



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA

RAYANNE MARIA VITÓRIA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Microgramma vacciniifolia*: PURIFICAÇÃO
DE PROTEASES DO RIZOMA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE LECTINA DA FRONDE**

RECIFE

2020

RAYANNE MARIA VITÓRIA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Microgramma vacciniifolia*: PURIFICAÇÃO
DE PROTEASES DO RIZOMA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE LECTINA DA FRONDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Rayanne Maria Vitória Vasconcelos de
Potencial biotecnológico de *Microgramma vacciniifolia* : purificação de proteases do rizoma e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina da fronde / Rayanne Maria Vitória Vasconcelos de Oliveira. - 2022.

72 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.
Coorientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. Enzimas de fungos. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Lectina. I. Napoleão, Thiago Henrique (orientador). II. Pontual, Emmanuel Viana (coorientador). III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-101

RAYANNE MARIA VITÓRIA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Microgramma vacciniifolia*: PURIFICAÇÃO
DE PROTEASES DO RIZOMA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE LECTINA DA FRONDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 04 /12 /2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Thamara Figueiredo Procópio (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

**Gostaria de dedicar essa dissertação à
minha mãe Telma Vitória da Silva, ao
meu pai (*in memoriam*) Carlos Roberto
Vasconcelos de Oliveira e aos meus
irmãos Carlos Roberto Vasconcelos de
Oliveira Júnior e Victor Vitória
Vasconcelos de Oliveira.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pelo dom da vida, saúde, força para sustentar as dificuldades ao longo da minha trajetória, ao amor incondicional da minha família e por colocar no meu caminho pessoas especiais.

Agradeço à minha mãe, que esteve ao meu lado durante toda a trajetória escolar, Graduação e Mestrado, incentivando sempre a subir o próximo degrau, sempre acreditando e aguardando a colheita dos meus frutos como pessoa e profissional. Obrigada, Mãe, por referir a mim sempre com muito orgulho, saiba que não teria chegado até aqui se não fosse você.

Agradeço ao meu pai, que não está mais entre nós, mas foi um dos principais incentivadores da educação na minha vida, aquele que dizia as frases, incansavelmente: “Maria, você tem que estudar para não precisar de ninguém, o estudo é tudo, ninguém pode tirar isso de você”; “Aproveite enquanto eu estou vivo e posso ajudar, um pouco que seja”. Saiba, Pai, que você foi a minha fonte de força maior para alcançar os meus objetivos e sonhos. Infelizmente, você faleceu quando eu estava prestes a ingressar na faculdade e não pudemos comemorar como você tanto sonhava, mas sei que você já sabia que eu conseguiria.

Agradeço aos meus irmãos Carlos Oliveira e Victor Oliveira pela parceria da vida, dos caminhos compartilhados e por estenderem as mãos quando eu precisei durante todo esse tempo. Tenho orgulho das pessoas que se tornaram e rezo para Deus para iluminar o caminho de vocês.

Agradeço à minha família que é enorme e ficaria difícil citar todos aqui, para não correr o risco de esquecer alguém. Sintam-se todos abraçados, sou muito grata pelas palavras de incentivo, amor, carinho, pelos olhares orgulhosos e encontros divertidos em família.

Agradeço ao meu namorado Marcos pelo amor, respeito, companheirismo, ombros e momentos felizes e tristes que compartilhamos e temos compartilhado durante muito tempo. Sem a sua alegria e força muitas situações teriam sido mais difíceis, gratidão por deixar a minha vida mais leve.

Agradeço aos meus amigos da Graduação, que são pessoas maravilhosas, cada um com o seu jeitinho especial, mas que fizemos das diferenças uma união em diversos momentos difíceis. Muito obrigada a todos vocês por me proporcionarem momentos incríveis que levarei para o resto da vida. São inúmeras lembranças

durante esses 4 anos, formamos uma família e tenho orgulho de cada um de vocês: Bruno Vinicius, Pedro Vítor, Paloma Maria, Marília Cruz, Sanmiris Lopes, Camila Alcântara, Luzia Abílio, Raiza Lucena, Jucielma Lima, João Carlos, Júlia Carmem, Thiago Félix e Elivelton Veríssimo. Alguns migraram para outros cursos, mesmo assim mantemos contato e o carinho sempre foi o mesmo. Obrigada Cláudio, Paulinho, Renata e Ninho.

Agradeço a Jucielma Lima, minha amiga de todas as horas, aquela que concorreu junto a mim na seleção do Mestrado, estudou comigo, dividiu momentos difíceis durante esses anos, abriu a porta da sua casa para me acolher quando eu precisei, mas no final de tudo temos muitas histórias engraçadas para contar.

Agradeço a Paloma pela ajuda, conversas jogadas fora durante os intervalos que tínhamos nos experimentos, pelas saídas para rir até a barriga doer e pela união e fortalecimento de nossa amizade cada vez mais.

Agradeço a João Carlos, Luzia Abílio, Raiza Lucena, Thiago Félix e Camila Alcântara que ingressaram em mestrados diferentes, mas nos encontrávamos sempre no Departamento de Bioquímica ou no Centro de Biociências para conversar, na maioria das vezes um olhar carinhoso e um sorriso já bastava, quando não tínhamos tempo, na correria da vida.

Agradeço ao meu orientador Thiago Henrique Napoleão pela oportunidade, disponibilidade e parceria.

Agradeço ao meu coorientador Emmanuel Viana Pontual pela oportunidade, abraços e sorrisos sempre que nos encontrávamos pela Universidade.

