



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CONTRA
Candida spp. DE UMA NOVA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES
DE *Moringa oleifera* LAM.**

FORTALEZA

2015

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CONTRA *Candida*
spp. DE UMA NOVA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa*
oleifera LAM.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica. Área de
Concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Prof.^a Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA

2015

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

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

- S58p Silva Neto, João Xavier da.
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CONTRA *Candida spp.* DE
UMA NOVA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* LAM. / João
Xavier da Silva Neto. – 2016.
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
1. Prospecção. 2. *Moringa*. 3. Proteína vegetal. 4. Antifúngica. 5. Candidíase. I. Título.
- CDD 572
-

JOÃO XAVIER DA SILVA NETO

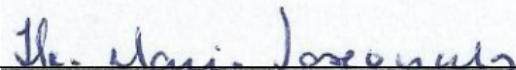
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CONTRA *Candida* spp. DE UMA NOVA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* LAM.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal

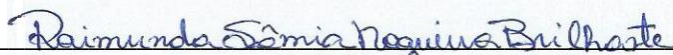
Orientadora: Prof.^a Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Aprovada em: 15 de dezembro de 2015

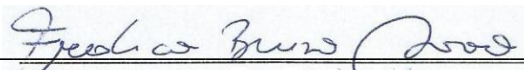
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Ilka Maria Vasconcelos - (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Frederico Bruno Mendes-Batista Moreno
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus. A minha mãe e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **DEUS**, o qual é minha fortaleza. Obrigado por esta vida maravilhosa, por me proteger a todo momento, por todas as vitórias que me deu, por minha família e pelas pessoas maravilhosas que tenho em minha volta. Sou grato por tudo.

Agradeço a Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e ao Dr. Frederico Bruno Mendes Batista Moreno por aceitarem participar da minha banca examinadora e pelas valiosas sugestões dadas.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos, por ter me acolhido de maneira tão gentil em seu laboratório e ter confiado no meu trabalho. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, pelas “ broncas” sempre que necessárias, pelo carinho, incentivo e pela agradável convivência. Por ser sempre um exemplo de cientista ética e por zelar sempre pela formação criteriosa de seus estudantes. Obrigado pela paciência e dedicação em orientar-me com excelência. A senhora sempre terá um lugar especial em minha vida. Muito obrigado.

A minha querida Co-orientadora, Dra. Mirella Leite Pereira (Mimi), pela criteriosa co-orientação e por se dedicar e se comprometer de maneira efetiva para a realização desse trabalho. Obrigado pelo carinho, apoio e incentivo que sempre me foi dado. Obrigado ainda, pelos momentos de descontração e alegria, por sempre estar disposta a dar bons conselhos pessoais e profissionais. Você tem toda minha admiração e carinho.

Agradeço a Dra. Lady Clarissa, por ser sempre uma “Lady” e, entretanto, ser rígida quando necessário. Obrigado pelo auxílio direto na escrita e nos experimentos do mestrado. Agradeço pelos momentos de descontração e brincadeiras, conselhos profissionais e por tentar me fazer menos “amarrado”. Pelo auxílio direto nos experimentos (e que foram muitos). Muito Thanks!!

Ao Prof. Dr. José Tadeu, por todos os ensinamentos e por se mostrar sempre solícito a esclarecer minhas dúvidas e ajudar no que fosse necessário. Por ser um exemplo de verdadeiro cientista e de excelente pessoa. A Profa. Dra. Daniele Sousa, pelos inúmeros momentos de descontração, apoio durante o mestrado e na execução deste trabalho e pela torcida a cada experimento realizado.

A família Labtox: Bella, por sempre me oferecer seus alfajores, apesar de quase sempre não os comprar. Nadine, por ser um poço de alegria, descontração, amizade e por sempre me ajudar quando solicitada. Ana Paula, por sempre ter um bom conselho com relação

a livros, sempre estar disposta a ajudar nos experimentos e pela amizade. Paulo, pelas piadas nerdes e pela amizade, além das discussões científicas quase sempre produtivas (kkkkk). Helen, pelo carinho e amizade, pelos bons e inúmeros momentos de alegria, por estar sempre disposta a me “acudir” nos experimentos (que não foram poucas). Lucas, por ser nosso “líder adultão”, pelos momentos de alegria e descontração, por estar sempre disposto a ajudar, pelo auxílio direto no experimento principalmente por trazer guloseimas para o laboratório. Marina Gabriele, pelas caronas, pelos momentos de apoio e disposição em ajudar (apesar de você sempre pedir mais ajuda, kkkkkk). Tiago Deiveson (Xampes!), pelas caronas sempre nas horas certas, pela amizade verdadeira (que é recíproca) e por estar sempre disposto a ajudar. Mariana (Mari), pelos inúmeros momentos de alegria e risadas (nós “sofre”, mas se diverte!), apoio direto ou indireto durante o mestrado, ter me tornado menos “SDS”, pelos livros emprestados e por ser companheira de gordice e nos momentos fitness. Por fim, e não menos importante, Tarcymara (Tarcy), pelos momentos de alegria e descontração, amizade e respeito, por me alimentar e dar guarida sempre que necessário, por estar sempre disposta a ajudar (mesmo que se prejudicasse), discutir sobre bioquímica e por ter me ajudado a crescer (em todos os âmbitos). Você me tornou uma pessoa muito melhor.

Aos amigos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, pelo apoio durante a realização deste trabalho: Thiago, Handerson, Fredy, Pedro, Rodolpho, Anna Lídia, Larissa, Emanuel, Ivina, Dhel, Louise, Elizabet e Raissa. Agradeço pelos momentos de descontração, pela ajuda sempre que solicitada e pelo apoio.

A Vilmara, pelos momentos de alegria, carinho e apoio. Por me induzir a trabalhar até mais tarde (pois tinha que te esperar para ir para casa). Por sempre estar disposta a fazer gordices a qualquer hora e lugar.

A todos os demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela dedicação e excelência na formação dos estudando de todo departamento.

Agradeço aos meus amigos de Mossoró e UERN, os quais sempre me são extremamente importantes, apesar da distância. Nunca me esquecerei de vocês.

Ao Prof. Dr. José Hélio de Araújo Filho, que teve a paciência e dedicação de me orientar durante a graduação. Agradeço pela excelente orientação e pelos conselhos e broncas sempre nos momentos oportunos, que me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a Thiago Fernandes, por ter aberto as portas de sua casa (mediante ao pagamento de um “singelo” aluguel, Hehehehehe) assim que cheguei em Fortaleza. Obrigado

pelos momentos de descontração, amizade, irmandade, por estar disposto sempre a ajudar e pelas produtivas discussões sobre bioquímica.

A Roselia Fernandes (Tia Rosa) por me acolher de maneira maternal em sua casa. Obrigado pelos deliciosos bolos e tortas, por ter sido a “minha segunda mãe”, por cuidar de mim e pelos bons conselhos que me deu. A senhora tem lugar cativo no meu coração.

Agradeço a minha mãe, Maria da Conceição e minha irmã Rejane, sem as quais eu nunca teria chegado até aqui. Agradeço pelas noites de sono perdidas, pelas broncas, conselhos e amor. Obrigado por se preocuparem comigo e zelarem pelo meu bem-estar. Vocês são meu porto seguro e sempre vou procurar o melhor para vocês.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará - Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

Universidade Federal do Ceará – Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes – LAPERE, sob coordenação da Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela concessão das cepas de *Candida* spp. utilizadas neste trabalho.

Universidade de Fortaleza – Através das atividades relacionadas às análises por espectrometria de massas realizadas no laboratório coordenado pela Dr.^a Ana Cristina De Oliveira Monteiro Moreira.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) - Através da concessão de bolsa de Pós-Graduação ao autor do trabalho e, também, auxílio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

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

“Aquele que nada sacrifica, nada é capaz de obter”

(Elric, Edward-Fullmetal Alchemist)

RESUMO

Candida spp. compreendem um grupo de leveduras que normalmente vivem na pele e mucosas do homem, podendo ocasionar candidíase, com consequências graves particularmente para indivíduos imunocomprometidos. Os principais antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase são tóxicos e podem levar ao aparecimento de cepas resistentes. Uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais é o uso de proteínas vegetais. *Moringa oleifera* é uma planta de grande valor nutricional e medicinal, com atividade antimicrobiana. Este trabalho objetivou purificar uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera* e avaliar sua atividade antifúngica contra espécies de *Candida*. *Mo*-CBP₂ (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: “Chitin Binding Protein”) foi purificada a partir da fração albumina de sementes de *M. oleifera* por cromatografia de afinidade em matriz de quitina, seguida de cromatografia de troca catiônica. *Mo*-CBP₂ representou em torno de 0,14% da proteína total da semente e se apresentou como uma única banda na eletroforese em condição nativa. Por espectrometria de massas, *Mo*-CBP₂ é uma proteína de 13.160 Da. Em contraste, *Mo*-CBP₂ emergiu em dois picos, com massas moleculares correspondentes a 33,0 e 66,0 kDa, após cromatografia de filtração em gel (pH 7,5). *Mo*-CBP₂ apresentou-se como uma única banda proteica com massa molecular aparente de 25,0 kDa quando analisada por PAGE-SDS. Todavia, em Tricina-SDS-PAGE, *Mo*-CBP₂, em condições não redutoras, resultou em duas bandas proteicas, uma na faixa de 13,0 kDa e outra superior a 17,0 kDa e, após tratamento com DTT e β-mercaptoetanol, mostrou bandas com massas moleculares aparentes de 7,0 e 4,0 kDa. Os dados em conjunto sugerem que *Mo*-CBP₂ existe em diferentes formas oligoméricas. *Mo*-CBP₂ é uma glicoproteína básica (pI 10,9) com 4,1% de carboidratos, não apresentando atividade hemaglutinante ou hemolítica frente a eritrócitos de coelho. A análise comparativa das sequências dos peptídeos trípticos obtidos a partir da *Mo*-CBP₂ em solução, após LC-ESI-MS/MS, revelou similaridade com outras proteínas de *M. oleifera*, como a albuminas 2S denominada de *Mo*-CBP₃. *Mo*-CBP₂ foi capaz de inibir, *in vitro*, o crescimento de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com CIM variando de 9,45 a 37,9 μM. Em adição, *Mo*-CBP₂ (18,9 μM) aumentou a permeabilidade da membrana celular e induziu a produção de espécies reativas de oxigênio em *C. albicans*, além de ter degradado o DNA do plasmídeo circular (pUC18) de *Escherichia coli*. Os resultados obtidos apontam para o potencial de uso da *Mo*-CBP₂ como uma nova proteína antifúngica ativa contra *Candida* spp.

Palavras chave: Prospecção; Moringa; Proteína vegetal; Antifúngica; Candidíase.

ABSTRACT

Candida species encompass a group of yeast that normally lives on the skin and mucous surfaces of human beings, in which the infectious disease candidiasis can occur, with severe consequences particularly for immunocompromised patients. The available antifungal drugs used for the candidiasis treatment are usually toxic and can lead to the development of resistant strains. A promising alternative to the conventional treatments is the use of plant proteins. *Moringa oleifera* is a plant with valuable nutritional and medicinal properties, including antimicrobial activity. This work aimed to purify a chitin-binding protein from *M. oleifera* seeds and to evaluate its antifungal properties against *Candida* species. *Mo*-CBP₂ (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: Chitin Binding Protein) was purified from the albumin fraction of *M. oleifera* seeds through chitin affinity chromatography followed by cation exchange chromatography. *Mo*-CBP₂ represented about 0.14% of the total seed protein and appeared as a single band on native PAGE. By mass spectrometry, *Mo*-CBP₂ presented 13,160 Da. However, in contrast, after native gel filtration chromatography (pH 7.5) two protein peaks with molecular masses of 33.0 and 66.0 kDa emerged from *Mo*-CBP₂. By SDS-PAGE, *Mo*-CBP₂ migrated as a single band with an apparent molecular mass of 25.0 kDa. Nevertheless, Tricine-SDS-PAGE of *Mo*-CBP₂ under non-reduced conditions revealed two protein bands in the range of 13.0 and 17.0 kDa. After DTT and β -mercaptoethanol treatments, *Mo*-CBP₂ appeared as been composed of masses of 7.0 and 4.0 kDa. Altogether, these results suggest that *Mo*-CBP₂ exists in different oligomeric forms. Moreover, *Mo*-CBP₂ is a basic glycoprotein (pI 10.9) with 4.1% sugar, with did not display hemagglutinating or hemolytical activity upon rabbit erythrocytes. A comparative analysis of the sequence of triptic peptides from *Mo*-CBP₂ in solution, after LC-ESI-MS/MS, revealed similarity with other *M. oleifera* proteins, as the 2S albumin *Mo*-CBP₃. *Mo*-CBP₂ possesses *in vitro* antifungal activity against *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, with MIC ranging from 9.45 to 37.9 μ M. In addition, *Mo*-CBP₂ (18.9 μ M) increased the cell membrane permeabilization and oxigen reactive species production in *C. albicans* and promoted degradation of circular plasmid DNA (pUC18) from *Escherichia coli*. The results presented in this work point out the potential of *Mo*-CBP₂ as a new antifungal protein active against *Candida* spp.

Key words: Prospection; Moringa; Plant protein; Antifungal; Candidiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i> apresentando duas camadas distintas: a camada externa formada por glicoproteínas e a camada interna constituída por um esqueleto polissacarídico	22
Figura 2	Esquema da localização dos alvos dos principais antifúngicos usados no tratamento clínico contra <i>Candida</i> spp.	25
Figura 3	<i>Moringa oleifera</i> e suas partes constituintes	31
Figura 4	Esquema de purificação de proteína ligante à quitina de sementes de <i>Moringa oleifera</i> – <i>Mo</i> -CBP ₂	42
Figura 5	Cromatografia de afinidade em matriz de quitina	54
Figura 6	Cromatografia de troca iônica em matriz de CM Shepharose [®] Fast Flow	55
Figura 7	Perfil eletroforético da <i>Mo</i> -CBP ₂ em condição desnaturante (PAGE-SDS)	58
Figura 8	Perfil eletroforético da <i>Mo</i> -CBP ₂ em condições desnaturantes em sistema tris-tricina	69
Figura 9	Perfil eletroforético da <i>Mo</i> -CBP ₂ em condição nativa	60
Figura 10	Massa molecular e ponto isoeletrico da <i>Mo</i> -CBP ₂ , obtidos por PAGE-2D	61
Figura 11	Cromatografia de exclusão molecular da <i>Mo</i> -CBP ₂ em pHs diferentes	63
Figura 12	Perfil eletroforético da <i>Mo</i> -CBP ₂ aplicada em cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa	64
Figura 13	Espectro de massas de <i>Mo</i> -CBP ₂ por TOF-ESI-MS	66

Figura 14	Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos peptídeos trípticos de <i>Mo</i> -CBP ₂ com as quatro isoformas do precursor de <i>Mo</i> -CBP ₃ , uma albumina 2S de <i>M. oleifera</i>	69
Figura 15	Detecção de glicoproteína pelo método de Schiff	72
Figura 16	Perfil eletroforético de <i>Mo</i> -CBP ₂ antes e após deglicosilação (PAGE-SDS)	73
Figura 17	Indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) em <i>C. albicans</i> tratados com <i>Mo</i> -CBP ₂	76
Figura 18	Permeabilização de membrana em <i>C. albicans</i>	77
Figura 19	Atividade DNásica de <i>Mo</i> -CBP ₂	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor proteico e rendimento das diferentes frações obtidas durante a purificação de <i>Mo</i> -CBP ₂	56
Tabela 2	Sequência de aminoácidos de peptídeos de <i>Mo</i> -CBP ₂ identificados por ESI-Q-TOF MS/MS após digestão trípica em solução da proteína purificada	67
Tabela 3	Similaridade (%) entre as sequências de aminoácidos dos peptídeos trípticos de <i>Mo</i> -CBP ₂ e isoformas do precursor de <i>Mo</i> -CBP ₃ , uma albumina 2S de <i>M. oleífera</i>	70
Tabela 4	Efeito inibitório de <i>Mo</i> -CBP ₂ e Nistatina frente a cepas ATCC e isolado clínico de <i>Candida</i> spp.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina sérica bovina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Carboximetil
ERO	Espécies reativas de oxigênio
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido desossiribonucléico
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por eletrospray
TOF	Tempo de voo
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HPLC	Chromatografia líquida de alta performance
IAA	Iodoacetoamida
IP	Iodeto de propídeo
MS	Espectrometria de massas
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P_{AC}	Pico eluído com ácido acético
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI	Ponto isoelétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	<i>Candida spp.</i>	19
2.2	Candidíase	20
2.3	Agentes antifúngicos e seus alvos	23
2.4	Proteínas antifúngicas vegetais	27
2.4.1	<i>Proteínas ligantes à quitina</i>	28
2.5	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck	30
2.5.1	<i>Efeitos farmacológicos</i>	33
2.5.2	<i>Atividade antifúngica</i>	35
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	37
3.1	Hipótese	37
3.2	Objetivo geral	37
3.3	Objetivos específicos	37
4	Material	38
4.1	Material biológico	38
4.1.1	<i>Sementes de Moringa oleifera</i> Lamarck	38
4.1.2	<i>Leveduras</i>	38
4.1.3	<i>Animais</i>	38
4.2	Reagentes químicos e outros materiais	38
5	Métodos	40

5.1	Purificação da <i>Mo</i>-CBP₂, uma proteína ligante à quitina de sementes de <i>M. oleifera</i>	40
5.2	Quantificação das proteínas solúveis	41
5.3	Caracterização bioquímica da <i>Mo</i>-CBP₂	41
5.3.1	<i>Determinação de massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)</i>	41
5.3.2	<i>Determinação da presença de subunidades por eletroforese em Tricina-SDS-PAGE</i>	43
5.3.3	<i>Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições native</i>	44
5.3.4	<i>Determinação do ponto isoelétrico (pI) por eletroforese bidimensional (PAGE-2D)</i>	44
5.3.5	<i>Determinação da massa molecular e avaliação da influência do pH sobre o perfil de eluição da <i>Mo</i>-CBP₂ através de cromatografia de exclusão molecular</i>	45
5.3.6	<i>Determinação da massa molecular real por espectrometria de massas</i>	46
5.3.7	<i>Deteção e quantificação de carboidratos</i>	46
5.3.8	<i>Determinação da massa molecular após deglicosilação</i>	47
5.3.9	<i>Determinação da sequência NH₂-terminal</i>	47
5.3.10	<i>Obtenção da sequência de peptídeos trípticos por espectrometria de massas</i>	47
5.3.11	<i>Determinação da atividade hemaglutinante</i>	48
5.4	Atividade antifúngica da <i>Mo</i>-CBP₂ contra <i>Candida</i> spp.	48
5.4.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀)</i>	48
5.4.2	<i>Avaliação do modo de ação da <i>Mo</i>-CBP₂</i>	49
5.4.2.1	<i>Preparo da suspensão de leveduras</i>	49
5.4.2.2	<i>Tratamento das células</i>	49
5.4.2.3	<i>Determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	50

5.4.2.4	<i>Determinação da integridade da membrana celular</i>	50
5.4.2.5	<i>Atividade DNásica</i>	51
5.5	Avaliação da atividade hemolítica	51
5.6	Análise estatística	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Purificação da <i>Mo</i>-CBP₂	53
6.2	Caracterização bioquímica da <i>Mo</i>-CBP₂	57
6.2.1	<i>Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS) e perfil eletroforético em sistema tris-tricina</i>	57
6.2.2	<i>Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida sob condição nativa</i>	57
6.2.3	<i>Massa molecular e ponto isoelétrico obtidos por PAGE-2D</i>	57
6.2.4	<i>Massa molecular obtida por cromatografia de exclusão molecular em valores de pH distintos</i>	62
6.2.5	<i>Massa molecular e sequências de peptídeos tríptico identificados por espectrometria de massas</i>	62
6.2.5.1	<i>Massa molecular</i>	62
6.2.5.2	<i>Sequências de peptídeos trípticos</i>	65
6.2.6	<i>Sequência NH₂-terminal</i>	65
6.2.7	<i>Deteção de carboidratos ligados à proteína</i>	65
6.2.8	<i>Avaliação da atividade hemaglutinante</i>	71
6.3	Atividade anti-<i>Candida</i> da <i>Mo</i>-CBP₂ e investigação do seu modo de ação	71
6.3.1	<i>Avaliação do efeito inibitório da <i>Mo</i>-CBP₂ sobre o crescimento de <i>Candida</i> spp.</i>	71
6.3.2	<i>Investigação do modo de ação anti-<i>Candida</i> da <i>Mo</i>-CBP₂</i>	71

7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

É extremamente comum a ocorrência natural de fungos do gênero *Candida* na pele e mucosas de indivíduos saudáveis. No entanto, dentre cerca de 200 espécies de *Candida* que já foram identificadas até o momento, 10% delas são consideradas patogênicas ao homem. Algumas das espécies mais importantes do ponto de vista clínico incluem as mesmas que são capazes de colonizar a superfície corpórea humana, tais como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

As infecções ocasionadas por *Candida* spp., denominadas “candidíase”, são um grande desafio da medicina atual. Essas podem ser desencadeadas pelo uso indiscriminado de antibióticos, uma vez que a microbiota bacteriana é desbalanceada e, assim, *Candida* spp. são passíveis de se desenvolver por falta de competição interespecífica. A ocorrência de *diabetes mellitus* tipos 1 e 2 e, ainda, de doenças e/ou situações que debilitem o sistema imunológico (quimioterapia, indivíduos soropositivos etc.) também são fatores de risco para o surgimento de candidíase. Em ambiente hospitalar, essas infecções acometem mais corriqueiramente pacientes que foram submetidos a alguma intervenção cirúrgica e fazem uso de sondas, pois, nesse caso, é comum a formação de biofilmes sobre os quais *Candida* spp. podem se desenvolver.

As substâncias antifúngicas atualmente disponíveis no mercado para o tratamento de candidíase muitas vezes são eficientes, mas podem levar a seleção de cepas resistentes e, portanto, a eficácia do tratamento é reduzida. Além disso, tais substâncias podem apresentar variados graus de toxicidade devido, dentre outros fatores, a sua baixa especificidade. Dessa forma, é de grande importância a busca por novos compostos com atividade antifúngica, possibilitando o desenvolvimento de drogas e/ou tratamentos alternativos. Nesse contexto, as plantas surgem como fontes promissoras de compostos bioativos contra *Candida* spp., uma vez que produzem ampla variedade de metabólitos primários (especialmente proteínas) e secundários de forma intrínseca e/ou em resposta ao ataque por herbívoros e/ou fitopatógenos.

Diversas proteínas vegetais já são reconhecidamente dotadas de bioatividade contra *Candida* spp., de forma que sua aplicação biotecnológica direcionada ao controle destes fungos é sugerida. Dentre essas, destacam-se as proteínas ligantes à quitina devido à sua capacidade de interagir com o principal componente estrutural da parede celular fúngica e, portanto, alvo potencial de compostos com ação antifúngica.

Nosso grupo de pesquisa identificou a presença de proteínas ligantes à quitina em sementes de *Moringa oleifera*, uma planta nativa da Índia bastante conhecida no Brasil, especialmente na região Nordeste, principalmente por suas propriedades flocculantes, nutricionais e farmacológicas. As proteínas ligantes à quitina de *M. oleifera*, denominadas genericamente *Mo*-CBP (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: “Chitin Binding Proteins”) por nosso grupo de pesquisa, já foram estudadas quanto ao seu potencial antifúngico. Uma dessas proteínas, *Mo*-CBP₃, apresenta atividade contra fungos fitopatogênicos de importância agrônômica. O presente trabalho, em particular, tem como objeto de estudo uma nova proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominada *Mo*-CBP₂, onde estão sendo propostas sua purificação, caracterização bioquímica e avaliação de sua atividade inibitória contra *Candida* spp.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Candida* spp.

Candida spp. compreende um grupo extremamente heterogêneo de leveduras, ou seja, células individuais, de formato oval ou esférico, que podem exibir padrões de brotamento axiais e bipolares (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). Cerca de 200 espécies de *Candida* já foram identificadas, dentre estas, mais de 20 espécies são sabidamente patogênicas ao homem. As espécies clinicamente importantes incluem *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (GONG, *et al.*, 2016; TAN, *et al.*, 2016), complexo de *C. glabrata* (formado por *C. nivariensis* e *C. bracarensis* e *C. glabrata sensu strictu*) (SWOBODA-KOPÉČ, *et al.*, 2014) e complexo de *C. parapsilosis* (formado por *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis sensu stricto*) (PIRES, *et al.*, 2016).

Macroscopicamente, as colônias de *Candida* possuem cor de creme a amarelada (em meio de cultura Ágar Sabouraud) e, dependendo da espécie, podem ter uma textura macia, brilhante ou seca ou enrugada sem brilho. Algumas espécies, como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, podem apresentar crescimento envolvendo hifas verdadeiras ou, mais comumente, pseudohifas. Hifas e pseudohifas distinguem-se pela maneira como são formadas. Pseudohifas são formadas a partir de células de levedura por brotamento, mas o novo crescimento permanece ligado à célula parental e alongado, resultando em filamentos com constrições nas junções célula-célula. Não há paredes transversais internas (septos associados com pseudohifas). Já as hifas verdadeiras são formadas a partir de uma projeção do tubo germinativo que se alonga e, em seguida, forma ramos com septos definidos que dividem as hifas fúngicas em unidades separadas. Essa capacidade de formar hifas e pseudohifas que algumas espécies de *Candida* possuem é denominada de polimorfismo e está relacionada com a virulência e patogenicidade do fungo, pois facilita a penetração nos tecidos do hospedeiro durante a infecção (SILVA *et al.*, 2011).

Outros fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade de *Candida* spp., mas o papel da parede celular na patogênese destes fungos é indiscutível. A parede celular é a estrutura que: (1) entra primeiro em contato com as células do hospedeiro; (2) transporta importantes determinantes antigênicos do fungo; (3) é responsável pela adesão do patógeno e (4) estabelece uma conversa cruzada com o hospedeiro, através do "código de glicanos", que

inclui modificações na composição química e nas ligações dos polissacarídeos da parede celular (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006). Observações microscópicas de secções da parede celular de *Candida* spp. revelam a existência de, pelo menos, duas camadas bem distintas (FIGURA 1). A camada externa, que é altamente enriquecida com polímeros de manose *O*- e *N*-ligados a proteínas formando glicoproteínas; e a camada interna, contendo um esqueleto constituído pelos polissacarídeos quitina e β -1,3-glucano, que conferem resistência e forma à célula. As glicoproteínas ligam-se ao esqueleto polissacarídico através de um glicano mais flexível, o β -1,6-glucano. Desta maneira, a parede celular é formada por 80 – 90% de carboidratos (GOW *et al.*, 2012).

