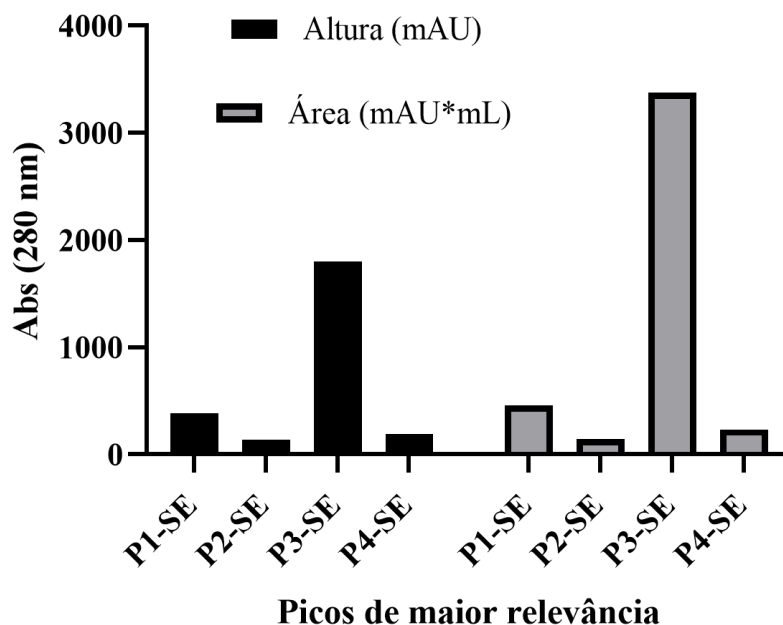


Gráfico da absorbância 280 nm (eixo horizontal) pelo volume de retenção (eixo vertical) mostrando os 53 picos encontrados, onde os picos P1-SE a P4-SE são mais proeminentes.

Fonte: elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8 (2025).

Gráfico 08 - Altura e área dos picos de eluição obtidos na SEC.



Fonte: elaborado pelo autor no software GraphPad Prism 8 (2025).

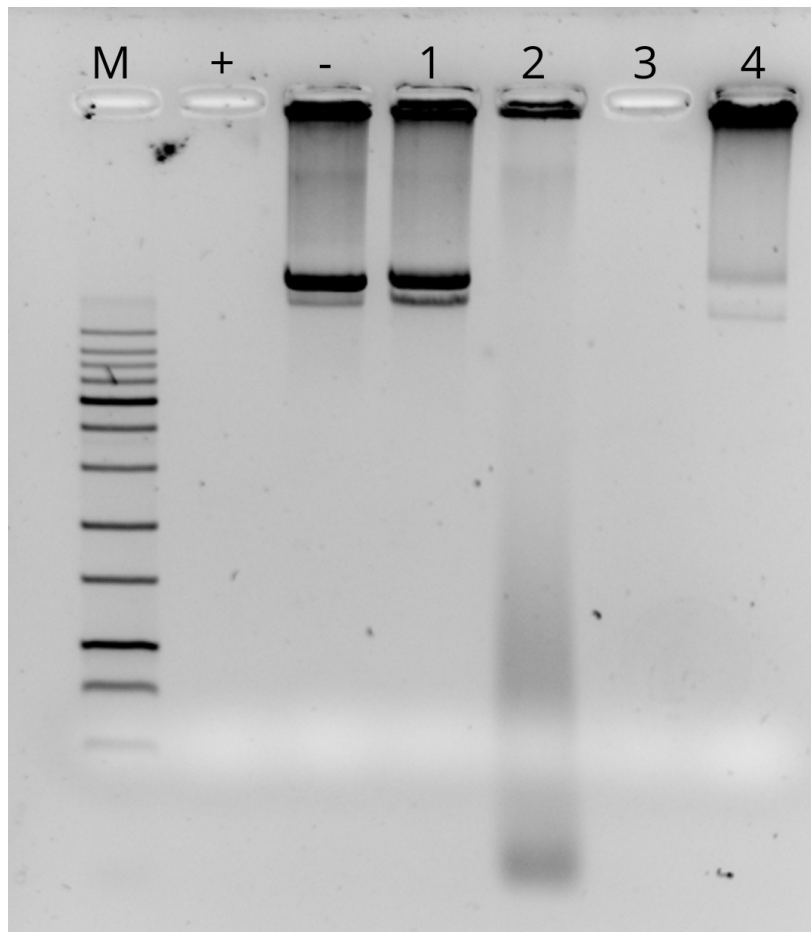
6.9 Atividade nucleásica contra DNA com os picos da exclusão molecular com PAC.