Agradeço a todos os professores e professoras que passaram na minha vida. Muita gratidão pelos conhecimentos, pela força, dedicação e amizade.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (BIOPROT) pela ajuda nos experimentos, especialmente a Robson Vasconcelos, Dayvid Silva, Isabella Coimbra, Leyde Patriota, Pollyanna Silva, Gustavo Ferreira, Caio Guedes e Carlos Sales (Bob). Muito obrigada, sem vocês as atividades no laboratório seriam mais difíceis.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter me concedido uma bolsa de estudos, sem a qual minha formação não seria possível.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e que sempre torceram por mim.

“I was taught that the way of progress is neither swift nor easy”

(Marie Curie)

RESUMO

As proteases são enzimas que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas e são responsáveis por quase 60% do mercado de enzimas industriais, com aplicação nas indústrias de detergentes, de couro, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos. Já as lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico de ligação reversível a carboidratos específicos, apresentando diversas atividades biológicas. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) é uma planta epífita que possui propriedades medicinais, por exemplo, no tratamento de infecções respiratórias. Uma lectina (MvFL) foi previamente purificada da fronde e atividade proteolítica foi detectada em extrato do rizoma dessa planta. Este trabalho descreve a obtenção e caracterização de uma preparação de rizoma de *M. vacciniifolia* contendo proteases a partir do rizoma de *M. vacciniifolia*, bem como a avaliação do potencial antifúngico e antibiofilme de MvFL contra *Candida*. Proteínas do rizoma foram extraídas em tampão Tris e atividade proteolítica foi determinada usando azocaseína como substrato. O extrato foi então cromatografado em coluna de DEAE-Sephadex e o pico (P2) de proteínas adsorvidas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas ou desnaturantes. A atividade proteolítica de P2 foi caracterizada quanto ao pH ótimo e à temperatura ótima, natureza química do sítio catalítico (utilizando inibidores específicos), atividade tripsina-símile e cinética em função do aumento da concentração do substrato. Também foi avaliada a atividade coagulante de leite de P2. Extrato e P2 apresentaram atividade proteolítica de 60 e 50 U/mg, respectivamente. Nenhuma banda polipeptídica foi detectada em P2 por PAGE para proteínas básicas, porém duas bandas foram observadas em PAGE para proteínas ácidas, confirmando a presença de duas proteínas. PAGE em condições desnaturantes revelou duas bandas polipeptídicas, de 24,2 e 32,6 kDa. P2 apresentou maior atividade proteolítica em pH 3,0 (104,97 U/mg) e a 80–90 °C. A avaliação do efeito de inibidores revelou a presença de serinoproteases, cisteínoproteases e metaloproteases. P2 apresentou atividade tripsina-símile sendo determinada uma constante de Michaelis (K_m) de 2,359 mM de BApNA e velocidade máxima de 0,02413 mmol BApNA/min. P2 não apresentou atividade coagulante de leite. MvFL foi isolada seguindo procedimento previamente estabelecido e apresentou ação fungistática para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 20, 0,625, 1,25, 40 e 40

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Foram investigados então os efeitos de MvFL sobre o potencial de membrana mitocondrial, integridade lisossomal e proliferação de células de *C. glabrata* usando citometria de fluxo. Por fim, foram avaliados o potencial de sinergismo junto ao fluconazol e a atividade antibiofilme de MvFL contra todos os isolados. MvFL causou despolarização da membrana mitocondrial, rompimento lisossomal e redução da proliferação em *C. glabrata*, bem como reduziu a proliferação celular. MvFL foi apenas capaz de reduzir levemente a formação de biofilme por *C. tropicalis*. A combinação fluconazol-MvFL mostrou efeito sinérgico contra *C. parapsilosis*, aditivo contra *C. krusei* e *C. tropicalis* e antagônico contra *C. albicans* e *C. glabrata*. Em conclusão, rizoma e fronde de *M. vacciniifolia* são fontes de proteínas com promissor potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Atividade proteolítica; Pteridófitas; Lectina; *Candida*.

ABSTRACT

Proteases are enzymes that selectively catalyze the hydrolysis of peptide bonds and are responsible for almost 60% of the industrial enzyme market, with applications in the detergent, leather, pharmaceutical, biotechnology and food industries. Lectins are proteins that have at least one non-catalytic domain of reversible and specific binding to carbohydrates, presenting several biological activities. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) is an epiphytic plant that has medicinal properties, for example, in the treatment of respiratory infections. A lectin was previously purified from the frond (MvFL) and proteolytic activity was detected in the rhizome extract of this plant. This work describes the obtaining and characterization of a preparation from the rhizome of *M. vacciniifolia* containing proteases, as well as the evaluation of the antifungal and antibiofilm potential of MvFL against *Candida*. Rhizome proteins were extracted in Tris buffer and proteolytic activity was determined using azocasein as a substrate. The extract was then chromatographed on a DEAE-Sephadex column and the peak (P2) of adsorbed proteins was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under native or denaturing conditions. The proteolytic activity of P2 was characterized in terms of optimum pH and optimum temperature, chemical nature of catalytic site (using specific inhibitors), trypsin-like activity and kinetics as a function of increase in substrate concentration. Milk-clotting activity of P2 was also evaluated. Extract and P2 showed proteolytic activity of 60 and 50 U/mg, respectively. No polypeptide band was detected in P2 by PAGE for basic proteins, however two bands were observed in PAGE for acidic proteins. PAGE under denaturing conditions revealed two polypeptide bands, 24.2 and 32.6 kDa, confirming the presence of two proteins. P2 showed higher proteolytic activity at pH 3.0 (104.97 U/mg) and at 80–90 °C. The evaluation of the effect of inhibitors revealed the presence of serinoproteases, cysteine proteases and metalloproteases. P2 showed trypsin-like activity and a Michaelis constant (K_m) of 2.359 mM BApNA was determined and a maximum velocity of 0.02413 mmol BApNA/min. P2 did not show milk-clotting activity. MvFL was isolated following a previously established procedure and presented fungistatic action for *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 20, 0.625, 1.25, 40 and 40 µg/mL, respectively. The effects of MvFL on mitochondrial membrane potential, lysosomal integrity and proliferation of *C. glabrata* cells were then investigated using flow cytometry. Finally,