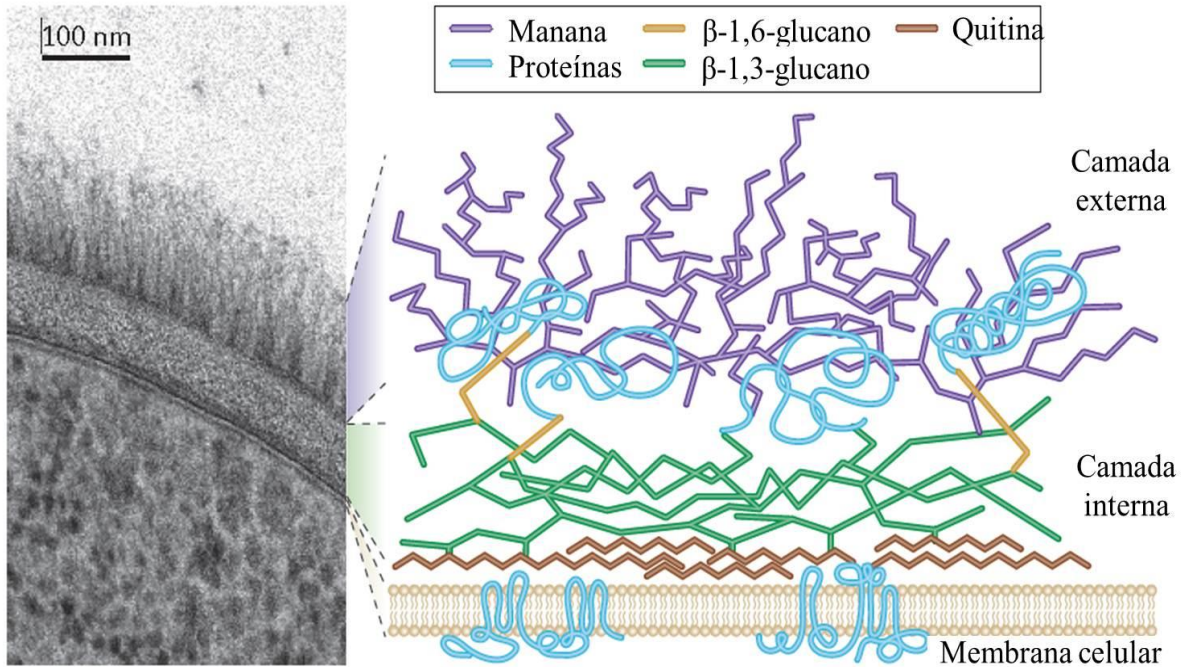
Em *C. albicans*, cerca de 2% da massa seca da parede celular normalmente são constituídas de quitina, enquanto que 40% e 20% correspondem aos polissacarídeos β -1,3-glucano e β -1,6-glucano, respectivamente. Contudo, o conteúdo de quitina parece estar relacionado com a defesa e virulência deste fungo, pois em condições de estresse a quantidade desse polissacarídeo pode quadruplicar. Além disso, em sua forma de hifa, a quantidade de quitina chega a ser de 3 a 5 vezes maior do a quantidade encontrada na sua forma leveduriforme (GOW *et al.*, 2012).

A quitina é um polissacarídeo linear constituído por mais de 2000 unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, GlcNAc), unidas por ligações β -1,4. Cadeias de quitina são associadas de forma antiparalela através de ligações de hidrogênio para formar microfibrilas compostas de 20 a 400 cadeias. Devido a este arranjo cristalino, quitina é um dos produtos naturais mais insolúveis, o que explica sua posição na base da parede celular, formando um verdadeiro alicerce. Portanto, a quitina é um componente essencial da parede celular de *Candida* e por isso torna-se um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; GOW, 2012).

2.2 Candidíase

Infecções ocasionadas por *Candida* spp. são tidas como um dos principais problemas de saúde pública na medicina atual (VAN DER MEER *et al.*, 2010). É comum indivíduos saudáveis serem portadores de algumas espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*), fazendo parte da microbiota natural da pele e superfícies de

Figura 1 - Estrutura da parede celular de *Candida albicans* apresentando duas camadas distintas: a camada externa formada por glicoproteínas e a camada interna constituída por um esqueleto polissacarídico



Fonte: Gow e colaboradores (2012), com adaptações.

mucosas (bucal, trato gastrointestinal e vaginal). Essas leveduras são detectadas em aproximadamente 71% da população mundial vivendo de maneira comensal, sendo muitas vezes necessária alguma mudança no hospedeiro que favoreça o desenvolvimento da infecção por esses microrganismos (MAVOR; THEWES; HUBE, 2005). *Candida* spp. são fungos oportunistas responsáveis por grande parte das infecções fúngicas ocorridas em pacientes imunocomprometidos em hospitais (EGGIMANN *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015). Essas infecções também constituem um dos maiores problemas nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), estando associadas a um alto índice de mortalidade (MONTRAVERS *et al.*, 2011; HAMMARSKJÖLD *et al.*, 2013). Pacientes que foram submetidos a alguma intervenção cirúrgica e estão utilizando algum tipo de sonda (por exemplo, sonda urinária, orogástricas, drenos etc.) são mais frequentemente colonizados por *Candida* spp. (SCHELENZ, 2008).

O uso indiscriminado e prolongado de antibióticos favorece o surgimento de infecções por *Candida* spp. já que esses medicamentos podem ocasionar um desbalanço na microbiota do hospedeiro, possibilitando o maior desenvolvimento desses fungos em um ambiente com pouca concorrência por nutrientes (CHOW *et al.*, 2008; SCHELENZ, 2008; ACHKAR; FRIES, 2010). Outro caso em que o tratamento pode acarretar em infecções por *Candida* spp. é em indivíduos portadores de câncer. A radioterapia ou quimioterapia provoca uma supressão do sistema imunológico ocasionando um desequilíbrio na microbiota normal do organismo, culminando em um desenvolvimento exagerado de *Candida* spp. (GALL *et al.*, 2013; NORGAARD *et al.*, 2013; ALNUAIMI *et al.*, 2015).

Em indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) há um favorecimento ao estabelecimento de infecções por *Candida* spp. Por possuir o sistema imunológico debilitado, o hospedeiro não consegue controlar naturalmente sua microbiota. Geralmente as infecções ocorrem na mucosa da boca, sistema gastrointestinal ou geniturinário (LORTHOLARY *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). A desordem metabólica ocasionada pelo *Diabetes mellitus* tipo 1 e 2 pode ser também outro fator de risco. Pacientes diabéticos podem apresentar uma baixa na quantidade de células de defesa e, além disso, devido aos níveis elevados de glucose sanguínea, existe um ambiente mais propício nutricionalmente ao desenvolvimento e crescimento das leveduras nos epitélios (principalmente bucal) e no sangue (BREMENKAMP *et al.*, 2011; AL MUBARAK *et al.*, 2013; SANITÁ *et al.*, 2014).

Apesar de alta frequência e morbidade, infecções superficiais de *Candida* geralmente não são letais. Em contraste, candidíase sistêmica (candidemia) está associada a uma alta taxa de mortalidade, mesmo com terapia antifúngica de primeira linha (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2016). Alguns fatores de risco contribuem para o surgimento da candidemia, dentre eles destacam-se a neutropenia, danos na mucosa gastrointestinal, cateteres venosos centrais, uso de antibióticos de amplo espectro e trauma ou cirurgia gastrointestinal (ANTINORI, *et al.*, 2016).

O mecanismo de patogenicidade de *Candida* spp., seja a forma superficial como a invasiva, pode variar de acordo com a espécie e os fatores de virulência intrínsecos a elas. Para *C. albicans*, a espécie melhor estudada, a infecção começa quando células da levedura aderem às superfícies celulares do hospedeiro por expressar adesinas. Após adesão, o fungo sofre polimorfismo projetando hifas que facilitam à penetração epitelial e difusão para os vasos sanguíneos, favorecendo a propagação de células na corrente sanguínea. Por fim, acontecem a colonização e penetração do endotélio vascular durante a doença disseminada (GOW *et al.*, 2012).

Um importante fator de virulência para *Candida* spp. é a capacidade de formar biofilmes. Biofilmes podem surgir em superfícies de metal, polímeros ou cerâmicas (materiais utilizados em sondas e cateteres), iniciando pela adesão de células planctônicas. Essas células passam a secretar carboidratos, proteínas e sinalizadores que atuam no recrutamento de mais células para o biofilme. O biofilme funciona como uma barreira física protetora contra choques mecânicos e frequentemente está associado à resistência a antifúngicos, espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio produzidas por fagócitos (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SERRANO-FUJARTE *et al.*, 2015).

2.3 Agentes antifúngicos e seus alvos

De uma maneira geral, há compostos constituintes da parede e da membrana celular de espécies do gênero *Candida* que não são encontrados em células de mamíferos. Essas moléculas acabaram se tornando bons alvos para os agentes antifúngicos (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; PHARM, 2011). Dentre esses compostos, destacam-se: (I) polímeros de carboidratos (β -glucanos, quitina) e (II) lipídeo, na forma de ergosterol (CASSONE, 2013).

Os principais antifúngicos utilizados atualmente nos tratamentos clínicos contra *Candida* spp. são da classe dos azóis (fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol), dos

polienos (anfotericina B), das fluorpirimidinas (5-flucitosina) e das equinicandinas (casposfungina e micafungina) (COWEN, 2008).

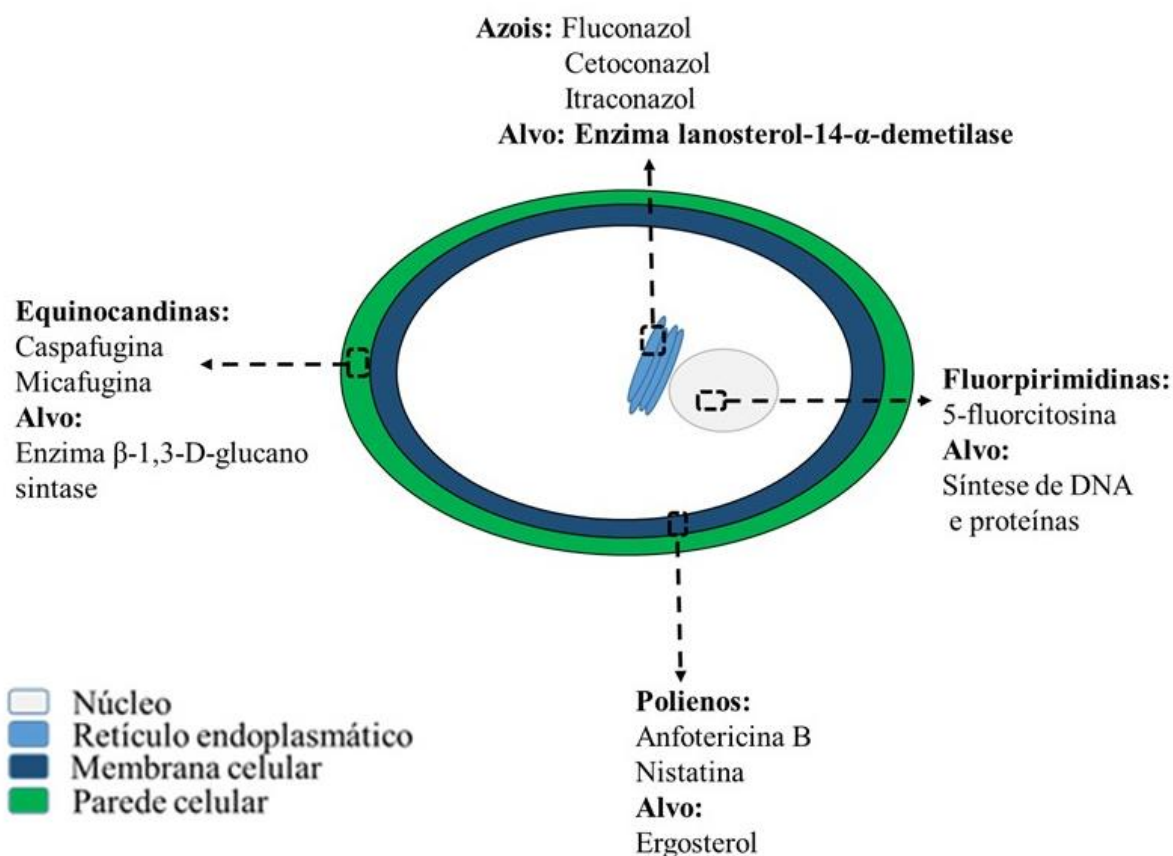
Os antifúngicos da classe dos azóis possuem a capacidade de inibir a enzima lanosterol 14- α dimetilase, que participa da rota biossintética do ergosterol, sendo responsável pela desmetilação do precursor lanosterol. Além da depleção nos níveis de ergosterol, há um acúmulo do composto 14- α -metil-3,6-diol, que é tóxico ao fungo (KANAFANI; PERFECT, 2008). Contudo, esta classe é fungistática e as células remanescentes tornam-se resistentes (FRANCOIS *et al.*, 2006; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2014). Os azóis também apresentam toxicidade dependendo da quantidade ingerida e do tempo de tratamento (SOLÍS-MUÑOZ *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2013).

Os antifúngicos da classe dos polienos atuam ligando-se diretamente ao ergosterol presente na membrana celular dos fungos. Ao se ligarem, formam uma estrutura parecida com um poro, que permite o extravasamento de componentes citoplasmáticos para o espaço extracelular, provocando morte da célula. Os polienos possuem uma grande afinidade por ergosterol. Entretanto, sua especificidade não é tão elevada, pois também se ligam ao colesterol presente na membrana celular de humanos. Polienos também podem produzir toxicidade renal quando usados por longos períodos e em altas dosagens (HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-ŁATKA, 2006).

Os compostos da classe das fluorpirimidinas (sendo a fluocitosina o mais conhecido) atuam inibindo a síntese de DNA e proteínas. A fluocitosina é transportada para o interior da célula por meio das citosinas permeases, sendo transformada em 5-fluoracil que, efetivamente, será responsável pela sua ação (ZHANG *et al.*, 2002; PALUSZYNSKI; KLASSEN; MEINHARDT, 2008).

A classe de antifúngicos do tipo equinicandinas é formada por moléculas que atuam sobre a biossíntese dos polissacarídeos da parede celular do fungo. A via de atuação desta classe de fármaco ocorre inibindo a enzima β -1,3-D-glucano sintase (GS), que catalisa a produção de β -1,3-D-glucano, o qual é o maior componente polissacarídico presente na parede do fungo. A depleção na síntese deste polissacarídeo atrapalha o crescimento celular e causa instabilidade osmótica, culminando em morte celular (GANESAN *et al.*, 2004; PFALLER *et al.*, 2011). A

Figura 2 - Esquema da localização dos alvos dos principais antifúngicos usados no tratamento clínico contra *Candida* spp.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 2 relaciona as principais classes de agentes antifúngicos utilizados nos tratamentos clínicos contra *Candida* spp. e seus alvos.

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é considerado um grande desafio. Isto pode ser atribuído a vários fatores, incluindo os problemas na identificação de um agente capaz de atuar em células eucarióticas de fungos, sem ser tóxico para as células hospedeiras, também eucarióticas. A resistência a drogas antifúngicas também é um fenômeno que vem

ganhando destaque e pode ser clinicamente definida como a persistência de sinais e sintomas da infecção, mesmo na presença de um nível tolerável da droga (DA SILVA *et al.*, 2013).

As espécies de *Candida* podem desenvolver resistência aos antifúngicos por vários mecanismos, os quais podem ocorrer de maneira isolada ou até concomitante. Normalmente, baseia-se em três processos: (1) redução da concentração do fármaco no interior da célula; (2) diminuição da afinidade ou processividade do alvo com o qual o fármaco vai interagir e (3) contra reação ao efeito causado pelo fármaco na própria célula (PERLIN, 2009; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013). Os mecanismos de resistência das principais classes de antifúngicos usados em infecções por *Candida* spp. estão listados a seguir:

- *Resistência a azóis*

- Redução do acúmulo de fármaco na porção intracelular: há um aumento na síntese das principais bombas de efluxo encontradas na *Candida* spp. Essas bombas transportam o fármaco para fora da célula (CANNON *et al.*, 2009).

- Redução da afinidade: O alvo dos antifúngicos azóis é a lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*. Já estão bem descritas na literatura mutações neste gene, diminuindo a afinidade dos azóis por esta enzima (LIU *et al.*, 2015).

- Redução do efeito ocasionado pelo fármaco: há uma superexpressão do gene *ERG11*. Além disso, também pode haver a modificação na síntese de lipídios para a membrana celular, onde o fungo deixa de sintetizar o ergosterol e passa a sintetizar outros lipídios que serão usados como substitutos (MORIO *et al.*, 2012; NOËL, 2012).

- *Resistência aos polienos*

- Contrarreação ao efeito do fármaco: ocorrem mutações nos genes *ERG3* ou *ERG6*, os quais são responsáveis por codificar enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol, alvo dos antifúngicos polienos (VINCENT *et al.*, 2013).

- *Resistência a fluorpirimidinas*

– Redução do acúmulo intracelular do fármaco: ocorre devido ao aumento na síntese de citosina-permeases (ocasionadas por mutações no gene *FCY2*), que translocam citosinas para a porção extracelular da levedura (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

- *Resistência a equinocandinas*

– Decréscimo da atividade do fármaco pelo seu alvo: ocorrem mutações pontuais nos genes que codificam o complexo β -1,3-D-glucano sintase (gene *FKS1* e/ou *FKS2*), ocasionando uma diminuição no efeito do fármaco (KATIYAR *et al.*, 2012).

Levando-se em conta então a pouca variedade de antifúngicos disponíveis e seguros, aliado ao desenvolvimento contínuo de resistência por parte de *Candida* spp. aos tratamentos disponíveis, fica evidente a necessidade de busca de novos fármacos para o tratamento da infecção destes fungos oportunistas. Uma vertente bastante promissora é a busca por biomoléculas naturais que apresentem atividade antimicrobiana. Uma grande fonte destes compostos são as plantas que, reconhecidamente, apresentam moléculas com ampla atividade farmacológica e reduzida toxicidade (PERLIN, 2011; ALVES-SILVA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2015).

2.4 Proteínas antifúngicas vegetais

As plantas estão suscetíveis a ataques de fungos e mesmo sendo desafiadas a todo momento, conseguem se defender de boa parte destas agressões, utilizando, para isto, barreiras físicas (lignina, pectina, celulose) ou biomoléculas provenientes do metabolismo secundário e/ou primário, como proteínas (HERNÁNDEZ-BLANCO *et al.*, 2007; MIURA; FURUMOTO, 2013; RATHER *et al.*, 2015).

Várias são as classes de moléculas proteicas vegetais que apresentam atividade antifúngica, podendo ser citadas: proteínas semelhantes à taumatina, defensinas, proteínas transferidoras de lipídios, snakinas 1 e 2 e proteínas tipo albuminas 2S (BERROCAL-LOBO *et al.*, 2002; AGIZZIO *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2008; ISAAC *et al.*, 2008; JHA; CHATTOO, 2010).

Os fungos, em geral, possuem constituintes semelhantes, independentemente de serem filamentosos, leveduriformes, fitopatogênicos ou de importância clínica. São dotados de parede

celular composta por carboidratos (quitina e β -glucanos) e membrana celular com ergosterol (VAN DER WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013). Diante das semelhanças entre os fungos, não é incomum encontrar proteínas vegetais que também possuam atividade contra fungos patogênicos ao homem, além da ação contra fungos fitopatogênicos.

Já é descrito na literatura que lectinas vegetais apresentam atividade contra fungos de importância clínica como, por exemplo, *Candida* spp. (KLAFKE *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014; REGENTE *et al.*, 2014), *Trichosporon* sp., *Cryptococcus* spp. e *Malassezia pachydermatis* (KLAFKE *et al.*, 2012). A atividade antimicrobiana das lectinas contra estes fungos não é bem elucidada, podendo estar relacionada ao aumento de permeabilização da membrana celular e à atividade aglutinante dessas proteínas (KLAFKE *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014; REGENTE *et al.*, 2014).

Algumas proteínas transferidoras de lipídios além de possuírem atividade contra fungos fitopatogênicos também são capazes de inibir o crescimento de leveduras patogênicas ao homem, incluindo *Candida* spp. (DIZ *et al.*, 2011; ZOTTICH *et al.*, 2011). Adicionalmente, várias outras proteínas, de diferentes classes, isoladas de vegetais demonstraram atividade antimicrobiana frente a *Candida* spp., como, por exemplo, inibidor de protease (RIBEIRO *et al.*, 2012), defensinas (GOMES *et al.*, 2008; LIN; WONG; NG, 2010; MELLO *et al.*, 2011) e um peptídeo do tipo heveína (KOO *et al.*, 2004). Albuminas 2S isoladas de sementes de *Passiflora flavicarpa* e *Capsicum annuum* inibiram o crescimento de *C. albicans* e *C. passiflora*, induzindo a permeabilização da membrana e a produção de óxido nítrico por estas leveduras patogênicas. Foi sugerido que a atividade antifúngica das albuminas 2S parece ser uma característica comum a estas proteínas, podendo ser utilizadas para desenhar futuros fármacos (RIBEIRO *et al.*, 2012).

2.4.1 Proteínas ligantes à quitina

Os vegetais possuem uma classe de proteínas que são capazes de interagir com quitina, um polissacarídeo constituído de resíduos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNac) interligados por ligação β -1,4, e/ou a seus oligômeros (ASENSIO *et al.*, 2000). Essas proteínas podem ser dotadas de um domínio NH₂-terminal ligante à quitina semelhante ao sítio encontrado na proteína heveína (sítio heveínico), não estando este sítio necessariamente presente em todas elas. Sendo mais explícito, o termo “sítio heveínico” refere-se ao domínio encontrado na

proteína heveína, uma merolectina isolada do látex da *Hevea brasiliensis* por Archer, em 1960 (THEIS; STAHL, 2004; LU *et al.*, 2012; PORTO *et al.*, 2012). Fazem parte das proteínas ligantes à quitina, proteínas de diferentes classes: lectinas; peptídeos do tipo heveína; quitinases e peptídeos semelhantes ao peptídeo antimicrobiano de *Amaranthus caudatus* (Ac-AMP) (van; XIE; GONG, 2000).

Algumas moléculas que se encaixam na classe das proteínas ligantes à quitina já foram isoladas, tais como *Ec*-CBP, obtida da casca de *Euonymus europaeus* (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002), avesina, purificada de semente da aveia (LI; CLAESON, 2003), Cy-AMP1, isolada de sementes de *Cycas revoluta* (YOKOYAMA *et al.*, 2009) e um peptídeo purificado de sementes de *Triticum kiharae* (ODINTSOVA *et al.*, 2009).

Diversas proteínas ligantes à quitina estão relacionadas à defesa vegetal, inclusive fazendo parte das proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), classe 4, que pode ser dividida em 2 subclasses, levando-se em conta à presença ou não do domínio heveínico. A subclasse 1 apresenta o sitio heveínico conservado, enquanto que na subclasse 2 ele não é encontrado (KIM *et al.*, 2014). Atividades RNásica, DNásica e antifúngica já foram descritas para proteínas ligantes à quitina, podendo ser encontradas nas 2 subclasses de PR-proteínas classe 4 (PEREIRA MENEZES *et al.*, 2014).

Lectinas ligantes à quitina são proteínas que podem se ligar a monômeros ou polímeros de GlcNac, sendo normalmente possuidoras do sitio heveínico (GIOVANINI *et al.*, 2007). Muitas dessas lectinas apresentam atividade hemaglutinante e podem se ligar a mais de um tipo de carboidrato (SAMPIETRO *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013). Várias lectinas ligantes à quitina são capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos. Trindade e colaboradores (2006) avaliaram o efeito antifúngico das lectinas isoladas de sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*. Ambas apresentaram efeito inibitório sobre a germinação dos esporos de *Fusarium moniliforme*. A lectina obtida de rizomas de *Setcreasea purpurea* inibiu a germinação dos esporos e o crescimento micelial dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium italicum* e *Helminthosporium maydis* (YAO *et al.*, 2010).

Quitinases vegetais também são consideradas proteínas ligantes à quitina. Possuem a capacidade de hidrolisar quitina em resíduos de GlcNac (SANTOS *et al.*, 2004). Algumas quitinases também apresentaram atividade contra fungos fitopatogênicos. Uma quitinase purificada das folhas de *Ananas comosus* demonstrou efeito inibitório frente ao

desenvolvimento micelial de *Trichoderma viride* (TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005). Uma quitinase isolada das sementes das *Vicia faba* mostrou-se efetiva em inibir o crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium solani*, *Physalospora piricola*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (WANG *et al.*, 2012). Mais recentemente, Zhang e colaboradores (2013) encontraram uma quitinase na polpa do *Diospyros kaki* capaz de inibir o desenvolvimento micelial do fungo *T. viride*.

Da mesma forma que várias outras proteínas vegetais detentoras de atividade contra fungos fitopatogênicos, proteínas ligantes à quitina também possuem a capacidade de inibir o desenvolvimento de fungos patogênicos ao homem. Koo e colaboradores (2004) mostraram que um peptídeo obtido das sementes de *Pharbitis nil*, com capacidade de interagir com quitina, inibiu o crescimento de *C. albicans* por meio de despolarização da membrana celular do fungo. Já a lectina ligante à quitina isolada do látex de *H. brasiliensis* foi eficaz na inibição de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (KANOKWIROON *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi descoberto nas folhas de *Schinus terebinthifolius* uma lectina com afinidade à quitina capaz de inibir o desenvolvimento de *C. albicans* (GOMES *et al.*, 2012).

Com base na atividade antifúngica frente a *Candida* spp. vinculada a diversas proteínas de plantas e, em especial, àquelas capazes de se ligar à quitina, é notável o potencial dos vegetais como uma fonte promissora de novos compostos a serem empregados na terapia clínica.

2.5 *Moringa oleifera* Lamarck

A espécie *M. oleifera*, chamada também de *M. pterygosperma* Gaertn, trata-se de uma planta oriunda da região nordeste da Índia, sendo conhecida nesta localidade como “drumstick tree”. Possui ampla distribuição global, sendo encontrada principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Em conjunto com outras 13 espécies, é membro da família Moringaceae (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; BEN SALEM; MAKKAR,

Figura 3 – *Moringa oleifera* e suas partes constituintes.