A atividade nucleásica contra DNA utilizando os picos da exclusão molecular revelou resultados interessantes, como é possível observar na figura. X. P1-SE não apresentou atividade, o que já era esperado pois em experimentos anteriores, o mesmo padrão de bandas não apresentou atividade. Já o P2-SE apresentou uma degradação parcial dos ácidos nucleicos, não podendo ser equiparada a ação da dnase I comercial. Esse resultado concorda com experimentos de Neto (2015), partindo do princípio que o padrão de bandas e peso molecular aparente de P2-SE, mostrado nas figuras X e Y, se assemelha com a proteína Mo-CBP2, que tem ação contra ácidos nucleicos já descrita na literatura.

Continuando, P3-SE teve a atividade que melhor se compara com o resultado da atividade da dnase I utilizada como controle positivo, confirmando a hipótese inicial do trabalho, de que a Mo-CBP3 tem atividade nucleásica, apesar de ser uma proteína de reserva participante da família das albuminas 2S, excluindo a possibilidade da atividade estar presente em seus contaminantes, eluídos em P1-SE que não teve atividade. Outras albuminas 2S já foram descritas na literatura por terem atividade nucleásica, embora tradicionalmente associadas à nutrição de sementes, estudos recentes têm revelado funções adicionais para essas proteínas. Em espécies como *Putranjiva roxburghii*, *Bougainvillea butiana*, *Petunia*

inflata e *Cucurbita* sp., albuminas-2S presentes nessas plantas demonstraram atividade nucleásica, ou seja, a capacidade de degradar ácidos nucleicos (CHOUDHARY; YADAV; LODHA, 2008; SINGH; AI; KAO, 1991; TOMAR et al., 2014a, 2014b). Essas descobertas ampliam o entendimento sobre a versatilidade funcional desse grupo de proteínas e dão suporte à hipótese de que Mo-CBP3, de *Moringa oleifera*, também possa desempenhar papéis semelhantes. Por último, P4-SE teve uma leve atividade comparada ao controle, o que sugere uma possível contaminação por P3-SE ou uma atividade desconhecida até então da proteína Mo-CBP4.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a ação dos picos da SEC contra DNA plasmidial.



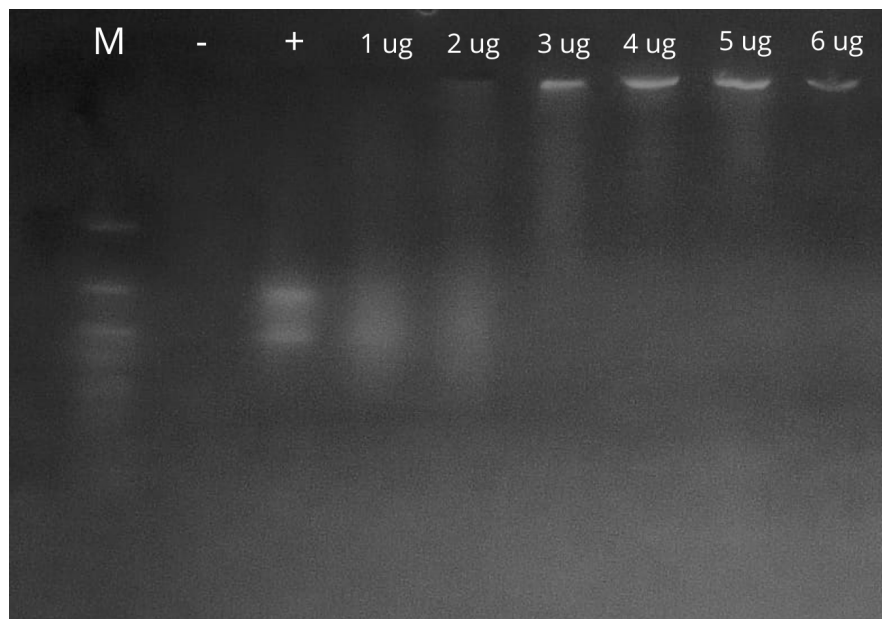
Raia M: Marcador para ácidos nucleicos; Raia (+): controle positivo com dnase I (1U*); Raia (-): controle negativo dna + água ultra pura; Raia 1: P1-SE; Raia 2: P2-SE; Raia 3: P3-SE; Raia 4: P3-SE.

* 1 U é a quantidade de proteína necessária para degradar 1 ug de DNA em 10 minutos à 37°C. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

6.10 Atividade nucleásica contra RNA utilizando PAC

Como a atividade nucleásica contra DNA foi eficiente, um teste preliminar contra RNA foi realizado a fim de saber se o pico de afinidade à quitina apresenta alguma especificidade quanto sua ação de degradação de ácidos nucleicos. Assim, foi realizado um ensaio em gel de agarose 1% utilizando RNA plasmidial de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, na figura. Quantidades crescentes de PAC foram utilizadas, e já com 1 ug da mistura de proteínas já foi suficiente para uma leve atividade se mostrar, até o ponto de 6 ug de proteínas ter uma atividade comparável à atividade da rnase III comercial. Esse aumento de quantidade de proteína se dá pois as quantidades de proteínas dentro da mistura PAC são muito variáveis, sendo necessário mais quantidade de mistura para termos quantidade suficiente de Mo-CBP3 para degradar RNA.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a atividade de PAC contra RNA em quantidades crescentes de proteína.