the potential for synergism with fluconazole and the antibiofilm activity of MvFL against all isolates were evaluated. MvFL caused depolarization of the mitochondrial membrane, lysosomal disruption and reduced proliferation in *C. glabrata*, as well as reduced cell proliferation. MvFL was only able to slightly reduce the biofilm formation by *C. tropicalis*. The fluconazole-MvFL combination showed a synergistic effect against *C. parapsilosis*, an additive against *C. krusei* and *C. tropicalis* and antagonistic against *C. albicans* and *C. glabrata*. In conclusion, the rhizome and frond of *M. vacciniifolia* are sources of proteins with promising biotechnological potential.

Keywords: Proteolytic activity; Pteridophyte; Lectin; *Candida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do modelo proposto por Schechter e Berger.....	24
Figura 2 -	Mecanismos catalíticos de proteases de mamíferos.....	25
Figura 3 -	Mecanismo de catálise das serinoproteases.....	27
Figura 4 -	Representação esquemática dos sítios de ligação das proteases do tipo papaína (A) e da configuração estrutural da catepsina L (B).....	29
Figura 5 -	<i>Microgramma vacciniifolia</i> , crescendo disposta sobre o tronco de uma árvore (A) Detalhe do rizoma. (B) Detalhe das frondes.....	39
Figura 6 -	Cromatografias do extrato de rizoma de <i>M. vacciniifolia</i> em matrizes CM-Sephadex (A) e DEAE-Sephadex (B).....	48
Figura 7 -	Eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) de P2 em condições nativas para proteínas ácidas (A) e em condições desnaturantes (B).....	49
Figura 8 -	Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de pH.....	50
Figura 9 -	Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de temperatura	51
Figura 10 -	Cinética enzimática da atividade tripsina-símile de P2.....	51
Figura 11 -	Avaliação de atividade coagulante de leite. (A) Tempo zero. (B) Após 180 minutos. 1: controle. 2: P2.....	52
Figura 12 -	Fluorescência da rodamina 123 quando incubada com células de <i>C. glabrata</i> tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....	54

Figura 13 -	Fluorescência da sonda laranja de acridina quando incubada com células de <i>C. glabrata</i> tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....	55
Figura 14 -	Fluorescência da sonda CFSE quando incubada com células de <i>C. glabrata</i> tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....	55
Figura 15 -	Avaliação da atividade de antibiofilme de MvFL sobre isolados de <i>Candida</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
APs	Proteases aspárticas
ApuL	Lectina de <i>Alpinia purpurata</i>
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BAPNA	Benzoil-arginina-p-nitronilida
BSA	Albumina de soro bovino
CFSE	Carboxifluoresceína Succinimidil Ester
CIF	Concentração inibitória fracionada
Cis	Cisteína
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
CVV	Candidíase vulvovaginal
DEAE	Dietilaminoetil
DFP	Fluoropofosfato de diisopropilo
EAF	Fração acetato de etila
EC	Classificação de enzimas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Glu	Glutamato
HCl	Ácido clorídrico
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IV	Índice de variação
kDa	QuiloDalton
Km	Constante cinética de Michaelis-Menten
LA	Laranja de acridina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
MvFL	Lectina das frondes da <i>Microgramma vacciniifolia</i>
MvRL	Lectina do rizoma da <i>Microgramma vacciniifolia</i>
NaCl	Cloreto de sódio

PAGE	Eletroforeses em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPI	Papaya proteinase I
Ro 123	Rodamina 123
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sulfato sódico de dodecila
Ser	Serina
St	<i>Solanum tuberosum L.</i>
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UFC	Unidades formadoras de colônia
Val	Valina
Vmax	Velocidade máxima de degradação do substrato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Clivagem da ligação peptídica por diferentes proteases	24
Tabela 2 - Representações das proteases vegetais e suas aplicações nas indústrias.....	32
Tabela 3 - Atividade fungistática de MvFL sobre isolados de <i>Candida</i>	53
Tabela 4 - Avaliação do efeito combinatório de MvFL com fluconazol frente às leveduras do gênero <i>Candida</i>	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Geral	20
1.1.2	Específicos	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1	PROTEASES	22
2.1.1	Serinoproteases	26
2.1.2	Cisteíno-proteases	28
2.1.3	Aspártico-proteases	29
2.1.4	Metaloproteases	30
2.1.5	Treonino-proteases	31
2.2	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS PROTEASES	31
2.3	LECTINAS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	35
2.4	CANDIDA	36
2.5	FAMÍLIA POLYPODIACEAE	38
2.5.1	<i>Microgramma vacciniifolia</i>	39
3	METODOLOGIA	41
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	41
3.1.1	Proteases de rizoma da <i>M. vacciniifolia</i>	41
3.1.1.1	Extração de proteínas	41
3.1.1.2	Atividade proteolítica total	41
3.1.1.3	Purificação de protease	42