Fonte: Próprio autor

A – Árvore de *M. oleifera*. B – Folhas e fruto maduro. C – Flores. D – Sementes maduras. E – Amêndoas de sementes de *M. oleifera*.

2009). No Brasil, a introdução inicial desta árvore ocorreu em meados da década de 1950, sendo disseminada principalmente na região Nordeste, onde é chamada de lírio-branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (LORENZI; MATOS, 2002).

A *M. oleifera* é uma árvore decídua, apresentando estatura média entre 10 e 12 m de altura. Possui uma copa rala, suas folhas são bipinadas e as flores de coloração amarelo-pálida. O seu caule é predominantemente delgado, com uma casca grossa e cinza. Os frutos da *M. oleifera* são do tipo cápsula, de aproximadamente 35 cm de comprimento, assemelhando-se a uma vagem com seção triangular, e as sementes são trialadas (LORENZI; MATOS, 2002).

A classificação taxonômica da *M. oleifera* encontra-se descrita a seguir:

- Reino: Plantae
- Sub-reino: Tracheobionta
- Superdiversão: Spermatophyta
- Divisão: Magnoliophyta (Angiosperma)
- Classe: Magnoliopsida (Dicotiledonea)
- Ordem: Brassicales
- Família: Moringaceae
- Gênero: *Moringa*
- Espécie: *Moringa oleifera*

Todas as partes desta árvore são consideradas comestíveis, sendo utilizadas como fonte de nutrientes pelo homem (SREELATHA; PADMA, 2009; WADHWA *et al.*, 2013). As folhas de *M. oleifera* são abundantes em cálcio, fósforo, potássio, ferro, vitaminas A, C e D, aminoácidos essenciais, β -caroteno e flavonoides (AMAGLO *et al.*, 2010; GOWRISHANKAR *et al.*, 2010; LUQMAN *et al.*, 2012). Tal árvore também é fonte de proteínas de excelente digestibilidade. Devido a riqueza nutricional inerente à *M. oleifera*, existe um interesse em difundir seu cultivo em países subdesenvolvidos como uma alternativa no combate às altas taxas de desnutrição (WADHWA *et al.*, 2013).

Apesar de seus atributos nutricionais já bem estudados e comprovados, no Brasil a *M. oleifera* é mais conhecida pela propriedade purificadora da água que suas sementes apresentam, a qual é muito explorada no sertão do Nordeste (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Acredita-se que este efeito purificador esteja relacionado a agentes floculantes presentes nessas sementes, sendo estes, em sua maioria, proteínas catiônicas

(NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Estudos prévios relataram o isolamento de uma pequena proteína das sementes de *M. oleifera* apresentando um ponto isoelétrico em torno de 10 e demonstrando atividade coagulante (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). SANTOS e colaboradores (2009) obtiveram do extrato salino das sementes de *M. oleifera* uma lectina denominada cMoL, com atividades coagulante e hemaglutinante frente a eritrócitos de coelho e do homem. Esta lectina também apresentou-se como uma proteína básica (LUZ *et al.*, 2013). Em nosso grupo de pesquisa, foram isoladas duas proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominadas de *Mo-CBP*₃ e *Mo-CBP*₄, que demonstraram atividade coagulante. Estas proteínas também apresentaram caráter básico com pontos isoelétricos variando de 10,5 a 10,8 (GIFONI *et al.*, 2012).

2.5.1 Efeitos farmacológicos

Na literatura, estão descritos diversos efeitos farmacológicos associados à *M. oleifera* e praticamente todas as partes desta planta são utilizadas popularmente para tratar alguma enfermidade. As folhas, por exemplo, são vastamente usadas para tratar doenças cardiovasculares. Chumark e colaboradores (2008) mostraram que o extrato aquoso obtido das folhas de *M. oleifera* preveniu o surgimento de placas ateroscleróticas, além de ter demonstrado atividades antioxidante e hipolipidêmica em coelhos alimentados com uma dieta rica em gordura. Adicionalmente, foram isoladas moléculas do extrato etanólico das folhas de *M. oleifera* com capacidade de diminuir a pressão sanguínea em ratos (GILANI *et al.*, 1994).

Extrato aquoso das folhas de *M. oleifera*, quando administrado em ratos diabetizados com estreptozotocina, se mostrou também capaz de diminuir a glicemia, além de reduzir os níveis de glucose e proteína excretadas na urina (JAISWAL *et al.*, 2009). Este extrato também apresentou efeito protetor frente à retinopatia relacionada ao diabetes em ratos (GUPTA *et al.*, 2012). Yassa e Tohamy (2014) observaram que este mesmo extrato quando ingerido por ratos com diabetes foi capaz de aumentar a secreção de insulina no sangue, assim como de prevenir alterações morfológicas nas ilhotas de Langerhans. Além disso, foi observada uma diminuição nos níveis de radicais livres nos animais tratados com o extrato quando em comparação com os não tratados. Alguns compostos secundários como *N*-benzil-tiocarbamato, *N*-benzil-carbamato, benznitrila e um benzil éster obtidos da extração metanólica de frutos também demonstraram

possuir atividade hipoglicemiante, atuando como agentes secretagogos, estimulando a liberação de insulina nas células- β pancreáticas de roedores (FRANCIS *et al.*, 2004).

Para folhas e raízes da *M. oleifera*, já foi relatada ação antiespasmódica (GILANI *et al.*, 1994). Além disso, o extrato etanólico da casca da raiz de *M. oleifera*, por via oral, apresentou potencial efeito antiulcerogênico em ratos (CHOUDHARY; BODAKHE; GUPTA, 2013). Efeito hepatoprotetor também foi observado nas raízes, folhas e flores de *M. oleifera* (GILANI *et al.*, 1994; PAL; MUKHERJEE; SAHA, 1995; RUCKMANI *et al.*, 1998). Hamza (2010) mostrou que o extrato etanólico das sementes de *M. oleifera* inibiu a formação de danos no fígado de ratos, em modelo de fibrose hepática, além de inibir o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Extratos hidroetanólico de flores e folhas também mostraram efeito hepatoprotetor (FAKURAZI; SHARIFUDIN; ARULSELVAN, 2012).

Extrato aquoso e lectinas isoladas das sementes desta planta mostraram possuir efeito citotóxico em ensaios *in vitro* utilizando as linhagens celulares NCI-H292 (carcinoma pulmonar humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana), não demonstrando efeito hemolítico para eritrócitos humanos (ARAÚJO *et al.*, 2013). Jung (2014) observou que ao aplicar o extrato aquoso das folhas, *in vitro*, sobre células cancerígenas de pulmão humano, a proliferação era inibida. Foi, ainda, observada uma baixa citotoxicidade para células humanas normais e alta citotoxicidade para células da linhagem cancerígena. Em adição, extrato hidroetanólico das folhas da *M. oleifera* mostrou atividade citotóxica *in vitro* frente a células HeLa em concentrações dose dependentes, sendo observada baixa citotoxicidade para células humanas (JAFARAIN; ASGHARI; GHASSAMI, 2014).

M. oleifera também é conhecida na medicina popular por tratar várias indisposições relacionadas à dor e inflamação. Sashidhara e colaboradores (2009) descobriram dois compostos relacionados às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória no extrato alcoólico das raízes. Extrato metanólico das raízes e folhas, separadamente ou em conjunto, foram capazes de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica em modelo de artrite induzida em ratos, mostrando potencial antiartrítico (MANAHEJI *et al.*, 2011). Em extratos obtidos de sementes, usando etanol ou etil-acetato, foi encontrada atividade antipirética para ratos (HUKKERI *et al.*, 2006). Mahajan e Mehta (2010) observaram no extrato etanólico das sementes a presença de atividade imunossupressora, suprimindo a resposta humoral e diminuindo a atividade fagocítica de macrófagos. No extrato hidroalcoólico dos frutos, foi relatada atividade antinociceptiva

central (SHARMA *et al.*, 2012). Em nosso grupo de estudo, foram testados os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo de *Mo*-CBP₄, tendo sido obtido resultados interessantes quanto à analgesia e a inibição da migração de leucócitos em camundongos, em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. As atividades encontradas foram obtidas quando a proteína foi administrada por via intraperitoneal e/ou oral (PEREIRA *et al.*, 2011).

2.5.2 Atividade antifúngica

É relatada na literatura a atividade antifúngica de diferentes partes da *M. oleifera* para fungos fitopatogênicos. Extratos aquosos obtidos a partir de raízes, folhas e cascas do fruto demonstraram atividade inibitória para a germinação de esporos e o crescimento vegetativo dos seguintes fungos: *F. oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* (MOHAMEDY; ABDALLA, 2014). Nkya e colaboradores (2014) coletaram folhas, raízes, sementes, casca do caule, casca da raiz e flores. Com cada parte, foram produzidos extratos à base de éter de petróleo, etil-acetato ou metanol, e sua ação antifúngica testada frente à *Gibberella xylarioides*. Todos os extratos testados foram capazes de inibir a germinação dos esporos desse fungo. Extrato metanólico dos frutos de *M. oleifera* também foi capaz de inibir o crescimento vegetativo de *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp. em placas de Petri. A menor concentração a apresentar inibição foi a de 100 µg por disco (SAYEED *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa testou a atividade antifúngica da proteína ligante à quitina isolada de sementes de *M. oleifera*, *Mo*-CBP₃, e constatou sua atividade inibitória para os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides*. Tal atividade parece estar relacionada ao aumento da permeabilização da membrana plasmática, à produção de espécies reativas de oxigênio e à desorganização do citoplasma do fungo. *Mo*-CBP₃ apresentou ação fungistática ou fungicida, de acordo com a concentração testada (GIFONI *et al.*, 2012).

Em relação aos fungos patogênicos ao homem, sabe-se que *M. oleifera* é utilizada na medicina popular para tratar micoses de pele como “pé-de-atleta” e “tínea” (CHUANG *et al.*, 2007). Na literatura, foi relatado que o óleo essencial das folhas, assim como o extrato etanólico das sementes de *M. oleifera* foram capazes de inibir o crescimento de fungos dermatófitos como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Quando tratados com o extrato etanólico

das sementes, após 24 h, os fungos demonstraram ter ruptura na membrana plasmática e danos nos componentes intracelulares com conseqüente morte celular (CHUANG *et al.*, 2007).

Além de trabalhos relacionados aos fungos dermatófitos, existem estudos demonstrando a presença de substâncias em *M. oleifera* relacionadas à inibição do crescimento de leveduras patogênicas ao homem. Devendra e colaboradores (2011) observaram que o extrato clorofórmico da casca da vagem era capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*. Compostos isolados a partir do extrato apresentaram atividade similar àquela observada no extrato total frente à *Candida* (NIKKON *et al.*, 2003). Patel e colaboradores (2014) também relataram que o extrato etanólico obtido das folhas da *M. oleifera* foi capaz de inibir o crescimento de *C. tropicalis*, mas não o crescimento de *C. albicans*. Mais recentemente, foi testado o efeito antibiofilme de flavonoides extraídos da casca de sementes de *M. oleifera*, utilizando *C. albicans*. Estes compostos, além de inibir o crescimento dessa levedura de forma similar a antifúngicos padrões, foram capazes de interferir, ou mesmo interromper, com a formação de biofilmes produzidos por *C. albicans* (ONSORE; ARORA, 2015).

Embora as propriedades antifúngicas das sementes de *M. oleifera* sejam conhecidas e difundidas pela medicina popular, esta ação pouco é atribuída aos seus constituintes proteicos. Este fato é contraditório, já que as sementes possuem um teor proteico médio de 40%. Além disso, já foi estudado, inclusive por nosso grupo de pesquisa, que proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *M. oleifera* possuem potencial inibitório frente a fungos fitopatogênicos. Diante do exposto, as seguintes perguntas foram formuladas:

- *Proteínas de sementes de M. oleifera apresentam ação contra leveduras relacionadas a patogenias humanas, como Candida spp.?*
- *Se positivo, que estratégia experimental poderia ser utilizada para obtenção de, pelo menos, uma proteína pura ativa contra Candida spp.?*
- *Quais características bioquímicas seriam inerentes a essa proteína?*
- *De que maneira essa proteína poderia atuar, resultando em sua ação antifúngica?*

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Neste trabalho, formulou-se a seguinte hipótese:

“*Mo*-CBP₂, membro de uma família de proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera*, possui propriedades bioquímicas semelhantes a outras do mesmo grupo e, ainda, exibe atividade antifúngica contra *Candida* spp. Assim, esta proteína se constitui em uma ferramenta potencial a ser utilizada no desenvolvimento de novas estratégias eficazes no combate a leveduras do tipo *Candida* spp.”.

3.2 Objetivo geral

Purificar e determinar propriedades bioquímicas de *Mo*-CBP₂, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera* e, ainda, avaliar sua atividade antifúngica contra *Candida* spp.

3.3 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo para purificação da *Mo*-CBP₂;
- Caracterizar a proteína pura quanto à massa molecular, número de subunidades, ponto isoelétrico, sequência aminoacídica, presença de carboidratos em sua estrutura, capacidade de oligomerização e atividade hemaglutinante;
- Avaliar a atividade antifúngica da proteína frente a cepas ATCC e isolado clínico de diferentes espécies de *Candida*, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM₅₀);
- Investigar o modo de ação antifúngica da *Mo*-CBP₂, buscando seus possíveis alvos celulares.

4 MATERIAL

4.1 Material biológico

4.1.1 Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas de frutos maduros oriundos de árvores localizadas no Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da referida universidade, sob o número EAC34591.

4.1.2 Leveduras

Leveduras das espécies *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida tropicalis* (isolado clínico) foram obtidos da micoteca do Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes – LAPERE, Departamento de Patologia, UFC.

4.1.3 Animais

Um coelho da raça Nova Zelândia foi adquirido no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC. O coelho foi mantido no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, com água e ração *ad libitum*.

4.2 Reagentes químicos e outros materiais

Os reagentes Tris (hidroximetil) aminometano, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, “Coomassie Brilliant Blue” R-250 e G-250, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol foram obtidos da Sigma Aldrich-Co (St. Louis, MO, EUA). A matriz cromatográfica CM Sepharose™ *Fast Flow* e os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular foram obtidos da GE HeathCare (Uppsala, Suécia). O meio de cultura batata dextrose

foi obtido da Kasvi (Curitiba, PR, Brasil). Os demais reagentes usados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5 MÉTODOS

5.1 Purificação da *Mo*-CBP₂, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*

Para purificação da *Mo*-CBP₂, foi utilizado o protocolo descrito a seguir. As sementes foram obtidas de frutos maduros, destegumentadas manualmente e as amêndoas submetidas ao processo de trituração em liquidificador e, em seguida, em moedor de café comercial. A farinha resultante foi delipidada usando *n*-hexano, na proporção de 1:10 (m/v). Para extração das proteínas, 30 g de farinha delipidada foram homogeneizados em 300 mL de tampão de extração Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e mantidos sob leve agitação por 4 horas, a 4 °C. A suspensão foi filtrada em tecido de trama fina, seguida de centrifugação a 15.000 x *g*, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi posteriormente filtrado em papel filtro e o filtrado obtido chamado de extrato total. O extrato total foi dialisado contra água destilada por 5 dias, com 3 trocas diárias, e centrifugação (15.000 x *g*, por 30 minutos, a 4 °C) em dias alternados, até a completa separação das porções insolúvel (globulina) e solúvel (albumina). Após remoção completa da porção insolúvel, a albumina foi congelada e liofilizada.

Uma amostra de 1,0 g de albumina foi solubilizada em 30 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina (192,3 mL; 3,5 x 20,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão de solubilização da amostra. As proteínas não retidas foram obtidas da matriz usando tampão de equilíbrio em um fluxo contínuo de 30 mL/hora. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com solução de ácido acético 0,05 M, em fluxo de 60 mL/hora, e frações de 4,5 mL foram coletadas. A eluição das proteínas foi monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético foi dialisado contra água, liofilizado e denominado P_{AC}.

Uma amostra (400 mg) do P_{AC} foi solubilizada em 20 mL do tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e aplicado em matriz de troca iônica CM Sepharose™ *Fast Flow* previamente equilibrada com o tampão de solubilização da amostra. A eluição das proteínas que não interagiram com a matriz foi realizada utilizando o tampão de equilíbrio, enquanto que as proteínas retidas foram eluídas com esse mesmo tampão acrescido de NaCl 0,4 M, 0,5 M ou 0,6 M. A cromatografia foi realizada em fluxo contínuo de 45 mL/hora, coletando-se frações de 4,5 mL. A proteína alvo correspondeu ao segundo pico cromatográfico, cuja eluição foi

realizada com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,4 M. A proteína foi nomeada de *Mo*-CBP₂ (*Mo*: *Moringa oleifera*, CBP: “Chitin Binding Protein”). O esquema completo de purificação está representado na Figura 3.

5.2 Quantificação das proteínas solúveis

As proteínas solúveis foram quantificadas como descrito por Bradford (1976). Cem microlitros de amostra em diferentes concentrações receberam 2,5 mL de reagente de Bradford. A solução foi agitada e depois deixada em repouso por 10 minutos. Leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S12) a 595 nm. A concentração proteica foi mensurada a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

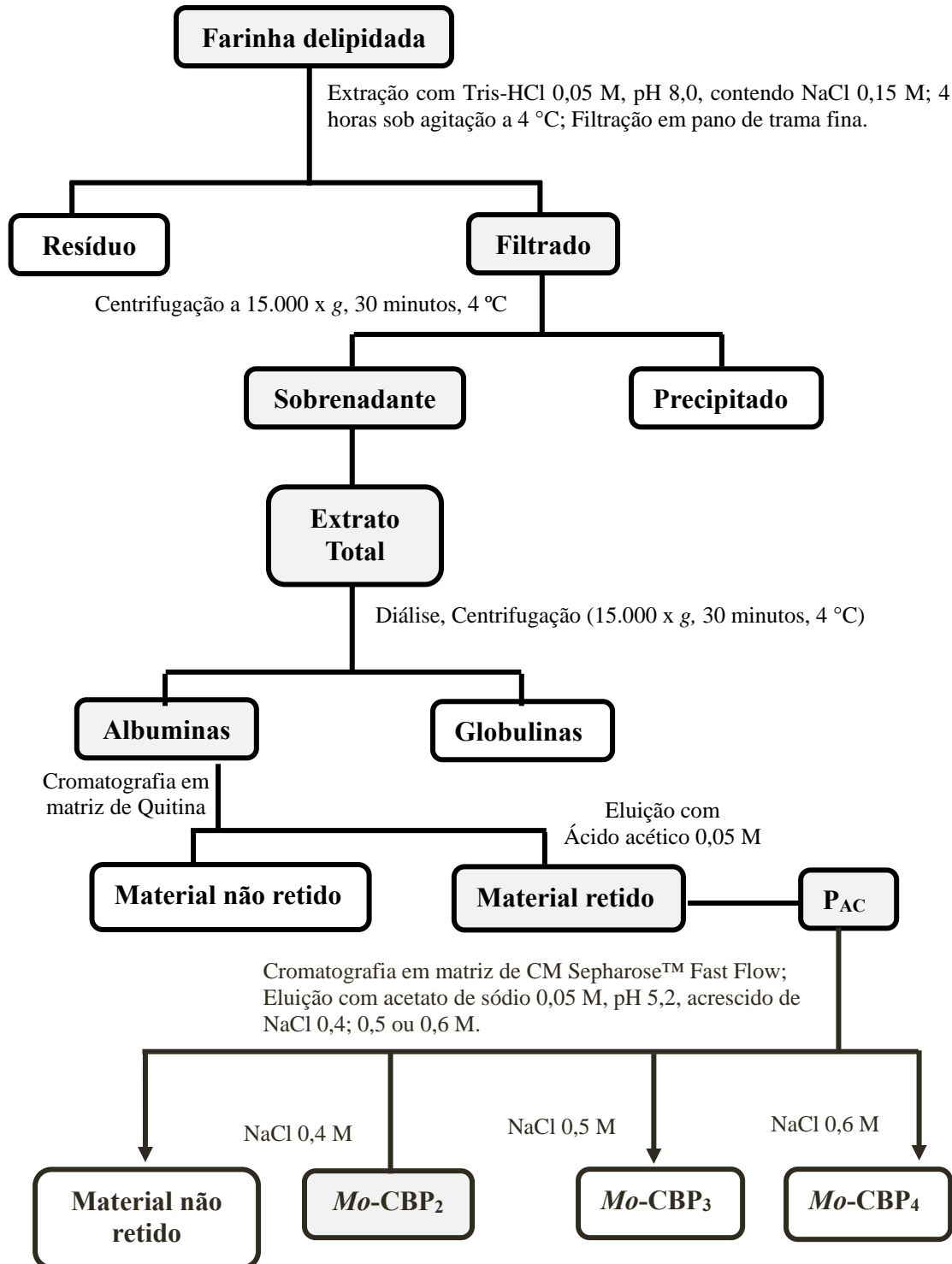
5.3 Caracterização bioquímica da *Mo*-CBP₂

5.3.1 Determinação da massa molecular e da presença de subunidades por eletroforese em gel de poli(acrilamida em condições desnaturantes) (PAGE-SDS)

Com intuito de analisar o grau de pureza da *Mo*-CBP₂, bem como de verificar se esta proteína seria composta por subunidades, foi realizada eletroforese em condições não redutora e redutora, respectivamente, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), com adaptação para placas de 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e SDS 1,0%, preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8. O gel de separação continha 15,0% de acrilamida e SDS 1,0%, preparado em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Alíquotas de 10 µL, contendo 1 µg de proteína, foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, acrescido de SDS 1%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,1%), na proporção 1:2 (v/v). A amostra foi agitada e centrifugada a 5.000 x g, por 10 minutos, a 25 °C e, em seguida, aplicada nos poços da placa.

Para avaliação da presença de subunidades, alíquotas de 10 µL, contendo 1 µg de proteína, foram submetidas a dois tratamentos distintos. O primeiro consistiu da incubação da *Mo*-CBP₂ com β-mercaptoetanol 2, 4, 6 ou 8%, por 4 horas, a 100 °C. No segundo tratamento, *Mo*-CBP₂ foi incubada com DTT 0,001, 0,01 ou 0,1 M e submetida às mesmas condições. Após aquecimento, as amostras foram resfriadas e incubadas com iodoacetamida

Figura 4 - Esquema de purificação da *Mo*-CBP₂, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*



(IAA) 0,002, 0,02 e 0,2 M, respectivamente, e mantidas protegidas da luz por 45 minutos. Antes da aplicação no gel, as amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, acrescido de SDS 1%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,1%), na proporção 1:2 (p/v).

A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (Hoefer, SE250), em condições de 200 V, 20 mA e 10 W, por um período de 50 minutos. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa); albumina sérica bovina (67,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica bovina (30,0 kDa); inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). A visualização das bandas proteicas foi realizada através de coloração por “Coomassie Brilliant Blue R-250” 0,025%, dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0 v/v/v), durante um período aproximado de 2 horas. Em seguida, foi procedido o descolorimento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0 v/v/v).

5.3.2 Determinação da presença de subunidades por eletroforese em Tricina-SDS-PAGE

Com intuito de analisar o perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ em condições redutoras mais drásticas, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida seguindo a metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987). Para tanto, 6 μ g de proteína foram tratados com DTT 0,1 M e submetidos a tratamento térmico a 100 °C, por 4 horas. Após aquecimento, a proteína foi resfriada e incubada com IAA 0,2 M em ambiente protegido da luz. Em seguida, β -mercaptoetanol em concentração final de 4% foi colocado em contato com a proteína e a solução foi aquecida novamente a 100 °C, por 10 minutos. Antes da aplicação das amostras no gel, *Mo*-CBP₂ foi preparada adicionando-se tampão de amostra (Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8 acrescidos de SDS 4%, “Coomassie Brilliant Blue” G-250 10% e água Milli-Q), seguida de centrifugação a 5.000 x g, por 10 minutos, a 25 °C.

A corrida foi realizada em sistema vertical (MiniVE Vertical Electrophoresis System, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), em condições de 200 V, 20 mA e 10 W, por um período aproximado de 7 horas. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: mioglobina (16,9 kDa), mioglobina I+II (14,4 kDa), mioglobina I+III (10,6 kDa), mioglobina I (8,2 kDa), mioglobina II (6,2 kDa), glucagon (3,5 Da) e mioglobina III (2,5 kDa). A visualização das bandas proteicas foi realizada através da coloração com “Coomassie Brilliant

Blue” G-250 0,025% dissolvido em ácido acético 10%, durante um período aproximado de 2 horas, seguido de descoramento com solução de ácido acético 10%.

5.3.3 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição nativa

Mo-CBP₂ foi submetida a uma eletroforese nativa para proteínas básicas, seguindo a metodologia descrita por Reisfield e colaboradores (1962), adaptada para placas de 10,0 x 8,0 cm. O gel de separação encerrava 12,5% de acrilamida, preparado em tampão acetato de potássio 1,5 M, pH 4,3, utilizando glicerol 50% ao invés de água. A solução utilizada nas câmaras catódica e anódica foi tampão β-alanina-ácido acético, pH 4,5. A amostra (1 mg/mL) foi solubilizada em tampão de amostra (acetato de potássio 0,25 M, pH 6,8, contendo glicerol 50% e azul de metileno) e, em seguida, centrifugada a 5.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. A corrida foi realizada em sistema vertical (Hofer, SE250), a 160 V, 30 mA e 10 W, por um período de 5 horas, 4 °C. Ao final, as bandas proteicas foram visualizadas como descrito no item 5.3.1.