Raia M: marcador para ácidos nucleicos; Raia (-): controle negativo RNA + água ultrapura; Raia (+): rnase III (1U*); Restante das raias são quantidades crescentes de PAC contra 1 ug de RNA, sendo atividade que equipara-se a rnase comercial quando se atinge 6 ug de proteína.

*1 U é a quantidade necessária de proteína para degradar 1 ug de RNA em 10 minutos à 37°C. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

7 CONCLUSÃO

Inicialmente, a suspeita da atividade nucleolítica presente na fração proteica era atribuída a uma possível proteína contaminante. No entanto, a utilização de uma etapa de purificação mais refinada, como a Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC), permitiu o isolamento eficiente da proteína. O ensaio de clivagem subsequente confirmou que a atividade nucleásica reside na própria Mo-CBP3, presente no pico P3-SE (SEC).

Esta descoberta é de grande relevância, pois estabelece a atividade nucleásica da Mo-CBP3 contra DNA e RNA plasmidiais, com uma potência comparável a nucleases comerciais. A natureza multifuncional da Mo-CBP3 – que agora combina a já conhecida atividade antifúngica/antibacteriana com a degradação de ácidos nucleicos – sugere um mecanismo de defesa vegetal mais complexo e eficiente do que se supunha.

Portanto, esta dissertação não apenas estabelece um protocolo de purificação para a proteína Mo-CBP3, mas também elucida uma nova atividade da Mo-CBP3. Assim, solidifica o papel da *Moringa oleifera* como uma fonte inestimável para a bioprospecção de moléculas bioativas de interesse global.

REFERÊNCIAS

- ABD, M. E. *et al.* Pharmacological, nutritional and antimicrobial uses of *Moringa oleifera* Lam. leaves in poultry nutrition: an updated knowledge. **Poultry Science**, Amsterdam, v. 101, n. 9, p. 102031-102031, 1 jun. 2022.
- AKBARIAN, M.; CHEN, S.-H. Instability Challenges and Stabilization Strategies of Pharmaceutical Proteins. **Pharmaceutics**, Taiwan, v. 14, n. 11, p. 2533, 20 nov. 2022.
- ATTIA, K. *et al.* Overexpression of the OsPDCD5 Gene Induces Programmed Cell Death in Rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 47, n. 9, p. 1115-1122, set. 2005.
- BATISTA, A. 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**, São Francisco, v. 9, n. 10, p. e111427, 27 out. 2014.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 13, n. 1, p. 42-51, 1 dez. 2014.
- BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Amsterdam, v. 113, n. 5, p. 821-830, maio 2004.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, D.C., v. 54, n. 3, p. 969-976, 7 dez. 2010.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Candida auris 2019 Case Definition**. 2019. Disponível em: <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/candida-auris-2019/>. Acesso em: 16 out. 2025.
- CHOUDHARY, N. L.; YADAV, O. P.; LODHA, M. L. Ribonuclease, deoxyribonuclease, and antiviral activity of Escherichia coli-expressed *Bougainvillea xbuttiana* antiviral protein 1. **Biochemistry**, Moscow, v. 73, n. 3, p. 273-277, mar. 2008.
- CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 350, n. 10, p. 1023-1035, 4 mar. 2004.
- FREIRE, 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**, [s. l.], v. 140, n. 140, p. 68-77, 1 jul. 2019.
- GARCIA GONZALEZ, J.; HERNANDEZ, F. J. Nuclease activity: an exploitable biomarker in bacterial infections. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 265-294, 4 mar. 2022.
- GEKKO, K. *et al.* Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1387, n. 1, p. 195-205, 8 set. 1998.
- GIFONI, J. M. *et al.* A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 406-415, 1 jan. 2012.

GOBERT, A. *et al.* Towards plant resistance to viruses using protein-only RNase P. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 12 fev. 2021.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. *Moringa oleifera*: a Review on Nutritive Importance and Its Medicinal Application. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 49-56, jun. 2016.

GUPTA, P.; GAUR, V.; SALUNKE, D. M. Purification, identification and preliminary crystallographic studies of a 2S albumin seed protein from *Lens culinaris*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 733-736, 26 jul. 2008.

HAGIWARA, D. *et al.* Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, 21 set. 2016.

HANEY, P.; HERTING, K.; SMITH, S. **Separation Characteristics of Dialysis Membranes**, [s. l.], Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/separation-characteristics-dialysis-membranes.html>. Acesso em: 16 out. 2025.