3.1.1.4	Eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE)	42
3.1.1.5	Determinação de temperatura ótima e pH ótimo	43
3.1.1.6	Efeito de inibidores na atividade proteolítica	43
3.1.1.7	Cinética enzimática	43
3.1.1.8	Atividade de coagulante de leite	44
3.1.2	Lectina de frondes da <i>M. vacciniifolia</i>	44
3.1.2.1	Isolamento da lectina da fronde <i>M. vacciniifolia</i> (MVFL)	44
3.1.2.2	Ensaio de atividade antifúngica	45
3.1.2.3	Avaliação de proliferação celular	45
3.1.2.4	Avaliação da estabilidade lisossomal e do potencial de membrana mitocondrial	46
3.1.2.5	Atividade antibiofilme	46
3.1.2.6	Avaliação de potencial de sinergismo	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÃO PROTEOLÍTICA DO RIZOMA DE <i>M. vacciniifolia</i>	48
4.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA DE FRONDE DE <i>M. vacciniifolia</i>	52
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Todos os organismos são construídos e mantidos pelas enzimas, catalisadores biológicos que possibilitam as reações bioquímicas necessárias para sustentar a vida. Uma das principais propriedades das enzimas é a sua especificidade, permitindo reconhecer um composto específico ou substrato para a qual foram projetadas (NELSON & COX, 2013). As enzimas também apresentam ampla relevância biotecnológica. Somente em 2016, o mercado global de enzimas atingiu mais de US\$ 5 bilhões e é previsto que esse setor continue em crescimento nos próximos anos, atingindo um valor global de US\$ 6,3 bilhões até 2021. Estima-se que 70% desse mercado seja dominado por enzimas denominadas de carboidrases e proteases (DEWAN, 2017).

As proteases – que também podem ser chamadas peptídeo-hidrolases ou peptidases – são enzimas que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas (MONOD *et al.* 2002; ANTÃO & MALCATA, 2005; MANDUJANO-GONZÁLEZ *et al.* 2016). Podem ser classificadas como exopeptidases, se clivam as ligações peptídicas presentes nos terminais amino ou carboxi, ou como endopeptidases, que clivam as ligações peptídicas presentes no interior da molécula. (TURK, 2006). Essas enzimas destacam-se por possuírem múltiplas funções fisiológicas, participando de processos como digestão, crescimento celular, morfogenia, desenvolvimento, inflamação, ativação de pró-hormônios, dentre vários outros (LÓPEZ-OTTIN & BOND, 2008). Diante de sua versatilidade, especificidade e eficiência, são várias as possibilidades de aplicá-las na indústria, sendo usadas frequentemente nas indústrias de detergente, couro, farmacêutica e alimentícia. Dentro da indústria alimentícia, proteases vegetais apresentam aplicações como coagulante de leite uma vez que podem substituir o coalho de origem bovina e a quimosina recombinante (GOMEZ *et al.* 2001; CASTRO, 2015; DADSHAHI, 2016).

As lectinas são proteínas amplamente encontradas em animais, plantas e microrganismos e que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de interagir reversivelmente com carboidratos (LAM; NG, 2011). Vários são os processos fisiológicos que as lectinas estão envolvidas, como a sinalização celular, interações hospedeiro-patógeno, eliminação de glicoproteínas do sistema circulatório, interações célula-célula no sistema imunológico, diferenciação e direcionamento de proteínas para compartimentos celulares (GALLEGOS *et al.* 2014). Podem apresentar atividade

antifúngica, que está associada com à habilidade de interagir com componentes da parede celular dos fungos, resultando em ação inibidora sobre o crescimento e o desenvolvimento desses microrganismos (COELHO *et al.* 2018).

Microgramma vacciniifolia, conhecida popularmente como erva-silvina, erva-silveira, cipó-cabeludo, cipó-peludo é uma espécie pertencente à família Polypodiaceae, com relatos de uso popular como um poderoso adstringente, e recomendada para hemorragias, expectorções, diarreias e disenterias (PERES *et al.* 2009). Estudos prévios mostraram a presença de lectinas no rizoma e na fronde de *M. vacciniifolia* (ALBUQUERQUE *et al.* 2012; PATRIOTA *et al.* 2017), bem como indicaram a presença de proteases em extrato do rizoma (dados não publicados). Nesse contexto, a presente dissertação descreve a purificação e caracterização de proteases a partir do rizoma de *M. vacciniifolia* e a avaliação da sua potencial ação coagulante do leite, bem como a investigação da atividade antifúngica e antibiofilme da lectina da fronde (MvFL).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Purificar proteases do rizoma e avaliar seu potencial como coagulante de leite, bem como investigar a atividade antifúngica de lectina da fronde *M. vacciniifolia*.

1.1.2 Específicos

- Extrair proteases do rizoma de *M. vacciniifolia*.
- Obter preparação parcialmente purificada de proteases do rizoma de *M. vacciniifolia*.
- Caracterizar as proteases obtidas quanto à natureza da carga líquida e massa molecular.
- Caracterizar a atividade proteolítica da preparação quanto a pH e temperatura ótimos, natureza química do sítio catalítico, ação tripsina-símile e cinética em função de variação da concentração do substrato.
- Avaliar a atividade coagulante de leite da preparação de rizoma.

- Purificar a lectina de fronde de *M. vacciniifolia* (MvFL) seguindo procedimento previamente estabelecido.
- Avaliar as atividades antifúngica e antibiofilme de MvFL contra *Candida*.
- Avaliar o potencial de sinergismo entre MvFL e fluconazol contra *Candida*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEASES

As proteases – também chamadas peptídeo-hidrolases ou peptidases – são enzimas que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas. Os termos "peptidases" e "proteases" são essencialmente equivalentes em termos de função, a diferença é representada pelo tamanho das cadeias peptídicas usadas como substratos (MONOD *et al.* 2002; ANTÃO & MALCATA, 2005; MANDUJANO-GONZÁLEZ *et al.* 2016).