5.3.4 Determinação do ponto isoelétrico (pI) por eletroforese bidimensional (PAGE-2D)

Para determinação do ponto isoelétrico, *Mo*-CBP₂ foi submetida à eletroforese bidimensional de acordo com Görg e colaboradores (2000). Inicialmente, uma fita de gel do tipo “Immobiline Dry Strip” (11 cm, pH 6-11; GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foi reidratada com uma solução de reidratação (ureia 6 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 2%, IPG Buffer pH 3-10 2% e azul de bromofenol 0,002%) contendo 150 µg de *Mo*-CBP₂, totalizando um volume final de 250 µL. A focalização isoelétrica foi realizada utilizando-se o equipamento Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), sob as seguintes condições: 1 hora a 200 V; 1,5 horas a 500 V; 2,5 horas a 5.000 V e 5,5 horas a 10.000 V. Após a eletrofocalização, a fita de gel foi equilibrada em tampão de equilíbrio contendo DTT 2,5%, por 15 minutos, seguido de iodoacetamida 7,5%. A fita foi então submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes, adaptada para o uso de placas (16 x 18 cm). A corrida em segunda dimensão foi realizada em sistema Hofer SE 600 Ruby (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), a 250 V e 30 mA, por aproximadamente 8 horas. Foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa); albumina sérica bovina

(67,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica bovina (30,0 kDa); inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). Para visualização dos “spots”, o gel foi corado com “Coomassie Brilliant Blue G-250”, de acordo com a metodologia descrita por Candiano e colaboradores (2004). Em seguida, o gel foi digitalizado em “scanner” ImageScanner II (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e o programa ImageMaster 2D Platinum v 5.0 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) utilizado para determinação do ponto isoelétrico.

5.3.5 Determinação da massa molecular e avaliação da influência do pH sobre o perfil de eluição da Mo-CBP₂ através de cromatografia de exclusão molecular

Para determinação da massa molecular da Mo-CBP₂, foi realizada cromatografia de exclusão molecular utilizando a matriz Superdex 75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), acoplada a um sistema FPLC ÄKTAprime plus (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Inicialmente, a matriz foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5, acrescido de NaCl 0,4 M e, em seguida, a coluna foi calibrada utilizando o “Kit Gel Filtration Calibration” (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Como marcadores de massa molecular, foram utilizados aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa), ovalbumina (44,0 kDa) e albumina sérica bovina (66,0 kDa) (Sigma Aldrich Co., MO, EUA). O volume morto da matriz foi calculado com base no volume de eluição do “blue dextrano” (2.000 kDa). Dois miligramas de cada marcador, bem como da Mo-CBP₂, foram solubilizados separadamente em 1 mL de tampão de equilíbrio. Para o “blue dextrano”, 3 mg foram solubilizados no mesmo tampão. Todas as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e aplicado na matriz, utilizando um “loop” de 1 mL. A corrida cromatográfica foi realizada a fluxo constante de 0,5 mL/minuto e foram coletadas frações de 1 mL.

Para avaliar a influência do pH sobre o perfil de eluição da Mo-CBP₂, a proteína foi submetida novamente à cromatografia de exclusão molecular, desta vez, variando-se o tampão de equilíbrio da coluna. Foram utilizados os tampões acetato de sódio 0,025 M, pH 5,2 e borato de sódio 0,025 M, pH 10,0, ambos acrescidos de NaCl 0,4 M. Após o equilíbrio da coluna, 2 mg da Mo-CBP₂ foram solubilizados nos referidos tampões, centrifugados e aplicados na coluna conforme mencionado anteriormente.

Todas as corridas cromatográficas foram acompanhadas por medidas espectrofotométricas a 280 nm.

5.3.6 Determinação da massa molecular real por espectrometria de massas

Com o intuito de verificar o grau de pureza da *Mo*-CBP₂, bem como determinar com maior exatidão sua massa molecular, foi realizada uma análise do tipo ESI-TOF em espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), com a proteína em sua forma íntegra. Para isto, *Mo*-CBP₂ foi primeiramente submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Symmetry[®], 5 µm, 4,6 mm × 250 mm), acoplada a um sistema HPLC (LC 2000, Jasco International Co., Japão). Para eluição das proteínas retidas na coluna, foram utilizadas diversas combinações entre os tampões A (ácido trifluoroacético – TFA 0,1% + acetonitrila – ACN 2%) e B (TFA 0,1% + ACN 80%). Tais combinações foram as seguintes: 100% de A e 0% de B por 6 minutos; 65,6% de A e 34,4% de B por 3 minutos; 51,4 % de A e 48,6% de B por 3 minutos; 47,1% de A e 52,9% de B por 3 minutos; 3% de A e 97% de B por 6 minutos; 2% de A e 98% de B por 6 minutos e 0% de A e 100% de B por 4 minutos. A cromatografia ocorreu sob fluxo contínuo de 0,5 mL/minuto. Foram coletadas frações de aproximadamente 0,2 mL. Os picos obtidos foram submetidos a eletroforese conforme descrito no item 5.3.1 e, após identificação do pico correspondente à proteína de interesse, esta foi submetida a análise por espectrometria de massas. Os espectros de *Mo*-CBP₂ foram processados usando uma técnica de entropia máxima (MaxEnt).

5.3.7 Detecção e quantificação de carboidratos

Para avaliar se *Mo*-CBP₂ seria uma glicoproteína, foi utilizada a metodologia descrita por Freitas e colaboradores (2011), com modificações. Inicialmente, foi realizada uma PAGE-SDS (15%), na qual foram aplicados fetuína (30 µg) como controle positivo e *Mo*-CBP₂ (15 µg). Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado com solução de ácido acético 7,5%, por 2 horas. Em seguida, o gel foi submerso em uma solução de ácido periódico 0,2%, durante 45 minutos, 4 °C e depois, tratado com reagente de Schiff (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) por 45 minutos, 4 °C, em ambiente protegido da luz.

Para quantificação do teor de açúcar redutor na proteína, foi utilizada a metodologia descrita por Dubois e colaboradores (1956), utilizando-se D-glucose como padrão.

5.3.8 Determinação da massa molecular após deglicosilação

Com o intuito de verificar a diferença entre as massas da *Mo*-CBP₂ com e sem a porção glicídica, a proteína foi submetida a um processo de deglicosilação utilizando o kit Edegly (Sigma). Uma alíquota de 15 µL de *Mo*-CBP₂ (2,7 mg/mL) foi posta em contato com 5 µL do tampão de deglicosilação. Posteriormente foram adicionados 0,5 µL de cada enzima do kit (PNGase F, O-glicosidase, α-2-neuraminidase, β-1,4-galactosidase e β-N-acetilglucosaminidase). A combinação das enzimas à proteína foi incubada durante 3 dias à 37 °C para garantir a completa reação. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo fetuína disponível no kit. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes, como descrito no item 5.3.1. Amostras da *Mo*-CBP₂ e fetuína íntegras foram utilizadas na eletroforese para comparação das massas moleculares.

5.3.9 Determinação da sequência NH₂-terminal

Para obtenção da sequência de aminoácidos NH₂-terminal da *Mo*-CBP₂, foi utilizado um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, PPSQ-23A), baseado no princípio de degradação de Edman. Os derivados feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 2,5 mm), conduzida em condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de aminoácidos obtida foi submetida à análise comparativa através do sistema NCBI-BLAST (“National Center for Biotechnology Information” – “Basic Local Alignment Search Tool”).

5.3.10 Obtenção da sequência de peptídeos trípticos por espectrometria de massas

Espectrometria de massas ESI-Q-TOF MS/MS foi utilizada para obtenção de peptídeos trípticos da *Mo*-CBP₂. Para isso, 50 µL de uma solução 1 mg/mL da proteína em ácido fórmico 1% foi aquecida a 80 °C, por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 2,5 µL de DTT 0,1

M e incubado a 60 °C, por 20 minutos. Posteriormente, 2,5 µL de iodoacetamida 0,3 M foi adicionada à solução, protegendo-a da luz. Após o procedimento de redução, a proteína foi submetida à digestão utilizando tripsina modificada (Promega), na proporção 1:100 (enzima:proteína), por 12 horas. Alíquotas de 5 µL da amostra contendo *Mo*-CBP₂ digerida foram aplicadas no espectrômetro de massas. Os espectros gerados foram analisados usando o programa Mass Lynx™ (Waters), onde os dados obtidos de MS e MS/MS foram processados e submetidos ao programa de buscas Protein Lynx Global Server. Foi realizada uma análise comparativa das sequências dos peptídeos obtidos com proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”), usando a ferramenta de busca BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As proteínas que demonstraram melhor percentual de identidade foram selecionadas, alinhadas com o auxílio do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e analisadas.

5.3.11 Determinação da atividade hemaglutinante

O ensaio para avaliar a capacidade hemaglutinante da *Mo*-CBP₂ foi realizado seguindo o protocolo descrito por Cui e colaboradores (2014), com modificações. Alíquotas de 100 µL (1 mg/mL) da *Mo*-CBP₂ solubilizada em NaCl 0,15 M foram aplicadas em microplacas de 96 poços e submetidas a diluições seriadas em NaCl 0,15 M. Em seguida, 100 µL de uma suspensão (4%) de hemácias de coelho em NaCl 0,15 M, tratada ou não com a enzima proteolítica tripsina, foram aplicados em cada poço. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 horas, sendo as análises do ensaio realizadas com 1 e 24 horas após incubação da proteína com a suspensão de eritrócitos. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da proteína ainda capaz de aglutinar hemácias. A atividade específica foi calculada a partir da relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteína (mg/mL).

5.4 Atividade antifúngica da *Mo*-CBP₂ contra *Candida* spp.

5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

O teste de susceptibilidade de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o documento M27-A3 do “Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI” (CLSI, 2008), com modificações. Para o ensaio, foi utilizado o meio de cultura caldo batata-dextrose. Nistatina (22,23 – 0,085 μM) (EMS, Pharma) e *Mo*-CBP₂ (37,9 – 0,1 μM) foram dissolvidas em água grau Milli-Q estéril.

Para realização dos ensaios, células de leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) foram inicialmente cultivadas em meio caldo batata-dextrose (pH 5,1), por 24 horas. Após este período, uma alíquota de cada inóculo foi transferida para placas contendo meio ágar batata-dextrose e, então, cultivadas por 24 horas. Posteriormente, foram preparadas suspensões iniciais de cada inóculo em NaCl 0,15 M até atingir o ponto 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram então diluídas 1000 vezes para obtenção de inóculos finais em uma faixa de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. Uma alíquota de 100 μL de cada suspensão foi aplicada nos poços contendo 50 μL de solução de Nistatina ou *Mo*-CBP₂ em diferentes concentrações e 50 μL de meio caldo batata dextrose em concentração equivalente a 4 vezes àquela recomendada pelo fabricante. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a avaliação do crescimento das leveduras foi realizada nos tempos 0 e 24 horas após o início da incubação. Foi observado o crescimento das células por meio de absorbância a 620 nm. A Concentração Inibitória Mínima foi definida como sendo a menor concentração da amostra capaz de produzir inibição de 50% no crescimento das leveduras, quando em comparação com os poços contendo apenas o meio de cultura e a suspensão padronizada do inóculo em NaCl 0,15 M.

5.4.2 Avaliação do modo de ação da *Mo*-CBP₂

5.4.2.1 Preparo da suspensão de leveduras

A investigação referente ao modo de ação da *Mo*-CBP₂ sobre leveduras foi realizada utilizando *C. albicans* como modelo. As suspensões de *C. albicans* utilizadas nos ensaios descritos a seguir foram preparadas partindo de culturas em fase de crescimento exponencial, como anteriormente descrito no item 5.4.1.

5.4.2.2 Tratamento das células

Para os experimentos de determinação da integridade da membrana celular e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as leveduras foram tratadas isoladamente com NaCl 0,15 M, Nistatina ou *Mo*-CBP₂ em concentrações equivalentes ao CIM (11,11 e 18,95 μ M, respectivamente), por um período de 24 horas.

5.4.2.3 Determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs)

O ensaio para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizado segundo Mendieta e colaboradores (2006), com modificações. Inicialmente, as leveduras foram submetidas ao tratamento com NaCl, Nistatina ou *Mo*-CBP₂, conforme explicitado no item 5.4.2.2. Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de *C. albicans* previamente tratada foi incubada, por 1 hora a 30 °C, com 100 μ L de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (1 mg/mL). Em seguida, foram preparadas lâminas para análise em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60). As imagens foram obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio, com ampliação de 1000 x.

5.4.2.4 Determinação da integridade da membrana celular

Este ensaio foi realizado segundo Gifoni e colaboradores (2012) com modificações. A integridade da membrana celular foi avaliada por meio da utilização do reagente iodeto de propídeo (IP). Iodeto de propídeo funciona como um marcador celular, sendo capaz de se ligar a ácidos nucleicos que compõem o material genético das células. Este composto não é capaz de penetrar livremente através da membrana celular, sendo possível sua entrada apenas em células que possuam rupturas em sua membrana.

Neste ensaio, as leveduras foram tratadas isoladamente com NaCl, Nistatina ou *Mo*-CBP₂, conforme explicitado no item 5.4.2.2. Após este tratamento, alíquotas das suspensões de células foram coletadas e incubadas com IP (0,001 M), por 30 minutos, a 30 °C, sob agitação. Posteriormente, as células foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus System BX 60 (comprimento de onda de excitação, 400 – 500 nm; comprimento de onda de emissão, 600 – 700 nm). As fotomicrografias foram obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio, com ampliação de 400 x.

5.4.2.5 Atividade DNásica

A capacidade da *Mo*-CBP₂ em degradar DNA foi analisada seguindo o protocolo descrito por Tomar e colaboradores (2014). O DNA utilizado no ensaio foi obtido a partir do plasmídeo circular pUC18 de *Escherichia coli*. Uma alíquota de 2 µL (0,5 µg) de plasmídeo foi incubada com 0,5 µg (1 µL) da *Mo*-CBP₂ em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, por 1 hora, a 37 °C, em um volume de reação de 20 µL. DNase (2 unidades; DNase I recombinant, RNase-free, Roche) e BSA (0,5 µg; Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EUA) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (10 x 10 cm) sob condições nativas, em tampão Tris-Acetato-EDTA. A corrida eletroforética foi realizada a 60 V em sistema MultiSUB Midi10 (Clever Scientific, Reino Unido). Em seguida, o gel foi lavado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), por 30 minutos. As bandas de DNA presentes no gel foram visualizadas em câmara escura sob luz ultravioleta.

5.5 Avaliação da atividade hemolítica

Neste ensaio, foi avaliada a liberação de hemoglobina de eritrócitos de coelho incubados na presença de diferentes concentrações (1,9 – 1000 µg/mL) da *Mo*-CBP₂ ou BSA. Inicialmente, o sangue foi lavado com NaCl 0,15 M e centrifugado a 3.000 x g, por 10 minutos, para separar o plasma. Após a realização de três lavagens, a suspensão de eritrócitos foi diluída até a concentração de 4%. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de eritrócitos foi transferida para microtubos e incubada com 100 µL de BSA, *Mo*-CBP₂, Triton X-100 0,1% (controle positivo) ou NaCl 0,15 M (controle negativo), a 37 °C, por 1 hora. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 1.500 rpm, por 10 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes tiveram suas absorvâncias mensuradas em espectrofotômetro de placa de múltiplos poços a 414 nm. Para o cálculo da porcentagem de hemólise, foi usada a seguinte equação:
$$\frac{(\text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ da solução de eritrócitos com proteína} - \text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ da solução de eritrócitos com NaCl } 0,15 \text{ M})}{(\text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ da solução de eritrócitos com Triton X-100 } 0,1\% - \text{Abs}_{414 \text{ nm}} \text{ da solução de eritrócitos com NaCl } 0,15 \text{ M})} \times 100$$
 (CHOI; LEE, 2014).

5.6 Análise estatística

Os ensaios de determinação da CIM foram realizados em triplicata e em dias distintos. A análise estatística foi realizada através de comparação de médias.

6 RESULTADOS

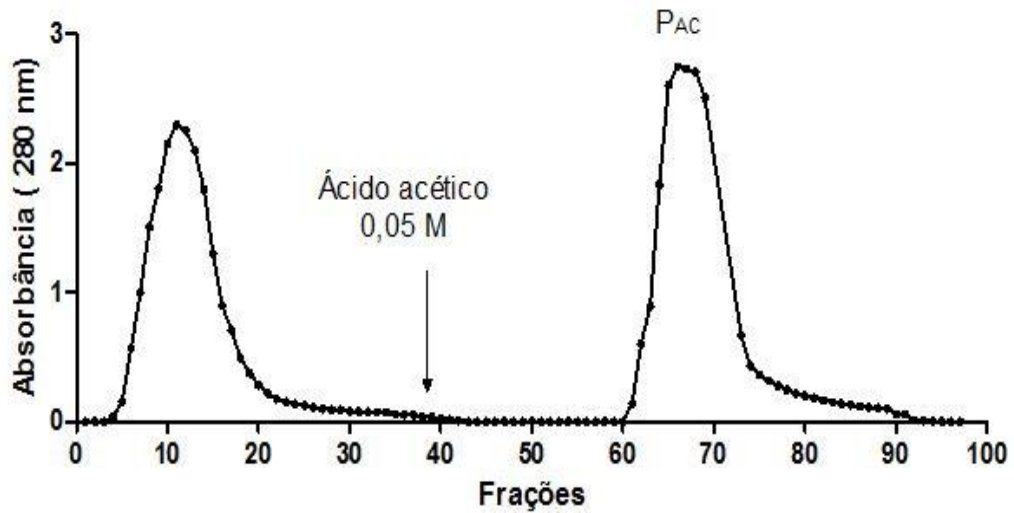
6.1 Purificação da *Mo*-CBP₂

O protocolo para extração e isolamento da *Mo*-CBP₂ está demonstrado na Figura 4 (na seção “Métodos”, item 5.1. O teor médio de proteínas extraídas a partir da farinha delipidada de sementes de *M. oleifera* correspondeu a 205,41 mgP/gF. Da fração albumínica, foram obtidos em torno de 112,45 mgP/gF, representando 54,74% das proteínas contidas no extrato total.

A fração albumínica quando submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina resultou na obtenção de material proteico não retido, oriundo com o próprio tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M). As proteínas ligadas à quitina foram eluídas com uma solução de ácido acético 0,05 M e denominadas de P_{AC} (FIGURA 5). O rendimento proteico dessa fração foi em média 47,57 mgP/gF, representando 23,16% das proteínas presentes no extrato total.

A fração P_{AC} foi posteriormente submetida à cromatografia de troca iônica em matriz de CM Sepharose[®] Fast Flow, que resultou em um pico não retido, eluído com o próprio tampão de equilíbrio (tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2), e mais três outros picos oriundos das proteínas retidas, as quais foram eluídas com esse mesmo tampão acrescido de NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M (FIGURA 6). O material de interesse no presente estudo correspondeu ao segundo pico proteico obtido nessa cromatografia (eluição com NaCl 0,4 M), proteína essa que recebeu a denominação de *Mo*-CBP₂ (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: “Chitin Binding Protein”). *Mo*-CBP₂ mostrou um rendimento médio de 0,28 mgP/gF, representando 0,14% das proteínas contidas no extrato total (Tabela 1).

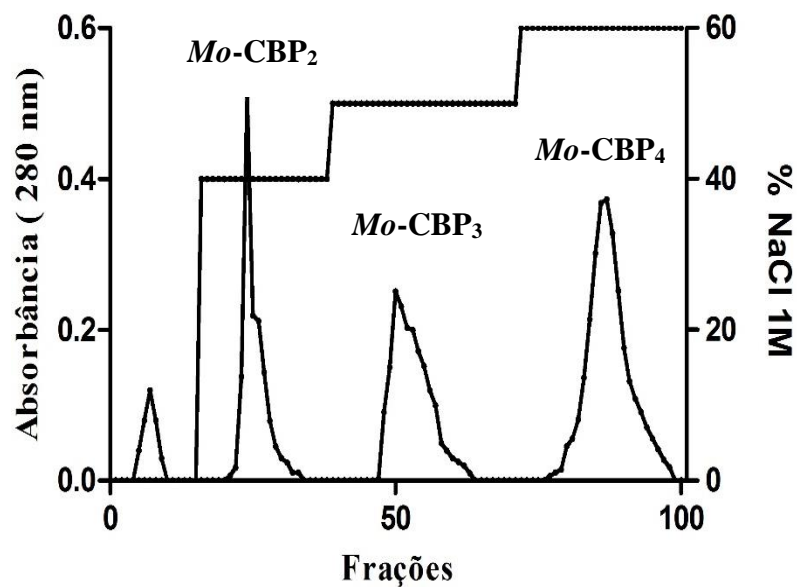
Figura 5 – Cromatografia de afinidade em matriz de quitina



Fonte: Próprio autor.

Amostra (1 g) da fração albumina foi aplicada em coluna cromatográfica contendo matriz de quitina (3,5 x 20,0 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Pico 1 representa o material não retido na matriz, obtido com tampão de equilíbrio. Pico 2 (P_{AC}) corresponde à fração proteica eluída com ácido acético 0,05 M. Fluxo: 60 mL/h; Frações: 5,0 mL.

Figura 6 - Cromatografia de troca iônica em matriz de CM Shepharose® Fast Flow



Fonte: Próprio autor.

A fração P_{AC} (400 mg) foi aplicada em coluna cromatográfica contendo matriz CM Shepharose® Fast Flow previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. *Mo-CBP*₂, *Mo-CBP*₃ e *Mo-CBP*₄ correspondem as proteínas retidas eluídas com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M, respectivamente. Fluxo: 45 mL/h; Frações: 4,5 mL.

Tabela 1 - Teor proteico e rendimento das diferentes frações obtidas durante a purificação da *Mo*-CBP₂

Material obtido nas etapas de purificação	Proteína (mgP/gF) ^a	Rendimento (%) ^b
Extrato Total	205,41 ± 2,55	100,0
Fração Albumina	112,45 ± 3,00	54,74
P _{AC} ^c	47,57 ± 5,46	23,16
<i>Mo</i> -CBP ₂ ^d	0,28 ± 0,02	0,14

Fonte: Próprio autor.

Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis procedimentos similares.

^aQuantidade total de proteína recuperada (mg), a partir de 1 g de farinha delipidada de sementes de *M. oleifera*.

O teor de proteínas foi estimado através do método de Bradford (1976).

^bRecuperação da proteína em cada etapa de purificação, considerando o extrato total igual a 100%.

^cFração proteica eluída da matriz de quitina com ácido acético 0,05 M.

^dProteína ligante à quitina eluída da CM Shepharose® Fast Flow, com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 acrescido de NaCl 0,4 M.

6.2 Caracterização bioquímica da *Mo*-CBP₂

6.2.1 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS) e perfil eletroforético em sistema tris-tricina

Na Figura 7, está mostrado o perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ em gel de poliacrilamida 15%, na presença de SDS. *Mo*-CBP₂ mostrou uma massa molecular aparente de 25,0 kDa. Na Figura 7-A, foi observado que, mesmo na presença de β-mercaptoetanol 4%, 6%, 8% ou 12%, a proteína praticamente manteve o perfil observado na ausência do agente redutor. O mesmo aconteceu quando *Mo*-CBP₂ foi submetida à redução por DTT 0,001 M, 0,010 M ou 0,1 M, seguida de alquilação por IAA 0,002 M, 0,02 M ou 0,2 M, respectivamente, e nova redução com β-mercaptoetanol 4%, conforme demonstrado na Figura 7-B.

No gel de poliacrilamida utilizando o sistema tris-tricina, *Mo*-CBP₂ em condições não redutoras apresentou-se como uma banda proteica localizada acima do marcador de massa molecular de 17,0 kDa e outra banda proteica com massa molecular aparente de 13,0 kDa. Contudo, em condições redutoras (tratamento com DTT 0,1 M a 100 °C, por 4 horas, seguido de alquilação com IAA 0,2 M e incubação com β-mercaptoetanol 4% na mesma temperatura, por 10 minutos) foram verificadas duas bandas proteicas, com massas moleculares aparentes de 7,0 e 4,0 kDa (FIGURA 8).

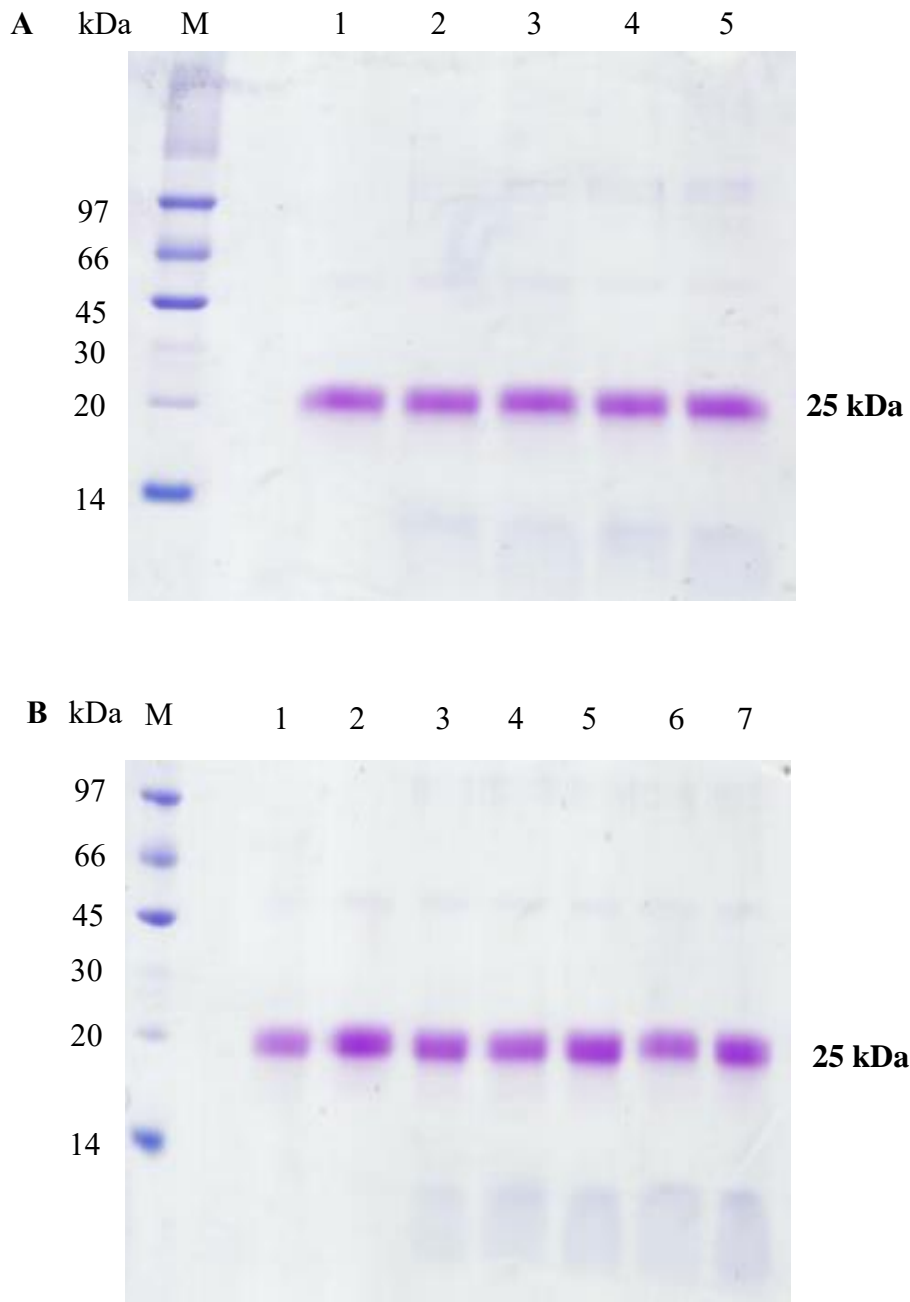
6.2.2 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida sob condição nativa

Em condição nativa, *Mo*-CBP₂ apresentou-se como uma única banda proteica, como mostrado na Figura 9.