HEATH, J. D. *et al.* Analysis of storage proteins in normal and aborted seeds from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, [s. l.], v. 169, n. 3, p. 304-312, nov. 1986.

ITO, J.; FUKUDA, H. ZEN1 Is a Key Enzyme in the Degradation of Nuclear DNA during Programmed Cell Death of Tracheary Elements. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 3201-3211, 26 nov. 2002.

KUNITZ, M. Isolation from Beef Pancreas of a Crystalline Protein Possessing Ribonuclease Activity. **Science**, [s. l.], v. 90, n. 2327, p. 112-113, 4 ago. 1939.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 4, 12 set. 2018.

LAMBERT, R. *et al.* Identification of nucleases related to nutrient mobilization in senescing cotyledons from French bean. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 38, n. 11, 28 out. 2016.

LEITE PEREIRA, M. *et al.* Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 1078-1085, 1 nov. 2011.

LESNIEWICZ, K. *et al.* The Plant S1-Like Nuclease Family Has Evolved a Highly Diverse Range of Catalytic Capabilities. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1064-1078, 26 abr. 2013.

LIPIPUN, V. *et al.* Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 175-180, nov. 2003.

- LOCKHART, S. R. *et al.* Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 134-140, 20 out. 2016.
- 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**, [s. l.], v. 149, n. 149, p. 432-442, abr. 2020.
- LUEPKE, K. H. *et al.* Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 71-84, 27 dez. 2016.
- MA, L. *et al.* Characterization of a Novel Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase from Tobacco. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 1280-1293, 1 jul. 2004.
- MESRI, A. *et al.* Ribonuclease-Based Immunotoxins as Anticancer Agents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], 9 set. 2025.
- MOSCONA, A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 13, p. 1363-1373, 29 set. 2005.
- MYLNE, J. S.; HARA-NISHIMURA, I.; ROSENGREN, K. J. Seed storage albumins: biosynthesis, trafficking and structures. **Functional Plant Biology**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 671-671, 1 jan. 2014.
- 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**, [s. l.], v. 8, n. 8, 6 jun. 2017.
- NOURBAKSH, A.; COLLAKOVA, E.; GILLASPY, G. E. Characterization of the inositol monophosphatase gene family in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 5, 9 jan. 2015.
- OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, n. 157, p. 10-21, fev. 2019.
- PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 577-601, 2015.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 133-163, 1 jan. 2007.
- PINHEIRO, M. *et al.* *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 21, n. 4, 2008.

- PONSTINGL, H. *et al.* Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 2757-2761, 1 maio 1981.
- PRATAP, P. *et al.* Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 448, n. 4, p. 349-354, 9 maio 2014.
- PRICE, R. O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. **European Journal of Hospital Pharmacy**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 245-247, 24 jun. 2016.
- PRINCE, W. S. *et al.* Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. **Clinical & Experimental Immunology**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 289-296, ago. 1998.
- RODMAN, J. E. *et al.* Nucleotide Sequences of the rbcL Gene Indicate Monophyly of Mustard Oil Plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 686-686, 1 jan. 1993.
- SARAGE-BARHOM, S. *et al.* Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 3247-3258, 4 jul. 2008.
- SHARMA, P. *et al.* Nucleases of bacterial pathogens as virulence factors, therapeutic targets and diagnostic markers. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 309, n. 8, p. 151354, dez. 2019.
- SILVA NETO, J. X. **Aspectos estruturais, efeito antibiofilme, mecanismo de ação, efeito sinérgico com fármacos comerciais e toxicidade de Mo-CBP2, uma proteína anticândida isolada de sementes de *Moringa oleifera***, Fortaleza, 2020. 164 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- SOUZA, P. F. N. *et al.* Neutralizing Effect of Synthetic Peptides toward SARS-CoV-2. **ACS Omega**, [s. l.], v. 7, n. 18, p. 16222-16234, 28 abr. 2022.
- TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 Antiretroviral Resistance. **Drugs**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. e1-e25, jun. 2012.
- TOMAR, P. P. S. *et al.* Purification, Characterisation and Cloning of a 2S Albumin with DNase, RNase and Antifungal Activities from *Putranjiva roxburghii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 471-482, 31 jul. 2014.
- ULLAH, A. *et al.* Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 468, n. 1-2, p. 365-371, 4 dez. 2015.
- VILLIGER, L. *et al.* CRISPR Technologies for genome, Epigenome and Transcriptome Editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 25, p. 1-24, 2 fev. 2024.
- WANG, Y. *et al.* Optical sensor revealed abnormal nuclease spatial activity on cancer cell membrane. **Journal of Biophotonics**, [s. l.], v. 12, n. 5, 29 nov. 2018.

WU, L. *et al.* RNase T2 in Inflammation and Cancer: Immunological and Biological Views. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, art. 1554, 13 ago. 2020.