No início dos estudos sobre proteínas, as proteases eram caracterizadas como enzimas destrutivas, necessárias para o catabolismo das proteínas e liberação de aminoácidos (LÓPEZ-OTÍN & OVERALL, 2002; LÓPEZ-OTÍN & MATRISIAN, 2007; TURK, 2012). Por muitos anos, foram relacionadas a funções degradativas não-específicas. Posteriormente, o sucesso desse grupo de enzimas adveio pela grande quantidade de descobertas que demonstraram sua relevância no controle de múltiplos processos biológicos em todos os organismos, sendo caracterizadas como enzimas que catalisam reações altamente específicas de processamento de proteínas (LÓPEZ-OTÍN & BOND, 2008; MAZORRA-MANZANO, RAMÍREZ-SUAREZ, & YADA, 2018). As proteases apresentam uma multiplicidade de tamanhos e formas, relacionadas com diferentes funções celulares (LÓPEZ-OTÍN & BOND, 2008; TURK, 2012).

Essas enzimas destacam-se pelas múltiplas funções fisiológicas, podendo regular o destino, a localização e a atividade de muitas proteínas, modular as interações proteína-proteína, produzir moléculas bioativas, contribuir para o processamento de informações celulares e gerar, transduzir e amplificar sinais moleculares. As proteases participam de processos como digestão, proliferação e diferenciação celular, autofagia, senescência, necrose e apoptose, morfogenia, remodelação tecidual, desenvolvimento, inflamação, cicatrização, angiogênese, neurogênese, hemostasia, ativação de pró-hormônios e outras proteínas secretadas, dentre vários outros (LÓPEZ-OTTIN & BOND, 2008).

De acordo com a nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as proteases pertencem à classe 3 e subclasse 3.4. As proteases podem ser classificadas seguindo três critérios principais: 1) tipo de reação catalisada; 2)

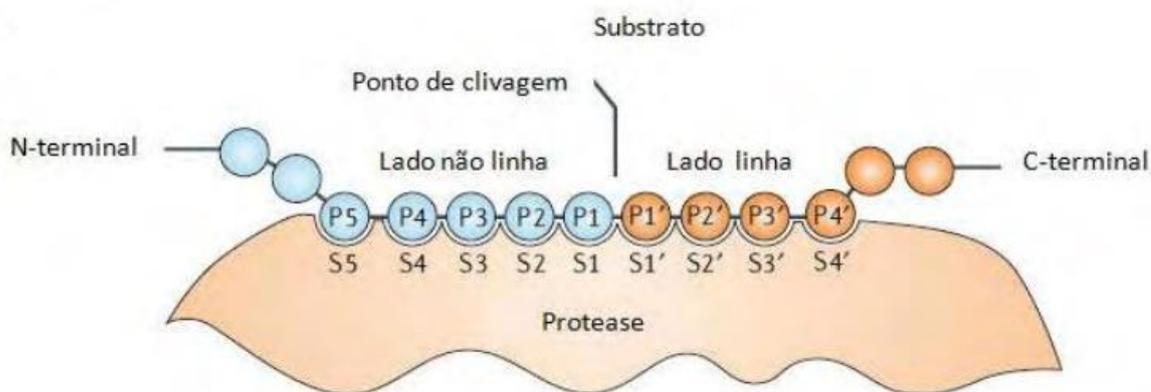
natureza química do sítio catalítico e 3) relação evolutiva baseada na estrutura. Diante do tipo de reação catalisada, podem ainda estar divididas em dois grandes grupos: as exopeptidases (EC 3.4.11C-19) e as endopeptidases (EC 3.4.11-99). As exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas extremidades N-terminal ou C-terminal das cadeias polipeptídicas, sendo denominadas de aminopeptidases ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (MURI, 2014).

A especificidade das proteases está relacionada com os resíduos de aminoácidos presentes no local em que a enzima catalisará a hidrólise da ligação peptídica. O sítio ativo da enzima possui um arranjo característico de resíduos de aminoácidos que define a interação enzima-substrato. Essas especificidades podem determinar a escolha da protease para a geração de produtos após hidrólise, pois uma mesma cadeia proteica pode produzir hidrolisados muito diferentes a partir de diferentes proteases (BARRETT & RAWLINGS, 2007; TAVANO, 2013).

Algumas proteases demonstram uma especificidade particular para uma única ligação peptídica de somente uma proteína como, por exemplo, a enzima conversora de angiotensina que catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II, uma etapa necessária para a ativação do receptor de angiotensina. Por outro lado, existem outras pouco específicas e algumas clivam diversos substratos sem distinção como a proteinase K, uma serino protease (28,9 kDa) queratinolítica sintetizada pelo fungo *Tritirachium album* (TURK, 2006).

Um estudo realizado por Schechter e Berger (1967) descreve um modelo da especificidade das proteases, como apresentado na Figura 1, que representa a ligação do substrato à protease. A superfície da protease é capaz de acomodar a cadeia lateral dos resíduos do substrato em subsítios de catálise. Os subsítios são numerados S1-Sn do lado N-terminal do substrato, e S1'-Sn' do lado C-terminal, iniciando a denominação a partir do ponto de clivagem. Os resíduos de substrato que esses subsítios acomodam são nomeados P1-Pn e P1'-Pn', respectivamente. A estrutura do sítio ativo da protease determina quais resíduos do substrato podem se ligar a cada subsítio, resultando na especificidade da protease. Exemplos de sítios específicos de clivagem de algumas proteases são demonstrados na Tabela 1.

Figura 1 - Representação do modelo para especificidade das proteases proposto por Schechter e Berger.



Fonte: TURK, B (2006).