6.2.3 Massa molecular e ponto isoelétrico obtidos por PAGE-2D

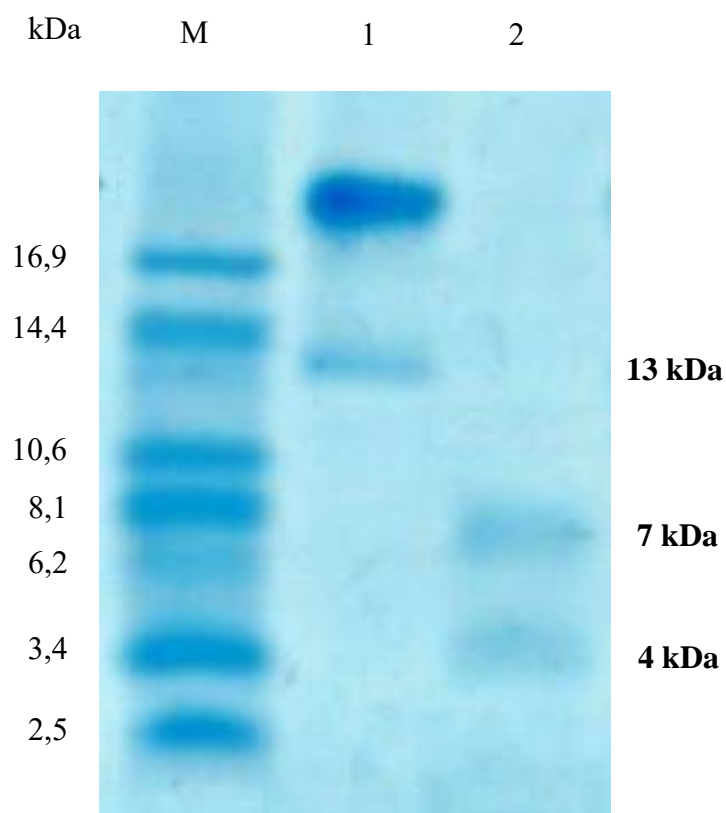
Através de eletroforese bidimensional, foi verificado que *Mo*-CBP₂ apresenta massa molecular de 22,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,9 (FIGURA 10).

Figura 7 - Perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ em condições desnaturantes (PAGE-SDS)



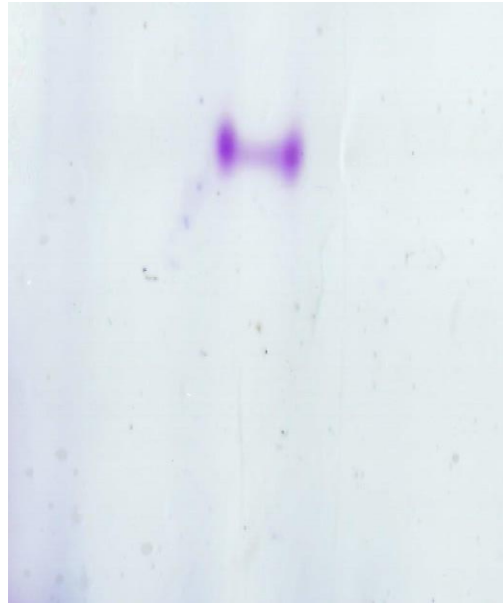
A - Raia 1: *Mo*-CBP₂ em condições não redutoras; Raias 2-5: *Mo*-CBP₂ na presença de β -mercaptoetanol 2%, 4%, 6% ou 8%, respectivamente. **B** - Raia 1: *Mo*-CBP₂ em condições não redutoras; Raias 2-4: *Mo*-CBP₂ na presença de DTT 0,001 M, 0,01 M ou 0,1 M, seguida de alquilação com IAA 0,002 M, 0,02 M ou 0,2 M, respectivamente. Raias 5-7: *Mo*-CBP₂ na presença de DTT 0,001 M, 0,01 M ou 0,1 M e posterior alquilação com IAA 0,002 M, 0,02 M ou 0,2 M, respectivamente, seguida da redução com β -mercaptoetanol 4%. Amostras da *Mo*-CBP₂ (1 μ g) foram aquecidas a 100 °C, por 4 horas.

Figura 8 - Perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ em condições desnaturantes em sistema tris-tricina



M: Marcadores de massa molecular. Raia 1: *Mo*-CBP₂ (5 μ g) em condições não redutoras. Raias 2: *Mo*-CBP₂ (5 μ g) na presença de DTT 0,1 M e posterior alquilação com IAA 0,2 M, seguida da redução com β -mercaptoetanol 4%. O tratamento de redução de *Mo*-CBP₂ foi realizado a 100 °C, por 4 horas.

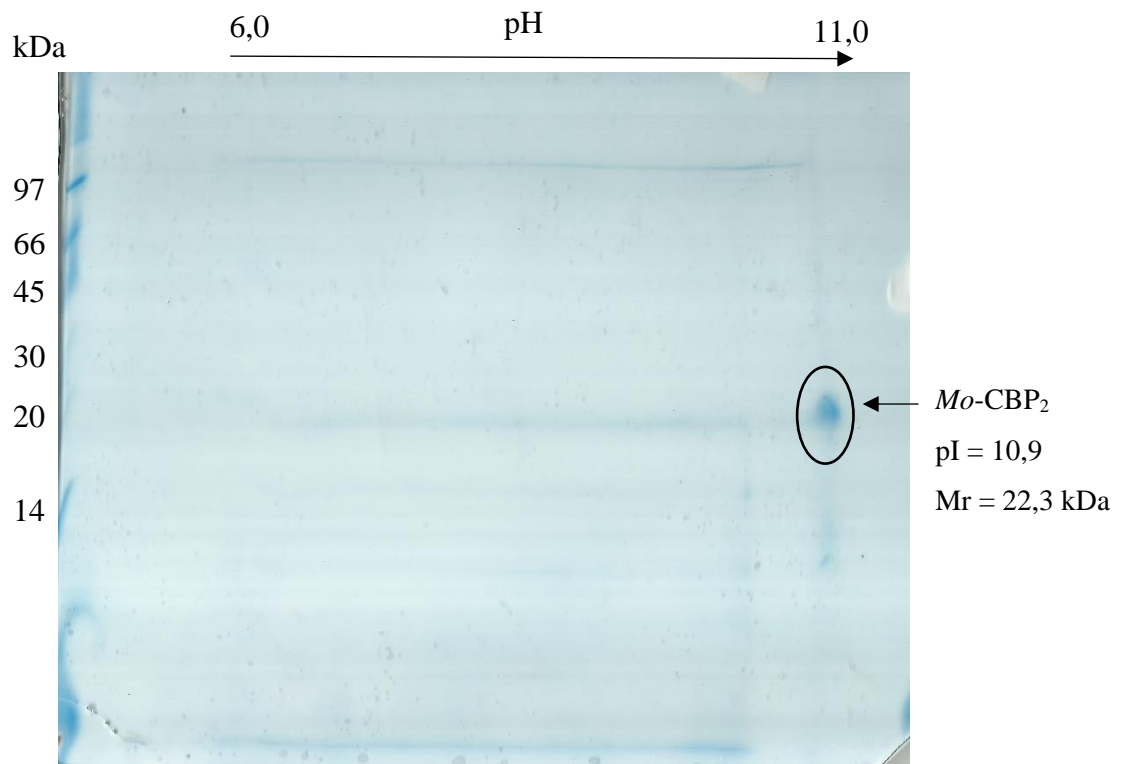
Figura 9 - Perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ em condição nativa



Fonte: Próprio autor.

Mo-CBP₂ (1 mg/mL) foi solubilizada em tampão de amostra (acetato de potássio 0,25 M, pH 6,8, contendo glicerol 50% e azul de metileno). O gel de separação encerrava 12,5% de acrilamida. O gel foi corado com “Coomassie Brilliant Blue R-250” 0,025%.

Figura 10 - Massa molecular e ponto isoelétrico da *Mo*-CBP₂, obtidos por PAGE-2D



Fonte: Próprio autor.

Mo-CBP₂ foi submetida à focalização isoelétrica em fita de 11 cm, pH 6-11. O gel de poliacrilamida (15%) foi corado com "Coomassie Brilliant Blue" G-250, de acordo com Candiano e colaboradores (2004).

6.2.4 Massa molecular obtida por cromatografia de exclusão molecular em valores de pH distintos

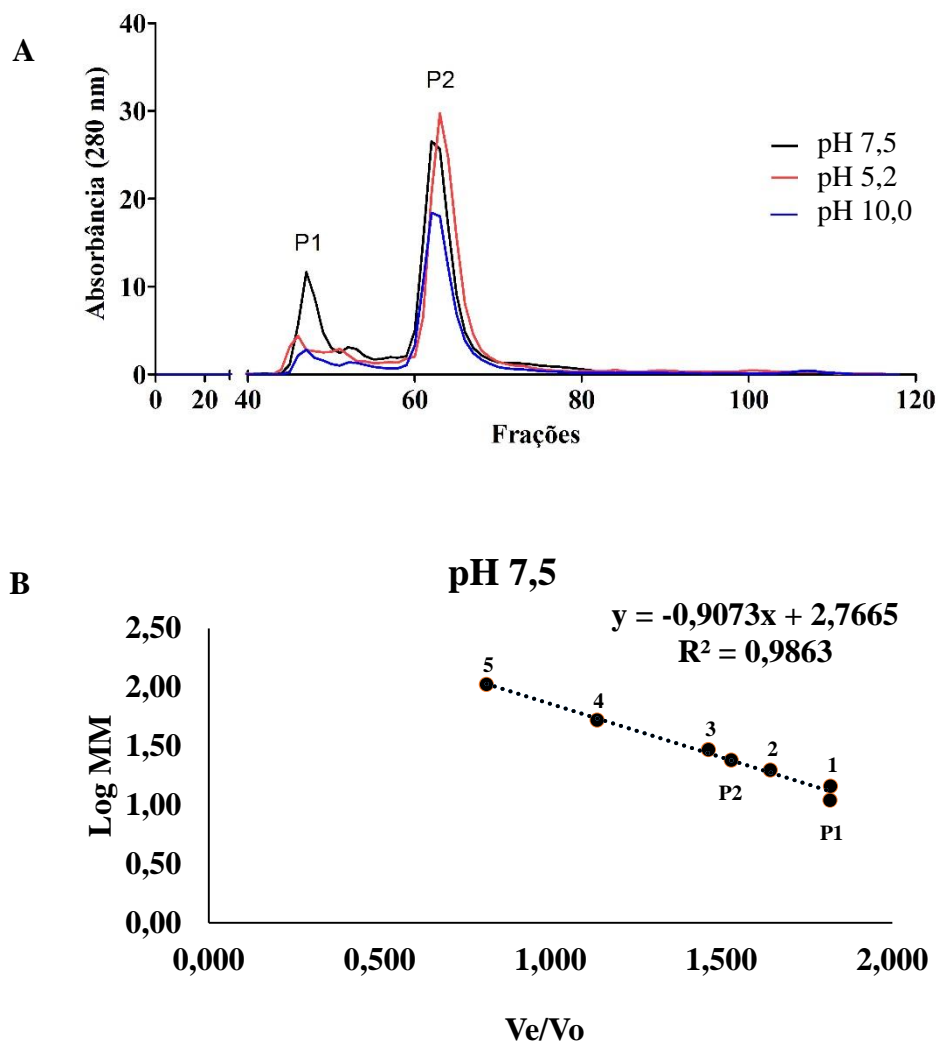
A Figura 11 mostra os perfis de eluição da *Mo*-CBP₂ obtidos na cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superdex™ 75, utilizando tampões com diferentes pHs (5,2; 7,5 e 10,0). Em todos os pHs analisados, *Mo*-CBP₂, após essa cromatografia, resultou em dois picos proteicos: um menor, o qual foi seguido por outro bem mais proeminente. Ao correlacionar os volumes de eluição dos referidos picos proteicos e suas respectivas massas moleculares em cada pH analisado, o primeiro pico apresentou massas moleculares de 65,8; 65,8 e 66,8 kDa e o segundo pico, massas moleculares de 34,2; 33,8 e 33,6 kDa, nos pHs 5,2; 7,5 e 10,0, respectivamente.

6.2.5 Massa molecular e sequências de peptídeos trópticos identificados por espectrometria de massas

6.2.5.1 Massa molecular

Antes da *Mo*-CBP₂ ser submetida à espectrometria de massas, foi realizada uma cromatografia de fase reversa em sistema HPLC para retirar quaisquer resquícios de contaminantes. O perfil eletroforético do pico que corresponde a *Mo*-CBP₂ está mostrado na Figura 12. A proteína pura foi tratada para dar prosseguimento à análise da massa por espectrometria de massas utilizando o sistema ESI-TOF.

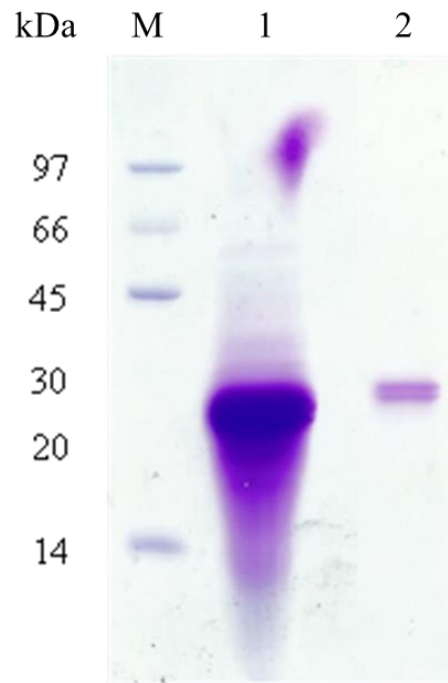
Figura 11 - Cromatografia de exclusão molecular da *Mo*-CBP₂ em pHs diferentes



Fonte: Próprio autor.

Em A, estão representados os cromatogramas obtidos após aplicação da *Mo*-CBP₂ (1 mg) em matriz de Superdex™ 75, previamente equilibrada com os tampões acetato de sódio 0,025 M, pH 5,2, Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 e borato de sódio 0,025 M, pH 10,0, todos acrescidos de NaCl 0,4 M. Em B, está representado o gráfico de determinação da massa molecular dos picos proteicos obtidos nas cromatografias citadas. A coluna foi previamente calibrada com 1 - BSA (66,0 kDa); 2 - ovalbumina (44,0 kDa); 3 - anidrase carbônica (29,0 kDa); 4 - ribonuclease A (13,7 kDa) e 5 - aprotinina (6,5 kDa). P1: pico 1; P2: pico 2. Fluxo: 0,5 mL/minuto. Fração: 1 mL.

Figura 12 – Perfil eletroforético da *Mo*-CBP₂ aplicada em cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa



Fonte: Próprio autor

PAGE-SDS da *Mo*-CBP₂ e o pico eluído do HPLC corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. Raia M – Marcadores de massa molecular; Raias 1 e 2: *Mo*-CBP₂ antes e após a corrida cromatográfica, respectivamente.

O espectro de massas desconvolvido da proteína íntegra apresentado na Figura 13 mostra um pico majoritário com massa molecular de 13.160 Da.

6.2.5.2 Sequências de peptídeos trípticos

Mo-CBP₂ foi submetida à digestão tríptica e, em seguida, analisada por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-TOF MS/MS. Foram identificados 4 peptídeos trípticos, totalizando 74 resíduos de aminoácidos (TABELA 2). Estes foram submetidos ao alinhamento e comparação com sequências de proteínas já depositadas em banco de dados NCBI, utilizando a ferramenta BLAST. Todos os peptídeos gerados apresentaram alta similaridade (acima de 60%) com demais proteínas obtidas de sementes de *M. oleifera*, como as isoformas do precursor de albumina 2S, proteína floculante, MO 2.1 e MO 2.2. Além disso, houve alinhamento com albuminas 2S de outras espécies de plantas como a de *Bertholletia excelsa* e de *Capparis masaikai* (TABELA 2).

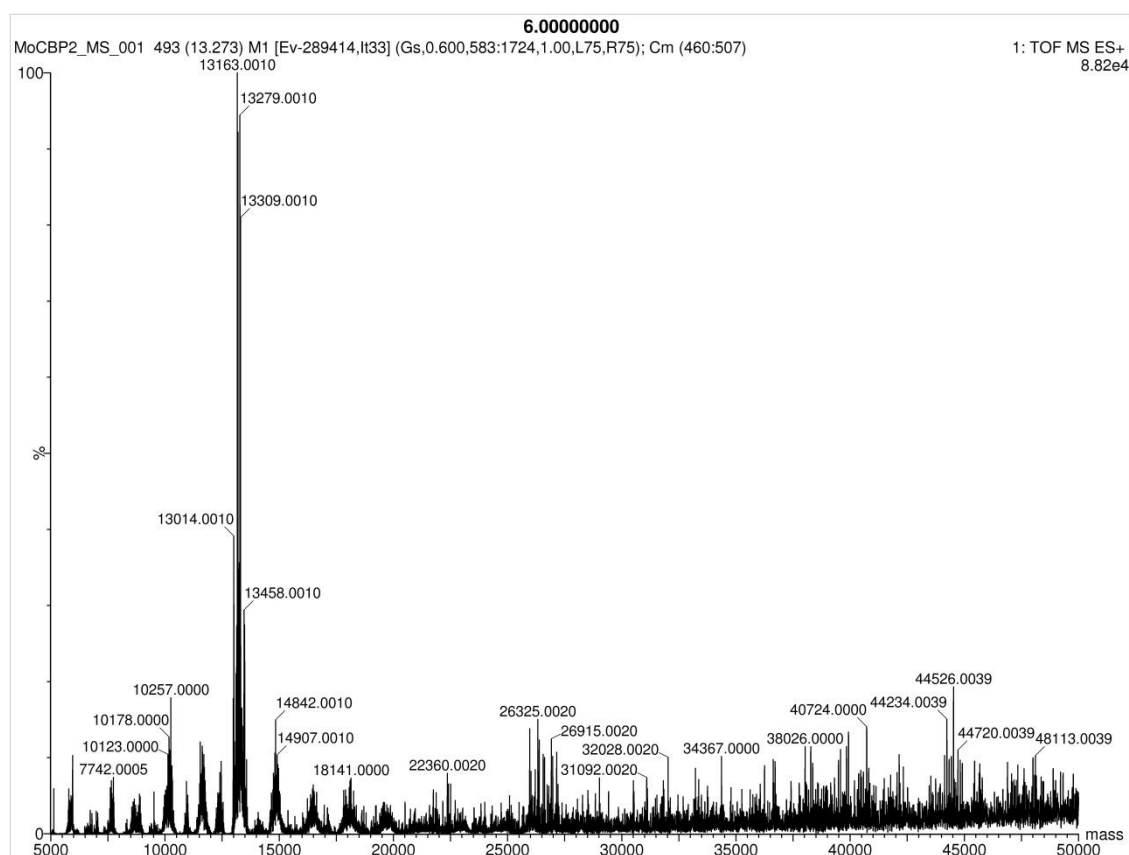
Com o auxílio da ferramenta Clustal Omega, foi verificado que os peptídeos gerados após digestão tríptica de *Mo*-CBP₂ alinhavam com as quatro isoformas do precursor da *Mo*-CBP₃, uma albumina 2S de sementes de *M. oleifera*. As sequências com os números de identificação (NCBI) AHG99681.1, AHG99683.1, AHG99684.1 e AHG99682.1 foram denominadas como *Mo*-CBP₃-1, *Mo*-CBP₃-2, *Mo*-CBP₃-3 e *Mo*-CBP₃-4, respectivamente, seguindo a nomenclatura proposta por Freire e colaboradores (2015). De acordo com a Figura 14, todos os peptídeos de *Mo*-CBP₂ alinharam com as 4 isoformas de *Mo*-CBP₃, porém com percentuais de similaridade diferentes, variando de 65 – 100% (TABELA 3). Todos os peptídeos foram melhores alinhados à isoforma *Mo*-CBP₃-3, apresentando 100% de similaridade para os peptídeos 1, 2 e 3, e 79% para o peptídeo 4.

6.2.6 Sequência NH₂-terminal

Várias tentativas foram realizadas a fim de se determinar a sequência NH₂-terminal da *Mo*-CBP₂. No entanto, em nenhuma delas se obteve sucesso devido, provavelmente, ao bloqueio desta porção da proteína.

6.2.7 Detecção de carboidratos ligados à proteína

Figura 13 - Espectro de massas de *Mo*-CBP₂ por TOF-ESI-MS



Fonte: Próprio autor

Espectro desconvolvido da *Mo*-CBP₂ (10 µg) mostrando um pico com massa molecular de 13.160 Da.

Tabela 2 - Sequência de aminoácidos de peptídeos da *Mo*-CBP₂ identificados por ESI-Q-TOF MS/MS após digestão trípica em solução da proteína purificada

Peptídeo/Proteína	Espécie	Sequência	Similaridade	Número de acesso (NCBI)
Peptídeo 1	<i>Moringa oleifera</i>	QQFLTHQRL		
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	<i>Moringa oleifera</i>	47 QQFLTHQRL 55	100%	AHG99684.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	<i>Moringa oleifera</i>	43 QQFQTHQRL 51	89%	AHG99683.1
Peptídeo 2	<i>Moringa oleifera</i>	QAVQLAHQQQGQVGPQQVRQ		
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQLAHQQQGQVGPQQVRQ 136	100%	AHG99684.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	<i>Moringa oleifera</i>	115 QAVQLTHQQQGQVGPQQVRQ 134	95%	AHG99683.1
MO 2.1 = flocculating protein	<i>Moringa oleifera</i>	30 QAVQLTHQQQGQVGPQQVRQ 49	95%	AAB34890.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQSAQQQGQVGPQQV 134	89%	AHG99682.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQSAQQQGQVGPQQV 134	89%	AHG99681.1
Mabinlin I-1, B-chain	<i>Capparis masaikai</i>	28 QAAHQQLYQGQIEGPRQVRQ 47	70%	AAB31597.1

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Sequência de aminoácidos de peptídeos da *Mo*-CBP₂ identificados por ESI-Q-TOF MS/MS após digestão triptica em solução da proteína purificada

Peptídeo/Proteína	Espécie	Sequência	Similaridade	Número de acesso (NCBI)
Peptídeo 3	<i>Moringa oleifera</i>	LASNIPAICNLRPMSCPFQ		
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	<i>Moringa oleifera</i>	140 LASNIPAICNLRPMSCPFQ 160	100%	AHG99684.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	<i>Moringa oleifera</i>	141 ASRIPAICNLQPMRCPFRQ 160	80%	AHG99682.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	<i>Moringa oleifera</i>	139 ASNIPSMCNLQPMSCFLFRQ 158	75%	AHG99683.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	<i>Moringa oleifera</i>	141 ASRIPAICNPQPMRCPFRQ 160	75%	AHG99681.1
2S albumin, Chain A	<i>Bertholletia excelsa</i>	90 LAENIPSRCNLSPMRCPMG 108	68%	2LVF
2S albumin precursor	<i>Bertholletia excelsa</i>	122 LAENIPSRCNLSPMRCPMG 140	68%	ACI70207.1
Peptídeo 4	<i>Moringa oleifera</i>	QAVQSAQQQGGQVGPQQVGHMYRV		
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQSAQQQGGQVGPQQVGHMYRV 140	100%	AHG99682.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQSAQQQGGQVGPQQVGHMYRV 140	100%	AHG99681.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	<i>Moringa oleifera</i>	117 QAVQLAHQQGGQVGPQQVRQMYR 139	83%	AHG99684.1
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	<i>Moringa oleifera</i>	115 QAVQLTHQQGGQVGPQQVRQMYRV 138	79%	AHG99683.1
MO 2.1= flocculating protein	<i>Moringa oleifera</i>	30 QAVQLTHQQGGQVGPQQVRQMYRV 53	79%	AAB34890.1

^a*Mo*-CBP₃: Proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera* (Batista *et al.*, 2014).

Figura 14 - Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos dos peptídeos trípticos da *Mo*-CBP₂ com as quatro isoformas do precursor de *Mo*-CBP₃^a, uma albumina 2S de *M. oleifera*

A

Peptídeo 1	-----QQFL	4
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	MAKLTLLLATFALLVLLANASIYRTTVELDEEPDDN---QQQRCRHQFQ	46
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	MAKITLLLATFGLLLLLTNASIYRTTVELDEEADEN---QQQRCRQFQ	46
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	MAKFTLLLAIFALFLILANANVYRTTVELDEEPDDNQQGQQQQCRQFQ	50
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	MAKLTLLLATLALLVLLANASIYRTTVELDEEPDDN---QQQRCRHQFQ	46
		:**

Peptídeo 1	THQRL-----	9
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	SQQLRACQQRVIRRWSSQGGPMEDVEDEIGETDEIEEVVEPDQAR--RPPT	95
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	THQRLRACQRFIRRTQGGGPLDEVEDEV---DEIEEVVEPDQGPGRQPA	93
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	THQRLRACQRFIRRTQGGGALEDVEDDV---EEIEEVVEPDQA--RRPA	95
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	TQQLRACQQRVIRRWSSQGGPMEDVEDEIDETDEIEEVVEPDQAR--RPPT	95
		::***

B

Peptídeo 2	-----QAVQLAHQQQGQVGPQVVRQ-----	20
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	FQRCCQQLRNI SPPCRCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQVVRQMYRVASNIP	143
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	IQRCCQQLRNIQPRCRCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQVVRQMYRLASNIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
		**** :***** :

C

Peptídeo 3	-----LASNIP	6
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	FQRCCQQLRNI SPPCRCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQVVRQMYRVASNIP	143
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	IQRCCQQLRNIQPRCRCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQVVRQMYRLASNIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
		:**.**

Peptídeo 3	AICNLRPMSCPFGQQ-----	21
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	AICNPQPMRCPFRQQQS--	163
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	SMCNLQPMSCLFRRQQSSWL	163
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	AICNLRPMSCPFGQQ-----	160
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	AICNLQPMRCPFRQQQS--	163
		::** :** * * **

D

Peptídeo 4	-----QAVQSAQQQGQVGPQVGHMYRV-----	24
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2	FQRCCQQLRNI SPPCRCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQVVRQMYRVASNIP	143
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3	IQRCCQQLRNIQPRCRCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQVVRQMYRLASNIP	145
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4	LQRCCRQLRNVSPFCRCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIP	145
		**** :***** :**** :

^a*Mo*-CBP₃: Proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera* (Batista *et al.*, 2014). Para o alinhamento foi utilizada a ferramenta Clustal Ômega. A, B, C e D apresentam o alinhamento das isoformas da *Mo*-CBP₃ com os peptídeos 1, 2, 3 e 4 oriundos da *Mo*-CBP₂, respectivamente. Aminoácidos idênticos são identificados por asterisco (*); Substituições conservadas são identificadas por dois pontos (:); Substituições semiconservadas são identificadas por apenas um ponto (.)

Tabela 3 - Similaridade (%) entre as sequências de aminoácidos dos peptídeos trípticos da *Mo*-CBP₂ e isoformas do precursor de *Mo*-CBP₃^a, uma albumina 2S de *M. oleifera*

Isoformas de <i>Mo</i> -CBP ₃	Peptídeos trípticos de <i>Mo</i> -CBP ₂			
	1	2	3	4
<i>Mo</i> -CBP ₃ -1 (AHG99681.1)	65%	80%	71%	100%
<i>Mo</i> -CBP ₃ -2 (AHG99683.1)	89%	95%	71%	79%
<i>Mo</i> -CBP ₃ -3 (AHG99684.1)	100%	100%	100%	79%
<i>Mo</i> -CBP ₃ -4 (AHG99682.1)	67%	80%	76%	100%

Matriz gerada após o alinhamento utilizando a ferramenta Clustal Omega. ^a*Mo*-CBP₃: Proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera* (Batista *et al.*, 2014).

Para avaliar se *Mo*-CBP₂ apresenta carboidratos em sua estrutura, foi realizada primeiramente uma análise qualitativa por PAGE-SDS, seguida de coloração com reagente de Schiff. A Figura 15, mostra na raia 1 a glicoproteína padrão fetuína e na raia 2 *Mo*-CBP₂ corada, evidenciando carboidrato em sua composição. O teor de açúcar determinado correspondeu a 4,1% da massa total da *Mo*-CBP₂.

Apesar de ter sido detectado carboidrato na estrutura da *Mo*-CBP₂, não houve diferença entre as massas aparentes da proteína com ou sem a porção glicídica, visualizada pelo perfil eletroforético em PAGE-SDS (Figura 16). Fetuína, utilizada como controle positivo, teve sua massa reduzida de 88,0 kDa para 61,0 kDa após o processo de deglicosilação.

6.2.8 Avaliação da atividade hemaglutinante

Apesar da *Mo*-CBP₂ ter a capacidade de se ligar a quitina (carboidrato), no ensaio de hemaglutinação não foi visualizada aglutinação de eritrócitos de coelho, mesmo quando estes foram tratados com tripsina.

6.3 Atividade anti-*Candida* da *Mo*-CBP₂ e investigação do seu modo de ação

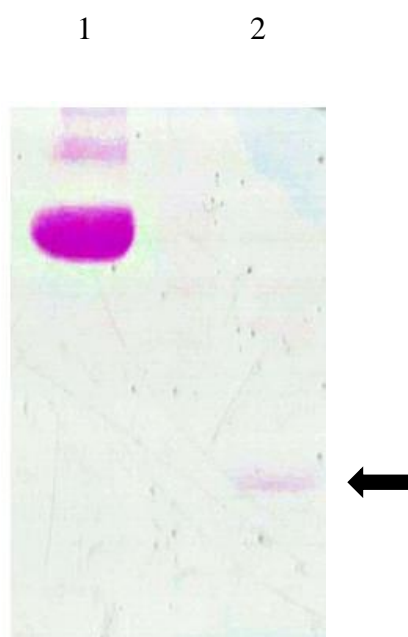
6.3.1 Avaliação do efeito inibitório da *Mo*-CBP₂ sobre o crescimento de *Candida* spp.

Espécies diferentes de *Candida* foram incubadas com *Mo*-CBP₂ durante 24 horas, em diferentes concentrações, a fim de avaliar a inibição do crescimento destas leveduras. Nistatina comercial foi utilizada como antifúngico de referência. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, *Mo*-CBP₂ inibiu o crescimento de todas as cepas testadas, incluindo uma cepa de isolado clínico. A proteína exibiu uma maior influência sobre *C. krusei* (CIM₅₀ de 9,45 µM), seguida de *C. albicans* e *C. tropicalis* e, por último, *C. parapsilosis* (CIM₅₀ de 37,9 µM, 18,9 µM e 37,9 µM, respectivamente).

6.3.2 Investigação do modo de ação anti-*Candida* da *Mo*-CBP₂

Para avaliar como *Mo*-CBP₂ poderia interferir no crescimento de *Candida* spp., foram empregadas diversas metodologias, usando como modelo experimental a cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

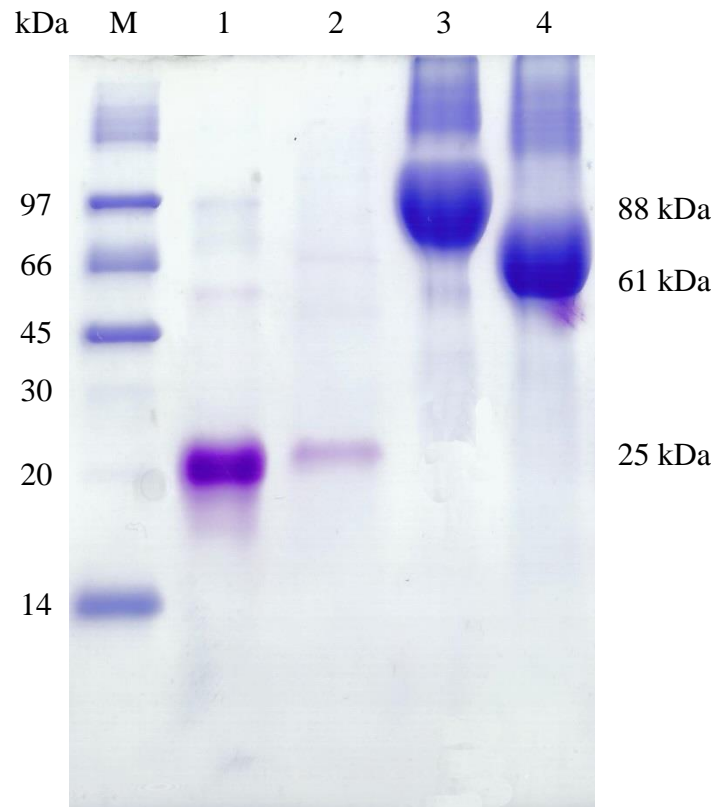
Figura 15 - Detecção de glicoproteína pelo método de Schiff



Fonte: Próprio autor.

Mo-CBP₂ (15 µg) foi aplicada na raia 2 do gel de poli-acrilamida (15%). A glicoproteína fetuína (30 µg) foi utilizada como controle positivo (Raia 1). O gel foi corado com ácido periódico de Schiff. A seta aponta para a banda correspondente a *Mo*-CBP₂.

Figura 16 – Perfil eletroforético de *Mo*-CBP₂ antes e após deglicosilação (PAGE-SDS)



Raia 1 e 2: *Mo*-CBP₂ (2 µg) glicosilada e deglicosilada, respectivamente; Raias 3 e 4: fetuína (5 µg) glicosilada e deglicosilada, respectivamente. A deglicosilação foi realizada utilizando o kit Edegly (Sigma). Raia M: marcadores de massa molecular. O gel foi corado com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 0,025%

Inicialmente, foi avaliada a capacidade da *Mo*-CBP₂ em induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *C. albicans*. A Figura 17 mostra que a proteína na concentração de 18,9 µM promoveu a formação de grânulos escuros no interior das células, típicos da reação do DAB com peroxidases endógenas, evidenciando a formação de EROs. Nistatina foi usada como controle positivo e também apresentou a formação dos grânulos.

A influência da *Mo*-CBP₂ sobre a permeabilidade da membrana celular de *C. albicans* foi avaliada utilizando iodeto de propídio. O tratamento das células de *C. albicans* com o controle positivo Nistatina (11,1 µM) ou *Mo*-CBP₂ (18,9 µM) por 24 horas promoveu a emissão de fluorescência, evidenciando o aumento da permeabilidade da membrana celular (Figura 18). Nas células incubadas apenas com NaCl 0,15 M não foi possível visualização de fluorescência.

A Figura 19 mostra que *Mo*-CBP₂ (0,5 µg) apresentou atividade DNásica, uma vez que foi eficiente em degradar, *in vitro*, DNA do plasmídeo circular pUC18 de *Escherichia coli*. Esta atividade foi similar a apresentada pela DNase recombinante de pâncreas bovino, usada como controle positivo. As amostras de BSA (0,5 µg) e tampão Tris não degradaram o plasmídeo circular pUC18.

A capacidade da *Mo*-CBP₂ em romper a membrana de células foi avaliada utilizando como modelo eritrócitos de coelho. Enquanto que Triton X-100 0,1% (controle positivo) causou 100% de hemólise, *Mo*-CBP₂ e BSA não apresentaram atividade hemolítica, mesmo na maior concentração (1 mg/mL).

Tabela 4 – Efeito inibitório da *Mo*-CBP₂ e Nistatina frente a cepas ATCC e isolado clínico de *Candida* spp.

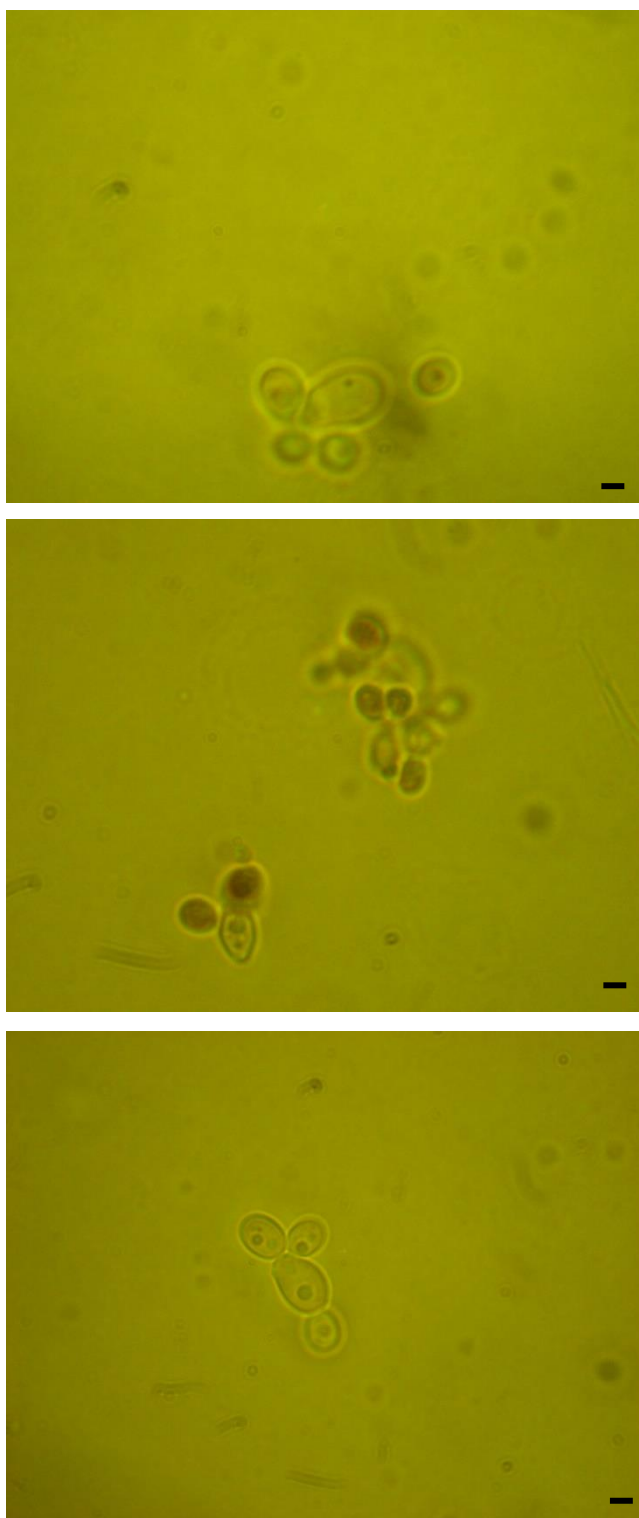
Cepas	^a CIM (μM)	
	<i>Mo</i> -CBP ₂	Nistatina
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	18,9	11,11
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	37,9	22,23
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	9,45	11,11
<i>C. tropicalis</i> ^b	18,9	22,23

^a Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento das leveduras em 50%;

^b Cepa de isolado clínico.

Fonte: Próprio autor

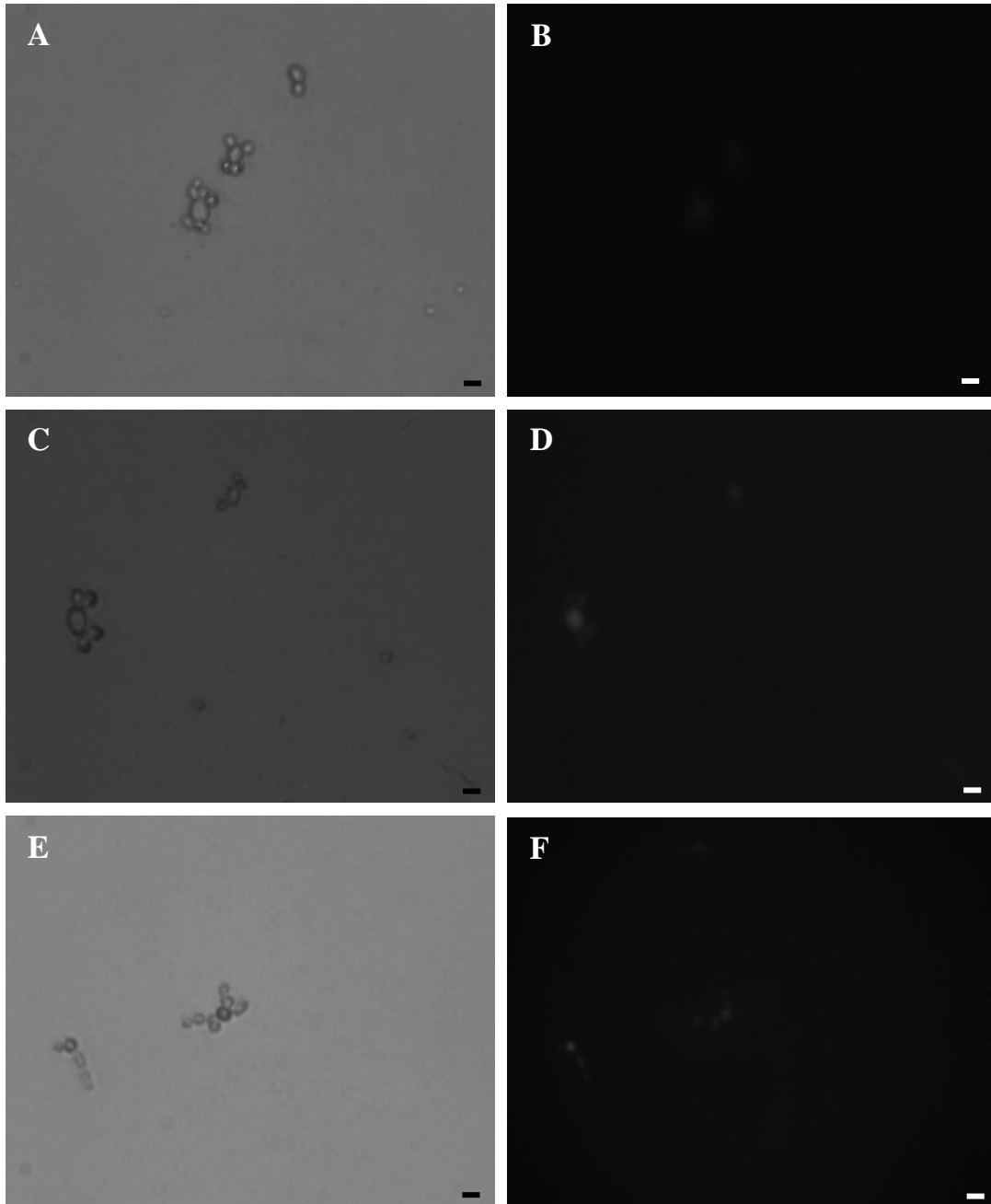
Figura 17 – Indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *C. albicans* tratada com *Mo*-CBP₂



Fonte: Próprio autor.

As células foram tratadas com NaCl 0,15 M (A); Nistatina 11,1 μM (B) ou *Mo*-CBP₂ 18,9 μM (C) por 24 horas e incubadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) na concentração final de 0,5 mg/mL. As barras pretas representam 10 μm.

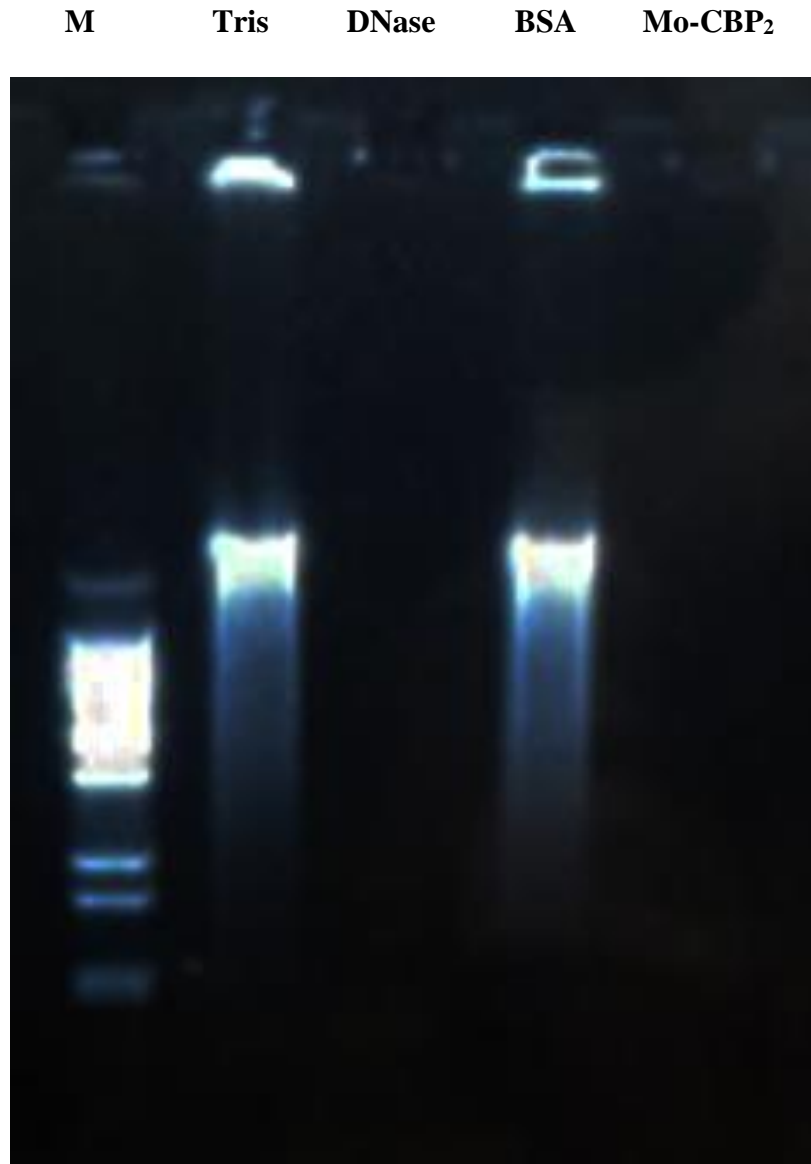
Figura 18 – Permeabilização de membrana em *C. albicans* tratada com *Mo*-CBP₂



Fonte: Próprio autor.

As células foram tratadas com NaCl 0,15 M; Nistatina 11,1 μ M ou *Mo*-CBP₂ 18,9 μ M por 24 horas e incubadas com iodeto de propídeo 0,001 M. Controle: A-B; *Mo*-CBP₂: C-D; Nistatina: E-F. Campo claro: A, C e E. Fluorescência: B, F e G. As barras pretas representam 10 μ m.

Figura 19 - Atividade DNásica da *Mo*-CBP₂



Fonte: Próprio autor.

M: Marcadores de massa molecular; Tris: tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4; DNase: 2 unidades; BSA: 0,5 µg; *Mo*-CBP₂: 0,5 µg. As amostras foram incubadas previamente com 0,5 µg de plasmídeo circular pUC18 de *Escherichia coli*.

7 DISCUSSÃO

Em novembro do corrente ano, durante a “Semana mundial para o bom uso dos antibióticos”, com o tema “Antibióticos: Manusear com Cuidado”, a Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma alerta à comunidade sobre o uso indiscriminado de antibióticos e o surgimento de microrganismos super-resistentes. Além disso, a OMS fez as seguintes recomendações: utilizar antibióticos apenas quando prescritos por um médico; manter o tratamento até o final do período determinado, mesmo não havendo mais sintomas da doença; não utilizar antibióticos de uma prescrição anterior e nunca compartilhar antibióticos com outras pessoas (WHO, 2015). Unificada a esses cuidados, está a comunidade científica na busca incessante de novos agentes antimicrobianos que ofereçam menos resistência, maior eficácia, reduzidos efeitos adversos e baixo custo. Nesse sentido, as plantas apresentam-se como fontes generosas de novos compostos com potencial para o tratamento de doenças, incluindo doenças infecciosas. Estudos que exploram o mecanismo de ação e os aspectos estrutura-atividade de tais compostos naturais podem proporcionar a descoberta de antimicrobianos adicionais e, também, contribuir para superar a resistência antimicrobiana (HAYASHI; BIZERRA; DA SILVA JR., 2013). Com essa premissa, o presente estudo foi desenvolvido, destacando a purificação e mostrando dados relevantes vinculados à caracterização físico-química e avaliação da atividade anti-*Candida* de uma nova proteína ligante à quitina obtida de sementes de *M. oleifera*.

As etapas iniciais da purificação dessa proteína ligante à quitina foram baseadas nos protocolos estabelecidos por Pereira e colaboradores (2011), com algumas modificações. A extração das proteínas a partir da farinha de sementes de *M. oleifera* rendeu um valor médio de $205,41 \pm 2,55$ mg proteína/grama de farinha (mgP/gF), valor semelhante ao encontrado no protocolo original. Através da diálise exaustiva do extrato total contra água, seguida de centrifugação, duas frações com diferentes solubilidades foram obtidas: fração albumínica e fração globulínica. A primeira fração, solúvel em água, foi separada, congelada e liofilizada ao invés de passar por um processo de concentração com sulfato de amônio, correspondendo à primeira modificação em relação ao protocolo proposto por Pereira *et al.* (2011). A fração albumínica representou em torno de 55% do teor proteico do extrato total.

Após aplicação da fração albumínica em matriz de quitina, as proteínas retidas (P_{AC}) foram eluídas através da percolação de solução de ácido acético 0,05 M, pH 3,0. Em cromatografias de afinidade, mudança de pH pode ser usada para dissociar as proteínas da

matriz, pois em ambientes com potenciais hidrogeniônicos altos ou baixos, a conformação tridimensional dos polipeptídios é afetada, provocando uma desestabilização da ligação proteína-ligante (matriz). Desta maneira, a fração P_{AC} foi recuperada e após diálise, congelamento e liofilização correspondeu uma fração em torno de 23% das proteínas do extrato total.

A fração P_{AC} foi submetida à matriz trocadora de cátions CM-Sepharose, produzindo um pico proteico não retido e outros quatro picos retidos. Destes picos retidos, o segundo correspondeu à proteína ligante à quitina denominada no presente trabalho de *Mo*-CBP₂, eluída com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,4 M. Ao final do processo de isolamento, *Mo*-CBP₂ apresentou um rendimento médio de $0,28 \pm 0,02$ mgP/gF, representando 0,14% das proteínas totais contidas no extrato. Um rendimento final próximo ao aqui obtido foi o da lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL), com um rendimento médio de 0,25 mgP/gF (SANTOS *et al.*, 2009).

Na eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS, *Mo*-CBP₂ apresentou-se como uma proteína constituída por uma única banda com massa aparente de 25,0 kDa. Com o objetivo de avaliar a presença de subunidades proteicas, o agente redutor β-mercaptoetanol 2% foi adicionado à *Mo*-CBP₂, porém a proteína continuou com perfil bem semelhante ao verificado em condições não redutoras. Como já havia sido constatada a resistência à redução para outra proteína ligante à quitina de *M. oleifera*, *Mo*-CBP₃, purificada pelo nosso grupo de pesquisa (BATISTA *et al.*, 2013), diversas tentativas de redução da *Mo*-CBP₂ foram realizadas nesse trabalho, visando confirmar a presença ou não de subunidades proteicas. Mesmo utilizando β-mercaptoetanol 8%, com aquecimento prévio da proteína, esse tratamento não resultou na redução da *Mo*-CBP₂. O tratamento da *Mo*-CBP₂ com várias concentrações de DTT (0,001 a 0,1 M), seguido de alquilação com iodoacetamida (0,002 a 0,2 M) também não se mostrou efetivo em reduzi-la. Apenas quando foram combinados aquecimento a 100 °C e os dois tratamentos de redução (DTT seguido de β-mercaptoetanol), surgiram bandas proteicas abaixo de 14,0 kDa.