Tabela 1 - Clivagem da ligação peptídica por diferentes proteases

Protease	Ligação peptídica alvo para clivagem
Tripsina	Lys (ou Arg) ↓ Xaa
Quimotripsina, subtilisina	Trp (ou Try, Phe, Leu) ↓ Xaa
Papaina	Phe (ou Val, Leu) Xaa ↓ Xaa
Termolisina	Xaa ↓ Leu (ou Phe)
Pepsina	Phe (ou Tyr, Leu) ↓ Trp (ou Phe, Tyr)

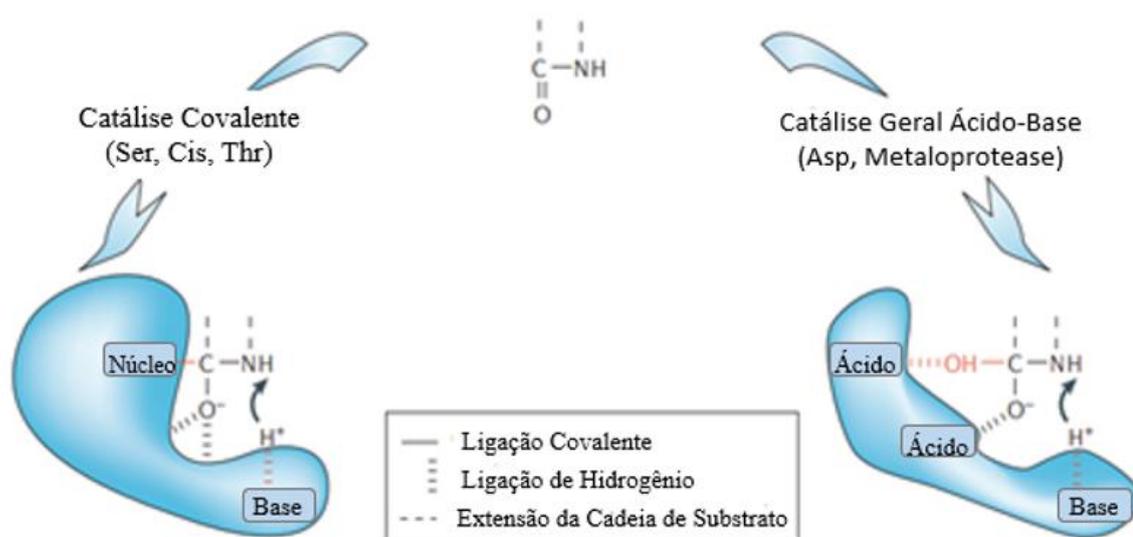
Fonte: Adaptado de RAO *et al.* 1998. A seta para baixo indica a posição em que a enzima cliva a ligação peptídica. O aminoácido Xaa representa qualquer um dos 20 resíduos de aminoácido. À esquerda encontra-se o aminoácido da posição P1 e à direita o aminoácido da posição P1'.

Quanto à natureza química do sítio catalítico, as proteases podem ser classificadas em: serinoproteases, que apresentam a tríade catalítica composta por Ser, His e Asp; cisteíno-proteases, com tríade Cis, Asp e His; aspártico-proteases, que possuem aspartato como resíduo nucleofílico; treonina-protease, com o resíduo de treonina e metaloproteases, que são dependentes da presença de íon metálico no sítio ativo (MURI, 2014; ELLEUCH *et al.* 2020)

Em uma reação enzimática, o nucleófilo é uma molécula ou íon capaz de oferecer um par de elétrons para a formação de uma ligação no sítio catalítico. Nas serino e treoninoproteases, o nucleófilo corresponde ao oxigênio da hidroxila da serina ou treonina, respectivamente; enquanto nas cisteinoproteases, corresponde ao

enxofre da sulfidril da cisteína. Nesses três casos, a catálise é do tipo covalente. Nas metaloproteases e aspártico-proteases o nucleófilo é uma molécula de água ativada e a catálise é do tipo não-covalente (MURI, 2014; ELLEUCH *et al.* 2020). Na catálise covalente, os resíduos de histidina normalmente funcionam como bases, enquanto na catálise não-covalente, os resíduos Asp ou Glu e o íon metálico servem como ácidos e bases (BARRETT & RAWLINGS, 2010). A Figura 2 representa esses mecanismos.

Figura 2 - Mecanismos catalíticos de proteases em mamíferos.



Fonte: TURK, B. (2006).

De acordo com a origem evolutiva, as proteases também são classificadas pela similaridade de sequência e estrutura, sendo as que possuem sequências homólogas agrupadas em famílias e as famílias similares em clãs. Um clã possui uma ou mais famílias que possivelmente podem ter relação com um ancestral comum, mas divergiram-se, impedindo a comparação com a estrutura primária (BARRETT & RAWLINGS, 2007). A homologia no nível de clã é traçada pela similaridade tridimensional de estruturas, mas o arranjo dos resíduos catalíticos nas cadeias polipeptídicas e similaridades na sequência de aminoácidos ao redor dos aminoácidos catalíticos podem também ser relevantes (BARRETT & RAWLINGS, 2007).

Uma outra classificação é de acordo com a faixa de pH em que a protease apresenta a maior atividade: proteases ácidas (pH 2,0 a 6,0), neutras (pH 6,0 a 8,0) e alcalinas (pH 8,0 a 13,0) (RAO *et al.* 1998; VERMELHO *et al.* 2008).