Com o objetivo de melhor verificar as bandas proteicas abaixo de 14,0 kDa, visualizadas por PAGE-SDS em condições desnaturantes, foi utilizado o sistema tricina-SDS-PAGE, próprio para análise de peptídeos. Os resultados mostraram que a redução de *Mo*-CBP₂ gerou duas bandas proteicas distintas, com massas moleculares aparentes de 4,0 e 7,0 kDa. A presença de subunidades proteicas também é característica da *Mo*-CBP₃ e *Mo*-CBP₄; nesse último caso, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, também purificada por nosso grupo de pesquisa (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012). Análises moleculares

da *Mo*-CBP₃ revelaram que esta proteína possui 8 resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfeto intra e intercadeia, possuindo uma estrutura tridimensional globular bastante compacta. Tais características conferem a *Mo*-CBP₃ uma elevada estabilidade a altas temperaturas, além de dificultar sua redução (FREIRE *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2015). *Mo*-CBP₄ e outras proteínas básicas de *M. oleifera*, como a hemaglutinina MoL e a lectina coagulante cMoL também mostraram alta termoestabilidade (KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). Assim, a dificuldade em obter as subunidades da *Mo*-CBP₂ pode ser uma característica intrínseca a esta família de proteínas básicas de *M. oleifera*.

Complementando a análise da massa molecular da *Mo*-CBP₂ por eletroforese, estão os resultados obtidos através de PAGE-2D, na qual um “spot” mais intenso foi visualizado, exibindo massa molecular de 22,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 10,9. Esse elevado pI possibilita a inclusão da *Mo*-CBP₂ na família de proteínas básicas de *M. oleifera*, algumas delas apresentando atividade floculante, que é típica das sementes desta planta. Estudos posteriores poderão ser realizados a fim de comprovar a propriedade coagulante em *Mo*-CBP₂. Uma vez confirmado o caráter básico da *Mo*-CBP₂, eletroforese em condições nativas para proteínas básicas foi realizada e, nesse estado, *Mo*-CBP₂ se apresentou como apenas uma banda proteica.

A cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superdex 75 mostrou que, em pH neutro (7,5), *Mo*-CBP₂ apresenta dois picos, com massas moleculares de 33,8 kDa e 65,8 kDa, sendo o de menor massa o mais proeminente. Assim, a hipótese de que a proteína estaria formando oligômeros foi levantada, pois a maior massa praticamente correspondia ao dobro da menor. Então, a influência do pH sobre a estrutura da proteína passou a ser especulada. Em pH mais ácido ou mais básico (5,2 e 10,0, respectivamente), *Mo*-CBP₂ tendeu a ter massa em torno de 33,0 kDa, comportamento esse melhor evidenciado em condição básica.

Dada às diferenças nas massas encontradas para *Mo*-CBP₂, de acordo com a metodologia empregada, buscou-se uma análise mais precisa por espectrometria de massas. A proteína íntegra apresentou massa de 13.160 Da, bem próxima às massas das demais proteínas ligantes à quitina de *M. oleifera* isoladas por nosso grupo de pesquisa.

A massa molecular de uma proteína pode variar dependendo do protocolo de extração e diferentes sistemas de tamponamento usados no processo de purificação (PAVANKUMAR *et al.*, 2014). Por exemplo, Okuda e colaboradores (2001) reportaram que uma proteína coagulante extraída com solução salina apresentou massa molecular de 3,0 kDa, enquanto que a massa aparente da mesma proteína foi de 12,0-14,0 kDa quando extraída com água. Parece que o potencial eletrostático e energia livre de solvatação estão ligados à formação de dímeros. A variação do pH também pode ocasionar mudanças na estrutura tridimensional de

proteínas, levando a um estado de desnaturação. Essas alterações podem estar relacionadas à mudança de carga nos resíduos de aminoácidos da proteína que, eventualmente, resultam na repulsão carga-carga intra ou intercadeia. Além disso, muitas interações não covalentes que ajudam na manutenção da forma multimérica das proteínas são dissociadas com a mudança do pH (KHAN *et al.*, 2013).

No caso das proteínas básicas das sementes de *M. oleifera*, os primeiros artigos publicados mostraram que as massas moleculares dessas moléculas variavam entre 6,0 e 16,0 kDa. Porém, ao utilizar membranas de diálise com porosidade de 12,0 kDa sempre havia retenção de compostos floculantes, sugerindo a formação de dímeros, trímeros ou tetrâmeros (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Essa sugestão é condizente com vários outros achados. Na ausência do agente redutor, a hemaglutinina MoL de sementes de *M. oleifera* se mostrou como duas bandas de massas moleculares aparentes de 13,6 e 27,1 kDa, porém, quando esta proteína foi submetida à filtração em gel, um único pico correspondendo à massa molecular de 14,0 kDa foi obtido, sugerindo a formação de um dímero oriundo da agregação da proteína em PAGE-SDS (KATRE *et al.*, 2008). cMoL, a outra lectina de sementes de *M. oleifera* com propriedade floculante, quando submetida à filtração em gel, apresentou apenas um pico correspondendo a massa molecular de 30,0 kDa. No entanto, quando a estrutura primária desta proteína foi resolvida, foi observado que, na verdade, se tratava de uma molécula com massa molecular de 12,0 kDa. Assim, foi também sugerida a formação de oligômero, consistindo de três subunidades de 12,0 kDa (LUZ *et al.*, 2013). Adicionalmente, análise *in silico* da proteína recombinante MO_{2.1} mostrou que a forma dimérica dessa molécula seria a mais estável. Este estudo foi realizado primeiramente com o intuito de entender a discrepância de massas moleculares obtidas para esta proteína por diversas metodologias (PAVANKUMAR *et al.*, 2014). Foi também verificado que um peptídeo catiônico antibacteriano, isolado de sementes de *M. oleifera*, era capaz de formar dímeros e trímeros em SDS-PAGE (SHEBEK *et al.*, 2015). Assim, Mo-CBP₂ também pode estar sujeita a tal processo, o que explicaria as diversas massas moleculares obtidas quando utilizadas metodologias diferentes.

Semelhantemente ao observado com outras proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera*, Mo-CBP₂ apresentou-se como uma glicoproteína ao ser corada pelo reagente de Schiff, possuindo teor glicídico estimado em 4,1%. Esse percentual, no entanto, foi maior do que os verificados para Mo-CBP₃ e Mo-CBP₄, os quais compreendem cerca de 2% (PEREIRA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012). Diante dessa observação, a deglicosilação da Mo-CBP₂ foi procedida, utilizando uma mistura de enzimas capazes de remover carboidratos N- e O-ligados, a fim de saber se essa porção glicídica seria capaz de influenciar na mobilidade da proteína em

gel e, assim, de alguma forma contribuir para o entendimento nas diferenças de massas moleculares encontradas. Resumidamente, o método consistiu na retirada do carboidrato intrínseco à glicoproteína, seguida de análise por PAGE-SDS. *Mo*-CBP₂ com ou sem carboidrato apresentou a mesma massa molecular aparente, o que pode ser devido à pequena porcentagem glicídica que está proteína possui.

Na tentativa de obter dados sobre sua estrutura primária, *Mo*-CBP₂ foi submetida à digestão trípica, seguida do sequenciamento dos peptídeos gerados através de espectrometria de massas. Um total de quatro peptídeos foram gerados, correspondendo a 74 resíduos de aminoácidos, o que representa cerca de 63% da *Mo*-CBP₂, tomando como base a massa obtida por espectrometria de massas (13.160 Da). Dentre os aminoácidos observados, 2 são resíduos de cisteína, o que possibilita a formação de ponte dissulfeto e a sua quebra quando em presença de um agente redutor. Assim como verificado para as outras proteínas ligantes à quitina de *M. oleifera*, o resíduo de aminoácido mais abundante foi a glutamina, correspondendo a 31% do total dos aminoácidos propostos. Proteínas com regiões ricas em glutamina apresentam tendência a formar oligômeros. Esta agregação proteica pode ser explicada pela formação de folhas beta-pregueada, mantidas juntas por ligações de hidrogênio (PERUTZ *et al.*, 1994; MICHELITSCH; WEISSMAN, 2000; BROIN *et al.*, 2002). Este fato fornece mais subsídio à hipótese de que *Mo*-CBP₂ pode formar oligômeros, como abordado anteriormente. Além de ajudar na formação de agregados, os resíduos de glutamina estão também relacionados com a atividade floculante relatada para algumas proteínas básicas de sementes de *M. oleifera* (BROIN *et al.*, 2002; SHEBEK *et al.*, 2015).

As sequências dos quatro peptídeos da *Mo*-CBP₂ mostraram alta similaridade com as sequências de outras proteínas básicas de *M. oleifera*, incluindo *Mo*-CBP₃, MO_{2.1}, além de albuminas 2S de *Bertholletia excelsa* e *Capparis masaikai*. Em relação à albumina 2S de *M. oleifera* (*Mo*-CBP₃), todos os quatro peptídeos da *Mo*-CBP₂ apresentaram similaridade acima de 60% com pelo menos uma de suas isoformas. Os peptídeos 1, 2 e 3 alinharam melhor com a isoforma *Mo*-CBP₃-3, apresentando uma similaridade de 100%, quando utilizada a ferramenta Clustal Ômega. O peptídeo 1 se alinhou em uma região da cadeia menor (resíduos de aminoácido 1-92) da *Mo*-CBP₃. Já os peptídeos 2, 3 e 4 se alinharam em regiões constituintes da cadeia maior (resíduos de aminoácido 93-160) desta mesma proteína, aparecendo em sequência.

Adicionalmente, várias tentativas foram feitas em busca da obtenção da sequência NH₂-terminal da *Mo*-CBP₂, porém os resultados são ainda inconclusivos, provavelmente devido a algum tipo de bloqueio. Muitas proteínas de eucariontes são protegidas por bloqueio

NH₂-terminal (WELLNER; PANNEERSELVAM; HORECKER, 1990). Dentre os principais grupos que propiciam o bloqueio desta terminação destacam-se o acetil, formil e piroglutamato (BROWN; ROBERTS, 1976; COUSSOT *et al.*, 2007). A porção NH₂-terminal da *Mo*-CBP₂ pode estar sendo bloqueada por grupos piroglutamato, considerando a grande quantidade de resíduos de glutamina encontrados no sequenciamento dos peptídeos gerados a partir da digestão trípica da proteína.

Albuminas 2S, definidas de acordo com o coeficiente de sedimentação, representam o principal grupo de proteínas de reserva das sementes, vastamente distribuído nas plantas mono- e dicotiledôneas (YOULE; HUANG, 1981). Como outras proteínas de reserva, as albuminas 2S são depositadas nos corpos proteicos das sementes em desenvolvimento e utilizadas pela planta como nutriente (aminoácidos e esqueleto carbônico) durante a germinação e crescimento da plântula. Além disso, há relatos demonstrando que albuminas 2S também são ativas contra fungos (AGIZZIO *et al.*, 2006; MORENO; CLEMENTE, 2009; CÂNDIDO *et al.*, 2011). Assim, com base nesta última função creditada às albuminas 2S, a próxima etapa deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Candida* da *Mo*-CBP₂.

Existem cerca de 150 espécies de leveduras classificadas no gênero *Candida*. Destas, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* compreendem mais de 80% das espécies de *Candida* isoladas clinicamente, enquanto que *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr* são isoladas mais esporadicamente e supõe-se serem menos virulentas. A relevância dessas últimas espécies como fungos importantes para a medicina passou a ser reconhecida apenas a partir do início do século XX (PFALLER *et al.*, 2008). Estudos mais recentes mostram que espécies diferentes de *C. albicans* têm emergido como causadoras de infecções (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Em relação a *C. krusei*, esta espécie vem sendo reconhecida como um patógeno fúngico potencialmente resistente a múltiplos fármacos, devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com relatos de sensibilidade diminuída para flucitosina e anfotericina B (ABBAS *et al.*, 2000; DRAGO *et al.*, 2004; MUÑOZ *et al.*, 2005; PFALLER *et al.*, 2008).

O primeiro teste de atividade antifúngica com *Mo*-CBP₂ foi realizado utilizando as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, sendo esta última de uma cepa isolada clinicamente. *Mo*-CBP₂ inibiu o crescimento de todas as espécies testadas, sendo mais eficiente para *C. krusei* (CIM de 9,45 µM). A maior eficácia exibida por *Mo*-CBP₂ em inibir o crescimento de *C. krusei* trata-se de um dado bem relevante, com base, sobretudo, nas considerações feitas previamente em relação a essa espécie de *Candida*.

Proteínas da família das albuminas 2S também apresentaram atividade inibitória para diversas leveduras, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (RIBEIRO *et al.*, 2007; CÂNDIDO *et al.*, 2011). Albumina 2S de *Passiflora flavicarpa* (Pf-Alb) e de *Capsicum annuum* (Ca-Alb) mostraram-se eficazes em inibir o crescimento de leveduras (RIBEIRO *et al.*, 2012). Pf-Alb, com massa molecular de 13,0 kDa, inibiu em 25%, 35% e 5% o crescimento de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente, na concentração de 0,6 mg/mL (em torno de 46 μ M). Ca-Alb inibiu o crescimento de *C. tropicalis* e *C. albicans* em 21% e 27%, respectivamente, na concentração de 0,2 mg/mL (15,3 μ M). O modo de ação dessas proteínas parece envolver o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, aliado à indução da produção endógena de óxido nítrico pelas leveduras.

Em busca de conhecer o modo de ação antifúngica da Mo-CBP₂, algumas metodologias foram utilizadas, usando como modelo *C. albicans*, por ser a espécie mais conhecida desse gênero. Primeiro, foi avaliado o efeito da Mo-CBP₂ sobre a permeabilidade da membrana da levedura, utilizando iodeto de propídeo. Após 24 horas de contato da *C. albicans* com Mo-CBP₂, a membrana plasmática da levedura teve sua permeabilidade aumentada, propiciando a entrada do iodeto de propídeo.

A porosidade natural da parede celular de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, quando estão em fase de crescimento estacionário, é permeável a moléculas com massa de até 620 Da. Contudo, experimentos realizados com *S. cerevisiae* demonstraram que estando em fase de crescimento exponencial, a porosidade de sua parede celular aumenta, possibilitando a passagem de compostos com até 70,0 kDa (KLIS; DE KOSTER; BRUL, 2014). Assim, este aumento ou alteração na porosidade da parede celular poderia estar ocorrendo de maneira similar em *C. albicans*, dando acesso a Mo-CBP₂ até a camada de quitina. Este polissacarídeo funciona como uma espécie de alicerce, sendo localizada na porção mais interna da parede celular, tendo a sua frente uma camada de β -glucanos e glicoproteínas (GOW *et al.*, 2012). A interação da Mo-CBP₂ com a quitina poderia ocasionar, inclusive, a desestabilização da membrana, tratando-se também de uma estrutura celular superficial, culminando no aumento de sua permeabilidade.

Outros tipos de interações seriam também passíveis de ocorrer entre a Mo-CBP₂ e a parede celular de *C. albicans*. A parede celular de *C. albicans* possui em sua constituição ligações fosfodiésteres envolvendo cadeias laterais de carboidratos N-ligados e grupos carboxílicos de proteínas, proporcionando uma carga ligeiramente negativa. Isso faz com que moléculas catiônicas possam interagir eletrostaticamente com a parede celular, dependendo do pH do meio (KLIS *et al.*, 2009). Harris *et al.* (2009) mostraram que o efeito inibitório do

peptídeo catiônico antimicrobiano DsS3(1-16) diminui em cepas mutantes de *C. albicans* que apresentam diminuição na quantidade de fosfomananas em sua parede. Em adição, foi observado que DsS3(1-16), ao ser incubado com glucosamina-6-fosfato exógena, tem sua ação antimicrobiana diminuída frente a cepas não mutantes de *C. albicans*. A diminuição do efeito inibitório de DsS3(1-16) foi atribuída ao impedimento da ligação do peptídeo com os grupos fosfatos existentes nas fosfomananas que compõem as glicoproteínas da parede celular da levedura. Dessa maneira, visto que *Mo*-CBP₂ é uma proteína catiônica, ela também poderia interagir eletrostaticamente com os grupamentos fosfato presentes nas fosfomananas, ocasionando a desestabilização da parede celular da levedura. Esse processo culminaria em posterior aumento da permeabilidade da membrana celular de *C. albicans*.

Ainda em relação à alteração na permeabilidade da membrana de *C. albicans*, foi proposto que peptídeos catiônicos, por apresentarem carga líquida positiva, podem interagir com fosfolipídios constituintes da membrana celular, desestabilizando-a ou formando poros, culminando com o aumento de sua permeabilidade (TANIGUCHI *et al.*, 2013; CHOI; LEE, 2014). Dessa maneira, *Mo*-CBP₂ sendo uma proteína catiônica, ela também poderia apresentar o mesmo comportamento, interagindo com os fosfolipídios da membrana celular da levedura, com consequente aumento de sua permeabilidade.

Dando continuidade aos ensaios relacionados à avaliação do modo de ação antifúngica da *Mo*-CBP₂, o próximo passo foi observar a capacidade dessa proteína em induzir estresse oxidativo nas células de *C. albicans*. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode estar relacionada com o aumento da permeabilidade da membrana celular da levedura, o que seria um efeito secundário da *Mo*-CBP₂. Nistatina, um antifúngico da classe dos polienos, e que foi utilizada como controle positivo no presente estudo, agiu de maneira similar à *Mo*-CBP₂, causando inicialmente aumento na permeabilidade da membrana celular e, posteriormente, indução na produção de EROs em células de *C. albicans*. A capacidade de induzir a produção de EROs é conhecida para antifúngicos das classe dos azoles e dos polienos (MELLO *et al.*, 2011).

Havendo evidências de que *Mo*-CBP₂ teria a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular, a toxicidade às células de *C. albicans* poderia, também, ser decorrente da interação da proteína com o seu material genético, com possibilidade, inclusive, de degradação. Nesse sentido, foi investigada a capacidade da *Mo*-CBP₂ de degradar ácidos nucleicos, utilizando o plasmídeo circular pUC18 de *Escherichia coli*. O resultado obtido foi semelhante ao observado com a DNase recombinante comercial. Este resultado ratifica a atividade DNásica já demonstrada por proteínas ligantes à quitina (GUEVARA-

MORATO *et al.*, 2010; PEREIRA MENEZES *et al.*, 2014), bem como por albuminas 2S de diferentes plantas (ODINTSOVA *et al.*, 2010; TOMAR *et al.*, 2014a,b).

Embora *Mo*-CBP₂ tenha se mostrado tóxica para células de *Candida* spp., o teste de atividade hemolítica mostrou que, mesmo na maior concentração (1000 µg/mL) testada, *Mo*-CBP₂ não se mostrou capaz de romper membranas de eritrócitos de coelho. A atividade hemolítica é um dos testes utilizados com a finalidade de avaliar a segurança de uso de compostos antimicrobianos pelo homem e outros animais superiores (RAGUPATHI RAJA KANNAN *et al.*, 2013; SELLAMI *et al.*, 2013; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2015).

Os dados em conjunto mostram ser *Mo*-CBP₂ a mais nova proteína ligante à quitina isolada de sementes de *M. oleifera* com potencial em inibir diferentes espécies de *Candida*, podendo ser objeto de estudos posteriores mais aprofundados em relação ao mecanismo de ação e toxicidade, com vista a sua utilização como nova droga antimicrobiana.

8 CONCLUSÃO

Mo-CBP₂ é uma nova proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera*, básica (pI 10,9), com massa molecular de 13,2 kDa, composta por subunidades de 7,0 e 4,0 kDa, apresentando-se em múltiplas formas oligoméricas. Essa proteína possui em torno de 4,1% de carboidratos e apresenta similaridade a outras proteínas de *M. oleifera* e albuminas 2S. *Mo*-CBP₂ mostra uma promissora atividade inibitória do crescimento de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com CIM na faixa de 9,45 a 37,9 µM, provavelmente por causar alterações primárias na superfície da célula fúngica, ocasionando aumento da permeabilidade da membrana celular, indução da produção de espécies reativas de oxigênio e degradação do DNA. O uso dessa proteína como antifúngico parece ser seguro, como sugerido pelo teste de atividade hemolítica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, J.; BODEY, G. P.; HANNA, H. A.; MARDANI, M.; GIRGAWY, E.; ABI-SAID, D.; WHIMBEY, E.; HACHEM, R.; RAAD, I. *Candida krusei* Fungemia: Na Escalating Serious Infections in Immunocompromised Patients. **Internacional Medicine**, v. 160, p. 2659-2664, 200.
- ACHKAR, J.; FRIES, B. C. *Candida* Infections on the Genitourinary Tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, . 253-273, 2010.
- AGIZZIO, A. P.; CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, p. 515-522, 2006.
- AL MUBARAK, S. ROBERT, A. A.; BASKARADOSS, J. K.; AL-ZOMAN, A. A.; AL SOHAIL, A.; ALSUWIYYED, A. CIANCIO, S. The prevalence of oral *Candida* infections in periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Infection and Public Health**, v. 6, p. 296–301, 2013.
- ALNUAIMI, A. D.; WIESENFELD, D.; O'BRIEN-SIMPSON, N. M.; REYNOLDS, E. C.; MCCULLOUGH, M. J. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: A matched case-control study. **Oral Oncology**, v. 51, p. 139–145, 2015.
- ALVES-SILVA, J. M.; DOS SANTOS, S. M. D.; PINTADO, M. E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. **Food Control**, v. 32, p. 371–378, 2013.
- MAGLO, N. K.; BENNETT, R. N.; CURTO, R. B. L.; ROSA, E. A. S.; TURCO, V. L.; GIUFFRIDA, A.; CURTO, A. L.; CREA, F.; TIMPO, G. M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **FOOD CHEMISTRY**, V. 122, P. 1047–1054, 2010.
- ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internacional Medicine**, p. 1-8, 2016.
- ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. C.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, V. B.; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; CARIOLANO, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, T. G.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1–15, 2013.
- ARAÚJO, T. S.; TEXEIRA, C. S.; FALCÃO, M. A. P.; PINTO JUNIOR, V. R.; SANTIAGO, M. Q.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; MARTINS, J. L.; MOREIRA, M. S. A.; CAVADA, B. S.; CAMPESATTO, E. A.; ROCHA, B. A. M. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of chitin-binding lectin from *Canna Limbata* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1944–1955, 2013.

ARCHER, B. B. L. The proteins of *Hevea brasiliensis*. **Biochemical Journal**, v. 75, p. 236–240, 1960.

ASENSIO, J. L.; CAÑADA, F. J.; SIEBERT, H. S.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P. M.; SOEDJANAAMADJA, U.; GABIUS, H. J.; BARBERO, J. J. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemistry and Biology**, v. 7, p. 529–543, 2000.

BEN SALEM, H.; MAKKAR H. P. S. Defatted *Moringa oleifera* seed meal as a feed additive for sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 27-33, 2009.

BERROCAL-LOBO, M.; SEGURA, A.; MORENO, M.; LÓPEZ, G.; OLMEDO, F. G.; MOLINA, A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant physiology**, v. 128, p. 951–961, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BREMENKAMP, R. M.; CARIS, A. R.; JORGE, A. O. C.; BACK-BRITO, G. N.; MOTA, A. J.; BALDUCCIP, I.; BRIGHENTI, F. L.; ITO, C, Y. K. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 549–555, 2011.

BROIN, M.; SANTELLA, C.; CUINE, S.; KOKOU, K.; PELTIER, G.; JOÛET, T. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 114–119, 2002.

BROWN, J. L.;ROBERTS, W. K. Evidence that Approximately Eighty per Center of the Soluble Proteins of Ehrlich Ascites Cells Are N^{α} - Acetylated. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 1009-1014, 1976.

CACERES, A.; SARAIVA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; DE LEON, L.; NAVE, F. **Journal of Ethopharmacology**, v. 36, p. 233-236, 1992.

CAMPOS, M. D. A.; SILVA, M. S.; MAGALHÃES, C. P.; RIBEIRO, S. G.; SARTO, R. P. D. VIREIRA, E. A.; SÁ, M. F. G. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. **Microbial cell factories**, v. 7, p. 1–10, 2008.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.;SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327–1333, 2004.

CÂNDIDO, E. S.; PINTO, M. F.; PELEGRINI, P. B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N; . Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 1-16, 2011.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M.

V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 291–321, 2009.

CASSONE, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. **Nature reviews Microbiology**, v. 11, p. 884–91, 2013.

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, p. 130–180, 1998.

CHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 253–273, 2010.

CHOI, H.; LEE, D. G. Antifungal activity and pore-forming mechanism of astacidin 1 against *Candida albicans*. **Biochimie**, v. 105, p. 58–63, 2014.

CHOW, J. K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, p. 1206–1213, 2008.

CHOUDHARY, N. K.; BODAKHE, S. H.; GUPTA S. K. Assessment of Antiulcer Potential of *Moringa oleifera* Root-Bark Extract in Rats. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, p. 214–220, 2013.

CHRISTOFFERSEN, H. F.; HANSEN, S. K.; VAD, B. S.; NIELSEN, E. K.; NIELSEN, J. T.; VOSEGAARD, T.; SKRYDSTRUP, T.; OTZEN, D. E. The natural, peptaibolic peptide SPF-5506-A4 adopts a β -bend spiral structure, shows low hemolytic activity and targets membranes through formation of large pores. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, p. 882–889, 2015.

CHUANG, P. H.; LEE, C. W.; CHOU, J. Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B. J.; CHEN, H. M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, v. 98, p. 232–236, 2007.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K. U. S. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439–446, 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution. April, 2008.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature reviews Microbiology**, v. 6, p. 187–198, 2008.

COUSSOT, G.; HAWEK, D. H.; MULARZ, A.; KOOMEN, J. M.; KOBAYASHI, M. A method for the isolation of blocked N-terminal peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p.

302–304, 2007.

CRUZ, M. C.; GONZÁLEZ, A. V.; BACA, E. R.; NOVELO, B. M.; ROMERO, E. L.; CASTRO, J. C. V. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: A review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 2513–2527, 2012.

CUI, F.; LI, Y. H.; XAN, X. Y.; YANG, Y.; SUN, W. J.; QIAN, J. Y.; ZHOU, Q.; YU, S. L. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor hemagglutinating glycoprotein from the cultured mycelia *Herichium erinaceus*. **Process Biochemistry**, p. 684–690, 2014.

DA SILVA, C. R.; ANDRADE NETO, J. B.; SIDRIM, J. J. C.; ÂNGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. L. F.; CAVALCANTI, B. C.; BRILHANTE, R. S. N.; MACEDO, D. S.; MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; NOBRE JÚNIOR, H. V. Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1691-1700, 2013.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Non-*albicans Candida* Infection: An Emerging Threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1-7, 2014

DEVENDRA, B. N.; SRINIVAS, N.; TALLURI, V. S. S. L. T.; LATHA, P. S. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam., leaf extract, against selected bacterial and fungal strains. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 13–18, 2011.

DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. S. F.; DA CUNHA, M.; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 233–246, 2011.

DRAGO, M.; SCALTRITO, M. M.; MORACE, M.; GISA GROUP. *In vitro* activity of voriconazol and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 619-624, 2004.

DUBOIS, K. A. M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMILTH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EGGIMANN, P.; QUE, Y. A.; REVELLY, J. P.; PAGINI, J. C. Preventing invasive *Candida* infections . Where could we do better ? **Journal of Hospital Infection**, p. 1–7, 2014.

FAKURAZI, S.; SHARIFUDIN, S. A.; ARULSELVAN, P. *Moringa oleifera* Hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. **Molecules**, v. 17, p. 8334–8350, 2012.

FERREIRA, P. P. M.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U.; *Moringa oleifera* : bioactive compounds and nutritional potential *Moringa oleifera* : compostos bioativos e potencialidade nutricional. **Revista de Nutricao**, v. 21, p. 431–437, 2008.

FRANCIS, J. A.; JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin Secretagogues from *Moringa oleifera* with Cyclooxygenase Enzyme and Lipid Peroxidation Inhibitory Activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 317–326, 2004.

FRANCOIS, I. E. J. A.; CAMUUE, B. P. A.; BORGERS, M.; AUSMA, J.; DISPERSYN, G. D.; THEVISSSEN, K. Azoles: Mode of Antifungal Action and Resistance Development. Effect of Miconazole on Endogenous Reactive Oxygen Species Production in *Candida albicans*. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 3–13, 2006.

FREIRE, J. E. C.; VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B. M. B.; BATISTA, A. B.; LOBO, M. D. P.; PEREIRA, M. L.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M.; SOUZA, A. J. S.; MOREIRA, A. C. O. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B. *Mo*-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PloS one**, v. 10, p. 1-24, 2015.

GALLÉ, F.; COLELLA, G.; ONIFRIO, V.; ROSSIELLO, F.; ANGELILLO, I. F.; LIGOURI, G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. **The new microbiologica**, v. 36, p. 283–288, 2013.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 106–109, 2006.

GANESAN, L. T.; MANAVATU, E. K.; CUTRIGHT, J. L.; ALANGADEN, G. J.; CHANDRASEKAR, . H. *In vitro* activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 961–966, 2004.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **PeptideScience**, v. 98, p. 406–415, 2012.

GILANI, A. H.; AFTLAB, K.; SURIA, A.; SIDDIQUI, S.; SALEM, R.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 87-91, 1994.

GIOVANINI, M. P.; SALTZMANN, K. D.; PUTHOFF, D. P.; GONZALO, M.; OHW, H. W.; WILLIAMS, C. E. A novel wheat gene encoding a putative chitin-binding lectin is associated with resistance against Hessian fly. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 69-82, 2007.

GIZZIO, A. P.; CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. S. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from *Passion fruit* seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, p. 515–522, 2006.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M.

G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672–679, 2012.

GOMES, P. D.; SANTOS, I. S.; MELO, E. O.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; SOUZA-FILHO, G. A.; CUNHA, M.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, B. S.; GOMES, V. M. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090–2100, 2008.

GONG, X.; LUAN, T.; WU, X.; LI, G.; QIU, H.; KANG, Y.; QIN, B.; CUI, W.; QIN, Y.; LI, J.; ZANG, B. Invasive candidiasis in intensive care units in China: Risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* infections. **American Journal of Infection Control**, v. 44, p. 59–63, 2016.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients Proteomics and 2-DE. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037–1053, 2000.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L. V.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 112–122, 2012.

GOWRISHANKAR, R.; KUMAR, M.; MENON, V.; DIVI, S. M.; SARAVANAN, M.; MAGUDAPATHY, P.; PANIGRAHI, B. K.; NAIR, K. G. M.; VENKATARAMANIAN, K. Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. **Biological Trace Element Research**, v. 133, p. 357–363, 2010.

GUPTA, R.; MATHUR, M.; BAJAJ, V. K.; KATARIYA, P.; YADAV, S.; KAMAL, K.; GUPTA, R. S. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 4, p. 164–171, 2012.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-ŁATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers-The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophysical Chemistry**, v. 123, p. 154–161, 2006.

HAMMARSKJÖLD, F.; MERNELIUS, S.; ANDERSON, R. S.; BERG, S.; HANBERG, H.; LÖFGREN, S.; MALMVAL, B. E.; PETZOLD, M.; MATUSSEK, A. Possible transmission of *Candida albicans* on an intensive care unit: genotype and temporal cluster analyses. **Journal of Hospital Infection**, v. 85, p. 60–65, 2013.

HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345–355, 2010.

HARRIS, M.; MONTES, H. M. M.; GOW, N. A. R.; COOTE, P. J. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. **Microbiology**, v. 155, p. 1058–1070, 2009.

HAYASHI, A. M.; BIZERRA, F. C.; DA SILVA JUNIOR, P. I. Antimicrobial compounds from natural sources. **Frontier in Microbiology**, v. 4, p. 1, 2013.

HERNÁNDEZ-BLANCO, C.; FENG, D. X.; HU, J.; VELLETT, A. S.; DESLENDES, L.; LLORENT, F.; LOBO, M. B.; KELLER, H.; BARLET, X.; RODRÍGUEZ, C. S.; ANDERSON, L. K.; SOMERVILLE, S.; MARCO, Y.; MOLINA, A. Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. **The Plant cell**, v. 19, p. 890–903, 2007.

HUANG, X.; XIE, W. J.; GONG, Z. Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v. 478, p. 123–126, 2000.

HUKKERI, V. I.; NAGATHAN, C. V.; KARADI, S. V.; PATIL, B. S. Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* lam. in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 124–126, 2006.

ISAAC KIRUBAKARAN, S.; BEGUM, S. M.; ULAGANATHAN, K.; SAKTHIVEL, N. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 918–927, 2008.

JAFARAIN, A.; ASGHARI, G.; GHASSAMI, E. Evaluation of cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. callus and leaf extracts on Hela cells. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 1–5, 2014.

JHA, S.; CHATTOO, B. B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. **Transgenic Research**, v. 19, p. 373–384, 2010.

JAISWAL, D.; RAI, P. K.; KUMAR, A.; METHA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392–396, 2009.

JUNG, I. L. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, p. 120–128, 2008.

KANOKWIROON, K.; TEANPAISAN, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; HOOPER, A. B.; WITITSUWANNAKUL, R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses**, v. 51, p. 301–307, 2008.

KATIYAR, S. K.; IZQUIERDO, A. A.; HEALY, K. R.; JOHNSON, M. E.; PERLIN, D. S.; EDLIND, T. D. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 6304–6309, 2012.

KATRE, U. V.; SURESH, C. G.; KHAN, M. I.; GAIKWAD, S. M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203–207, 2008.

KHAN, J. M.; QADEER, A.; AHMADE, E.; ASHRAF, R.; BHUSHAN, B.; CHATURVEDI, S. K.; RABBANI, V.; KHAN, R. H. Monomeric Banana Lectin at Acidic pH Overrules

Conformational Stability of Its Native Dimeric Form. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1–12, 2013.

KIM, Y. J.; JANG, M. G.; KNOW, W. S.; KIM, S. Y.; YANG, D. C. Cloning and characterization of pathogenesis-related protein 4 gene from *Panax ginseng*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, p. 664–671, 2014.

KLAFKE, G. B.; MOREIRA, G. M. S. G.; MONTE, L. G.; PEREIRA, J. L.; BRANDOLT, T. M.; XAVIER, M. O.; GADELHA, T. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; PINTO, L. S. Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, v. 175, p. 147–151, 2012.

KLIS, F. M.; Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. **FEMS Yeast Research**, p. 1–16, 2009.

KLIS, F. M.; DE KOSTER, C. G.; BRUL, S. Cell Wall-Related Bionumbers and Bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, p. 2–9, 2014.

KOO, J. C.; LEE, B.; YOUNG, M. E.; KOO, S. C.; COOPER, J. A.; BAEK, D.; LIM, C. O.; LEE, S. Y.; YUN, D. J.; CHOO, M. J. *Pn*-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. **Plant & cell physiology**, v. 45, p. 1669–1680, 2004.

KUMAR, S.; KAPOOR, V.; GILL, K.; SINGH, K.; XESS, I.; DAS, S. N.; DEY, S. Antifungal and antiproliferative protein from *Cicer arietinum*: A bioactive compound against emerging pathogens. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

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

LI, S. S.; CLAESON, P. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, v. 63, p. 249–255, 2003.

LIN, P.; WONG, J. H.; NG, T. B. A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. **Bioscience reports**, v. 30, p. 101–109, 2010.

LIU, J.; SHI, C.; WANG, Y.; LI, W. J.; YUE, Z.; XIANG, M. J. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from. **Research in Microbiology**, p. 1–9, 2015.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, 2002, p. 346–347.

LORTHOLARY, O.; PETROKKOS, G.; AKOVA, M.; ARENDRUP, M. C.; AKDAGLI, S. A.; BASSETTI, M.; BILLE, J.; CALANDRA, T.; CASTAGNOLA, E.; CORNRLY, O. A.; ESTRELA, M. C.; DONNELLY, J. P.; GARBINO, J.; GROLL, A. H.; HERBRETCH, R.; HOPE, W.W.; JESEN, H. E.; KULLBERG, B. J.; FLÖRL, C. L.; MEERSSEMAN, W.; RICHARDSON, M. D.; ROILIDES, E.; VERWEIJ, P. E.; VISCOLI, C.; ULLMANN, A. J. Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Patients with HIV infection or AIDS. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 68–77, 2012.

LU, H. C.; LIN, J. H.; CHUA, A. C. N.; CHUNG, T. Y.; TSAI, I. C.; TZEN, J. T. C.; CHOU,

W. M. Cloning and expression of pathogenesis-related protein 4 from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes associated with ribonuclease, chitinase and anti-fungal activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 1–13, 2012.

LUQMAN, S.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; MAURYA, A. K.; CHANDA, D. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using in vitro and in vivo assays. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

LUZ, L. D. A.; SILVA, M. C. C.; FERREIRA, R. S.; SANTANA, L. A.; LUCCA, R. A. S.; MENTELE, R.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31–36, 2013.

MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 183–186, 2010.

MANAHEJI, H.; JAFARI, S.; ZARINGHALAM, J.; REZAZADEH, S.; TAGHIZADFARID, R. Analgesic effects of methanolic extract of the leaf or root of *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, p. 216–222, 2011.

MARTINS, N.; FERREIRA, I. C. S. F.; BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Plants used in folk medicine : The potential of their hydromethanolic extracts against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 62–67, 2015.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, p. 251–264, 2013.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic Fungal Infections Caused by *Candida* Species : Epidemiology , Infection Process and Virulence Attributes. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 863–874, 2005.

MELLO, E. O.; RIBEIRO, S. F. F.; CARVALHO, A. O.; SANTOS, I. S.; CUNHA, M.; CATARINA, C. S.; GOMES, V. M. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1209–1217, 2011.

MENDIETA, J. R.; PAGANO, M. R.; MUÑOZ, F. F.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology**, v. 152, p. 2039–2047, 2006.

MICHELITSCH, M. D.; WEISSMAN, J. S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11910–11915, 2000.

MIURA, K.; FURUMOTO, T. Cold signaling and cold response in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 5312–5337, 2013.

- MOHAMEDY, R. S. R. EL; ABDALLA, A. M. Evaluation of antifungal activity of *Moringa oleifera* extracts as natural fungicide against some plant pathogenic fungi In-vitro. **Journal of Agricultural Technology**, v. 10, p. 963–982, 2014.
- MONTRAVERS, P.; MIRA, J. P.; GANGNEUX, J. P.; LEROY, O.; LORTHOLARY, O. A multicentre study of antifungal strategies and outcome of *Candida* spp. peritonitis in intensive-care units. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1061–1067, 2011.
- MONTEIRO, S.; BARAKAT, M.; PEREIRA, M. A. P.; TEXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, p. 1505–1512, 2003.
- MORATO, M. Á. G.; LACOPA, M. G.; LUQUE, I. G.; SERRA, M. T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 12, p. 3259–3271, 2010.
- MORIO, F.; PAGNIEZ, F.; LACROIX, G.; MIEGEVILLE, M.; PAPE, P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: Characterization of two novel mutants with impaired virulence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2131–2138, 2012.
- MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S Albumin Storage Protein: What Makes them Food Allergens? **The Open Biochemistry Journal**, v. 2, p. 16-28, 2008.
- MUÑOZ, P.; GANDIA, M.; HARRIES, E.; CARMONA, L.; READ, N. D.; MARCOS, J. F. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in single general hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 188-193, 2005.
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. ACTIVE AGENTS AND MECHANISM OF COAGULATION OF TURBID WATERS USING *Moringa oleifera* ANSELME. **Water Research**, v. 29, p. 703–710, 1995.
- NIKKON, F.; SAUD, Z. A.; RAHMAN, M. H.; HAQUE, E. *In vitro* Antimicrobial Activity of the Compound Isolated from Chloroform Extract of *Moringa oleifera* Lam. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 1888–1890, 2003.
- NKYA, J. W.; ERASTO, P.; KILAMBO, D.; CHACHA, M. *In vitro* evaluation of antifungal activity of *Moringa oleifera* Lam extracts against coffee wilt pathogen, *Gibberella xylarioides* Heim and Saccas. **American Journal of Research Communication**, v. 2, p. 53–62, 2014.
- NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 173-178, 2012.
- NORGAARD, M.; THOMSEN, R. W.; FARKAS, D. K.; MOGENSEN, M. F.; SORENSEN, H. T. *Candida* infection and cancer risk: A Danish nationwide cohort study. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, p. 451–455, 2013.
- ODINTSOVA, T. I.; VASSILEVSKI, A. A.; SLAVOKHOTAVA, A. A.; MULSPYAVOK, A.

K.; FINKINA, E. L.; KHADEEVA N. V.; ROGOZHIN, E. A.; KOROSTYLEVA, T. V.; PULHALSKY, V. A.; GRISHIN, E. V.; EGOROV, T. A. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. **FEBS Journal**, v. 276, p. 4266–4275, 2009.

ODINTSOVA, T. I.; ROGOZHIN, A. E.; SKLYAR, I. V.; MULSOLYAMOV, A. K.; KUDRYAVTSEV, A. M.; PUKHALSKY, A. N.; SMIRNOV, A. N.; GRISHIN, E. V.; RGOROV, T. A. Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. **Protein and peptide letters**, v. 17, p. 522–529, 2010.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and Characterisation of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seeds by salt solution. **Water Research**, v. 32, p. 781-791, 2001.

ONSORE, J. G.; ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from of *Moringa oleifera* seeds coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* and *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 313-325, 2015.

PAL, S. K.; MUKHERJEE, P. K.; SAHA, B. P. Studies on the Antiulcer Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Gastric Ulcer Models in Rats. **Phytotherapy Research**, p. 463,1995.

PALUSZYNSKI, J. P.; KLASSEN, R.; MEINHARDT, F. Genetic prerequisites for additive or synergistic actions of 5-fluorocytosine and fluconazole in baker's yeast. **Microbiology**, v. 154, p. 3154–3164, 2008.

PATEL, P. K.; ERLANDSEN, J. E.; KIRKPATRICK, W. R.; BERG, D. K.; WESTBROOK, S. D.; LOUDEN, C.; CORNEL, J. E.; THOMPSON, G. R.; VALLOR, A. C.; WICKES, B. L. WIEDERHOLD, N. P.; REDDING, S. W.; PATTERSON, T. F. The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy. **AIDS Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

PATEL, P.; PATEL, N.; PATEL, D.; DESAI, S.; MESHAN, D. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *MORINGA OLEIFERA*. **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 5, p. 144–147, 2014.

PAVANKUMAR, A.; KAYATHRI, R.; MURUGAN. N.; ZHANG, Q.; SRIVASTAVA, V.; OKOLI, C.; BULONE, V.; RAJARAO, G.; AGREN, H. Dimerization of a flocculent protein from *Moringa oleifera*: experimental evidence and *in silico* interpretation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, p. 406-415, 2014.

PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T.; GIFONI, J. M.; ROCHA, R. O.; SOUZA, D. O.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, p. 1078–1085, 2011.

PEREIRA MENEZES, S.; SILVA, E. M. A.; LIMA, E. M.; SOUZA, A. O.; ANDRADE, B. S.; LEMOS, L. S. L.; GRAMACHO, K. P.; GESTEIRA, A. S.; PIROVANI, C. P.; MICHEMI, F. The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca(2+) and Mg(2+) dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. **BMC plant biology**, v. 14, p. 2–21, 2014.

PERLIN, D. S. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, p. 568–573, 2009.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future microbiology**, v. 6, p. 441–457, 2011.

PERUTZ, M. F.; JOHNSON, T.; SUZUKI, M.; FINCH, J. T. Glutamine repeats polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 5355–5358, 1994.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BROMW, S. D.; LOCKHART, S. R.; MOTYL, M.; PERLIN, D. S. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, p. 164–176, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBIS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 46, p. 515–521, 2008.

PHARM, R. E. L. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic proceedings**, v. 86, p. 805–817, 2011.

PIRES, R. H.; BRUGNERA, M. F.; ZANONI, M. V. B.; GIANNINI, M. J. S. M. Effectiveness of photoelectrocatalysis treatment for the inactivation of *Candida parapsilosis* sensu strictu in planktonic cultures and biofilms. **Applied Catalysis A: General**, v. 511, p. 149–155, 2016.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species levels unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 144–162.

PORTO, W. F.; SOUZA, V. A.; NOLASCO, D. O.; FRANCO, O. L. *In silico* identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, p. 127–136, 2012.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v. 34, p. 276–283, 1980.

KANNAN, R. R. R.; ARUMUGAM, R.; LYAPPARAJ, P.; THANGARADJOU, T.; ANANTHARAMAN, P. *In vitro* antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrasses from the Gulf of Mannar, South India. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1484–1489, 2013.

RATHER, I. A. AWASTHI, P.; MAHAJAN, P.; BEDI, Y. S.; VISHWAKARMA, R. A.; GANDHI, S. G. Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. **Gene**, v. 558, p. 143–151, 2015.

REGENTE, M. TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M. M.; TICCHI, A. J.; DIZ, M.

S. S.; CARVALHO, A. O.; CANAL, L.; GOMES, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**, v. 69, p. 88–95, 2014.

REISFELD, R. A., LEWIS, U. J., WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281–283, 1962.

RIBEIRO, S. F. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; RABELO, G.; MELLO, E. O.; CATARINA, C. S.; RODRIGUES, R.; GOMES, V. M. *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 657–670, 2012.

ROWN, J. L.; ROBERTS, W. K. Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are Nalpha-acetylated. **The Journal of biological chemistry**, v. 251, p. 1009–1014, 1976.

RUCKMANI, K.; ANANDAN, S. K. R.; JAYKAR, B. Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 33–35, 1997.

RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M. C.; VALENTIN, E.; SENTANDREU, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 14–29, 2006.

SAMPIETRO, A. R.; ISLA, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. fruits. **Plant Science**, v. 160, p. 659–667, 2001.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiol.**, v. 41, p. 295–310, 1995.

SANITÁ, P. V.; ZAGO, D. E.; MIMA, E. G. O.; PAVARINA, A. C.; JORGE, J. H.; MACHADO, A. L.; VERGANI, C. E. *In vitro* evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* spp. isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 118, p. 84–91, 2014.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. C. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504–508, 2009.

SANTOS, I. S.; CUNHA, M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: Purification, characterisation and immunolocalisation. **Plant Science**, v. 167, p. 1203–1210, 2004.

SASHIDHARA, K. V.; ROSAIAH, J. N.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R.; RAJENDRA, S. M. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 432–436, 2009.

SAYEED, M. A.; HOSSAIN, M. S.; CHOWDHURY, M. E. H.; HAQUE, M. *In vitro* Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam. Fruits. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Vol. 1, 4, p. 94-98, 2012.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, p. 368–379, 1987.

SCHELENZ, S. Management of candidiasis in the intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 31–34, 2008.

SELLAMI, M.; CHÂARI, A.; AISSA, I.; BOUAZIZ, M.; GARGOURI, Y.; MILED, N. Newly synthesized dopamine ester derivatives and assessment of their antioxidant, antimicrobial and hemolytic activities. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1481–1487, 2013.

SERHAN, G.; STACK, S. M.; PERRONE, G. G.; MORTON, C. O. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, p. 1–4, 2014.

SERRANO-FUJARTE, I.; ROMERO, E. L.; LÓPEZ, G. E. R.; GÁMEZ, M. A. M.; GONZÁLEZ, A. V.; CRUZ, M. C. Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

SEYEDMOUSAVI, S.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; BRÜGGEMANN, R. J. M.; VERWEIJ, P. L. The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: From the bench to the bedside. **Drug Resistance Updates**, v. 17, p. 37–50, 2014.

SHARMA, V.; PALIWAL, R.; PRACHETA.; SHARMA, C. **Internationale pharmaceutica scientia**, v. 2, p. 54-61, 2012.

SHEBEK, K.; SCHANTEZ, A. B.; SINES, I.; LAUSER, K.; VELEGOL, S.; KUMAR, M. The Flocculating Cationic Polypeptide from *Moringa oleifera* Seeds Damages Bacterial Cell Membranes by Causing Membrane Fusion. **Langmuir**, v. 31, p. 4496–4502, 2015.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; DUARTE, A.; MENDONÇA, D. I.; DOMINGUES, F. C. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 19, p. 42-47, 2011.

SOLÍS-MUÑOZ, P.; LÓPEZ, J. C.; BERNAL, W.; WILLAR, C.; VERMA, A.; HENEGHAN, M. A.; WENDON, J.; AUZINGER, G. Voriconazole hepatotoxicity in severe liver dysfunction. **Journal of Infection**, v. 66, p. 80–86, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

SREELATHA, S.; PADMA, P. R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 303–

311, 2009.

SWOBODA-KOPÉČ, E.; SIKORA, M.; GOLAS, M.; PISKORSKA, K.; GOZDOWSKI, D.; NETSVYEVA, I. *Candida nirvariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. **Mycosis**, v. 57, p. 747-753, 2014.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, p. 189–196, 2005.

TAN, Y.; LEONHARD, M.; MOSER, D.; STICKLER, B. S. Antibiofilm activity of carboxymethyl Chitosan on the biofilm of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 77-82, 2016.

TANIGUCHI, M.; IKEDA, A.; NAKAMICHI, S.; ISHIYAMA, Y.; SAITOH, E.; KATO, T.; OCHIAI, A.; TANAKA, T. Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical octadecapeptide derived from heat shock protein 70 of rice. **Peptides**, v. 48, p. 147–155, 2013.

TEIXEIRA DE FREITAS, C. D.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 738–743, 2011.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 437–455, 2004.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida species*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1173–1182, 2011.

TOMAR, P. P. S.; NIKHIL, A.; SINGH, A.; SELVAKUMAR, P.; ROY, P.; SHARMAR, A. S. Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, p. 349–354, 2014a.

TOMAR, P. P. S.; CHAUDHARY, N. S.; MISHRA, P.; GAHLOTH, D.; PATEL G. K.; SELVAKUMAR, P.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification, Characterisation and Cloning of a 2S Albumin with DNase, RNase and Antifungal Activities from *Putranjiva Roxburghii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 471–482, 2014b.

TRINDADE, M. B.; POLES, J. L. S.; COSTA, A.S.; MOREIRA, A. C. M.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. R. V.; BELTRAMINE, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146–152, 2006.

ULLAH, A.; MARIUTTI, R. B.; MASSOD, R.; CARUSO, I. P.; COSTA, G. H. G.; FREITA, C. M.; SANTOS, C. R.; ZANPHORLIN, L. M.; MUTTON, M. J. R.; MYRAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 1-7, 2015.

VAN DEN BERGH, K. P. B.; PROOST, P.; DAMME, J. V.; COOSEMANS, J.; DAMME, E.

J. M. V.; PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Letters**, v. 530, p. 181–185, 2002.

VAN DER MEER, J. W. M.; VEERDONK, F. L. V.; JOOSTEN, KULLBERG, B. J.; L. A. B.; NETEA, M. G. Severe *Candida* spp. infections: New insights into natural immunity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 58–62, 2010.

VAN DER WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 3545–3570, 2013.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

VINCENT, B. M.; LANCASTER, A. K.; SHOUVAL, R. S.; WHITSELL, L.; LINDQUIST, S. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. **PLoS Biology**, v. 11, p. 1–17, 2013.

WADHWA, S.; PANWAR, M. S.; SAINI, N.; SINGHAL, L. S. A review on commercial, traditional uses phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. **Global Journal of Traditional Medicinal Systems**, v. 2, p. 1-13, 2013.

WANG, S.; YE, X.; CHEN, J.; RAO, P. A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. **Food Research International**, v. 45, p. 116–122, 2012.

WELLNER, D.; PANNEERSELVAM, C.; HORECKER, B. L. Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 1947–1949, 1990.

YAN, J. Y.; LU, N. X.; MEI, T. Q.; YAN, Z. S.; YAN, Z. Ketoconazole associated hepatotoxicity: a systematic review and meta-analysis. **Biomedical and environmental sciences**, v. 26, p. 605–10, 2013.

YAO, Q.; WU, C. F.; LUO, P.; XIANG, X. C.; MOU, L.; BAO, J. K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477–1485, 2010.

YASSA, H. D.; TOHAMY, A. F. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. **Acta Histochemica**, v. 116, p. 844–854, 2014.

YOKOYAMA, S.; LIDA, Y.; KAWASAKI, Y.; MINAMI, Y.; WATANABE, K.; YAGI, F. The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. **Journal of Peptide Science**, v. 15, p. 492–497, 2009.

YOULE, R.; HUANG, A. H. C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage protein in oilseeds of diverse species. **American Journal of Botany**, v. 68, p. 44-48, 1981.

ZHANG, J.; KOPPARAPU, N. K.; YAN, Q.; YANG, S.; JIANG, Z. Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1225–1232, 2013.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; ZHAO, Y.; ZOU, Y.; CHENG, J. Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 444–450, 2002.

ZHANG, L.; SHE, X.; MERENSTEIN, D.; WANG, C.; HAMILTON, .; BLACKMON, A.; HU, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Fluconazole Resistance Patterns in *Candida* Species that Colonize Women with HIV Infection. **Current Therapeutic Research**, v. 76, p. 84–89, 2014.

ZOTTICH, U.; CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C. M.; SANTOS, I. S.; NASCIMENTO, V. V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 375–383, 2011.