2.1.1 Serinoproteases

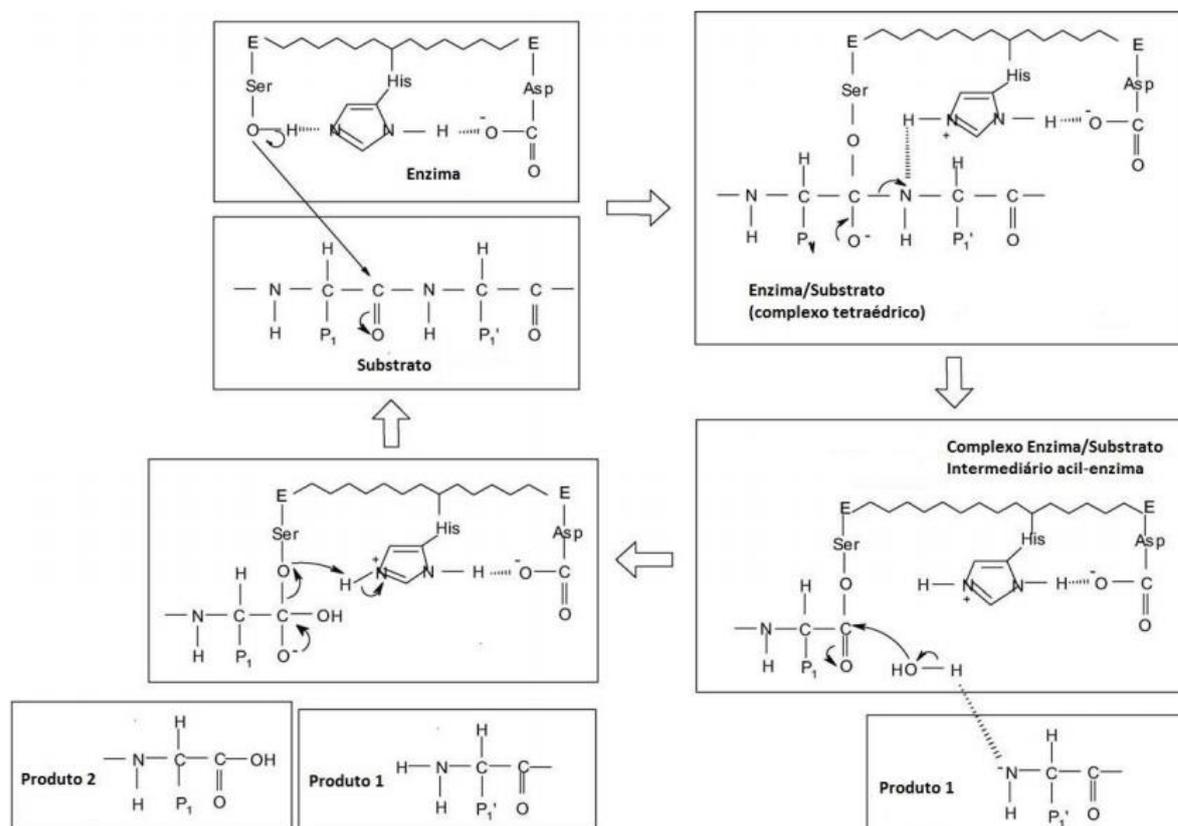
As serinoproteases são as enzimas proteolíticas mais estudadas, sendo 1/3 de todas as proteases pertencente a esta classe. O resíduo de serina é responsável pelo ataque nucleofílico. Dentre os exemplos mais conhecidos estão a tripsina, quimotripsina, subtilisina, elastase, trombina, plasmina, calicreínas, prolil oligopeptidases, pró-convertases e Lon peptidases, entre outras (PAGE; CARRELL; CERA, 2008). As serinoproteases estão relacionadas com processos fisiológicos, incluindo sinalização celular, digestão, desenvolvimento e resposta imune inata (LI-PING; REN-HUA; YAN-JIE, 2016).

A estrutura das serinoproteases evoluiu várias vezes, estando aquelas estrutural e cataliticamente semelhantes agrupadas em 4 principais clãs: o clã PA, tendo com membro representativo quimotripsina; o clã SB, que inclui subtilisina; e os clãs SC e SF, que contêm várias peptidases. Sabe-se que 75% das 178 serinoproteases humanas pertencem ao primeiro clã. As três principais subfamílias das PA-serina-proteases podem ser distinguidas com base na especificidade de seu substrato, sendo: as serinoproteases do tipo tripsina, que clivam substratos proteicos em ligações peptídicas após resíduos de lisina e arginina carregados positivamente; a família do tipo quimotripsina, que cliva substratos após grandes aminoácidos hidrofóbicos, como alanina e leucina; e as serinoproteases do tipo elastase, que clivam substratos após pequenos resíduos hidrofóbicos, como a valina (HEUTINCK *et al.* 2010).

Os inibidores mais comuns para estas enzimas são PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), DFP (fluoropofosfato de diisopropilo) e aprotinina. A natureza desenvolveu um grupo especializado de inibidores de serinoproteases, as serpinas que limitam a atividade dessas enzimas, se associando à protease em um complexo estável irreversível (EKICI, 2008). Os inibidores de serina-protease de plantas ocorrem em muitas espécies. As famílias de maiores destaque são as famílias Solanaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Poaceae e Cucurbitaceae e, por isso, foi estabelecida a classificação dos inibidores de serina-protease nos seguintes grupos: Kunitz, Bowman-Birk; Batata I e Batata II; e a superfamília da abóbora, abobrinha, cereais (COTABARREN *et al.* 2020).

O mecanismo de catálise das serinoproteases, como representado na Figura 3, envolve duas fases: acilação e desacilação, em que ocorre a transferência da porção acil do substrato para um grupo funcional da enzima.

Figura 3 - Mecanismo de catálise das serinoproteases



Fonte: Adaptado de ANTÃO; MACALTA (2015).

As duas etapas básicas de catálise por esse grupo de enzimas incluem, primeiro, a formação de um éster entre o átomo de oxigênio da serina e a porção acila do substrato, o que produz um intermediário tetraédrico e libera a parte amino do substrato; segundo, o ataque da água ao intermediário acila ligado à enzima, que o decompõe e libera o produto ácido, enquanto regenera a forma original da enzima (EKICI, 2008).

As serinoproteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7 e 11. Eles têm amplas especificidades de substrato, incluindo atividade estereolítica e amidase. Preparação de proteases vegetais extraídas do látex de *Euphorbia milii*, amplamente utilizado como agente moluscicida e como drogas antitumorais, apresenta uma serinoprotease que exibe atividade máxima em torno

de pH 9 e a 35 °C e massa molecular de cerca de 75 kDa (MORO *et al.* 2008a). Milina, também obtida da espécie *E. milli* é uma serinoprotease dependente de tiol, que possui o seu peso molecular de 79 kDa e demonstrou atividade a 60 °C e a faixa de pH ativo é de 7,5-11 (MORO *et al.* 2008b). Outra serinoprotease é a carneína, obtida do látex de *Ipomea carnea*, com massa molecular é 80,24 kDa e condições ótimas de atividade a pH 6,5 e 65 °C (PATEL; SINGH; JAGANNADHAM, 2007).

2.1.2 Cisteíno-proteases

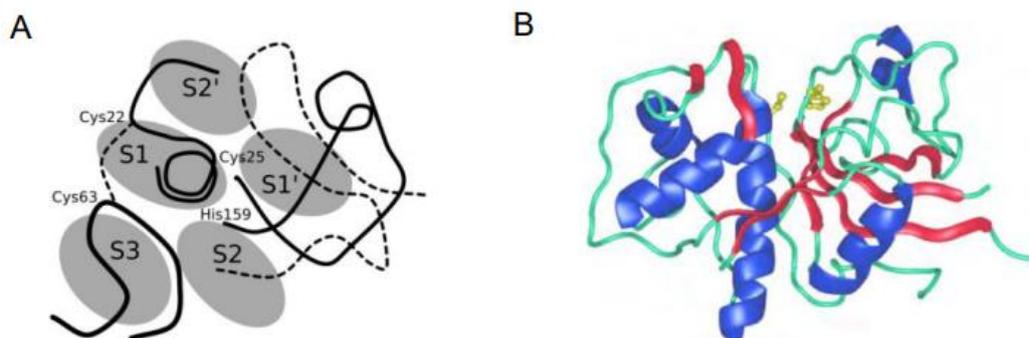
As cisteíno-proteases possuem mecanismo catalítico que depende de uma díade catalítica de cisteína e histidina, mas a ordem dos resíduos Cys e His difere entre as famílias (RAWLINGS; BARRET, 2010). Como dito anteriormente, o sítio ativo das cisteíno-proteases atua por um mecanismo catalítico similar aos das serino proteases, tendo como nucleófilo um grupo tiol ao invés da hidroxila da serina (JAMES, 2006). Nesse mecanismo, há a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato. O intermediário é formado pelo ataque nucleofílico do grupamento tiol do resíduo de cisteína no grupo carbonila do substrato a ser hidrolisado, liberando a parte ácida como produto. Depois acontece a reação entre uma molécula de água e o intermediário formado, onde o grupamento amino é liberado como produto, para no final desse ciclo ocorrer a regeneração da enzima para seu estado original (GRZONKA, 2001; LIU *et al.* 2018).

As cisteíno-proteases são enzimas com peso molecular geralmente de 21 a 30 kDa e com máxima atividade proteolítica em faixas de pH ácido (4,0–6,5). Dentre os principais inibidores estão a iodoacetamida, o transepoxi-succinil-leucil-amido-(4-guanidino) -butano (E-64) e as cistatinas. (GRZONKA, 2001; POLGÁR, 2013). As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno proteases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica. A manutenção do equilíbrio entre cisteíno proteases livres e em complexo com cistatinas é crítico para o perfeito funcionamento de um sistema biológico (OLIVEIRA, *et al.* 2002).

Nesta classe estão presentes muitas proteases de plantas como a bromelaína, e actinidina, mas a papaína que é a cisteíno-protease mais conhecida. Ela tem especificidade mais ampla em relação aos substratos devido à presença de numerosas isoenzimas, sendo ativa entre pH 5–9 e considerada estável até 80 °C.

Também estão incluídas diversas proteases envolvidas no metabolismo proteico intracelular, tais como catepsinas lisossomais, as calpaínas, peptidases 3C, entre outras (MAMBOYA, 2012). A Figura 4 compreende a representação esquemática do sítio ativo da papaína e a estrutura tridimensional da catepsina L.

Figura 4 - Representação esquemática dos sítios de ligação das proteases do tipo papaína (A) e da configuração estrutural da catepsina L (B)



Fonte: TURK (2012).

2.1.3 Aspártico-proteases

Comumente conhecidas como proteases ácidas, as aspártico proteases são as endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica. As proteases ácidas são agrupadas em três famílias: pepsina (A1), retropepsina (A2) e enzimas dos pararetrovírus (A3) (RAWLINGS, N.D, 2010). São encontradas em uma variedade de organismos, incluindo plantas e animais e tem sua distribuição também em nematoides, parasitas, fungos e vírus (GONZÁLEZ, 2011; SALEHI *et al.* 2017).

As proteases aspárticas de plantas são encontradas principalmente em sementes e participam da degradação de proteínas de armazenamento durante o amadurecimento e germinação. Além disso, eles podem ter um papel nas respostas ao estresse e possuem formas heterodiméricas e monoméricas que se apresentam em vacúolos e espaços extracelulares, respectivamente (SALEHI *et al.* 2017).

Nas aspárticos proteases um grupo funcional de aminoácido não é usado como nucleófilo no mecanismo catalítico; em vez disso, uma molécula de água é ativada por um dos resíduos de Asp que faz o ataque nucleofílico ao carbono da carbonila da ligação peptídica. Foi demonstrado que os resíduos de Asp catalíticos possuem valores diferentes de pKa de forma que, quando um dos resíduos estaria

comportando-se como base geral removendo um próton da molécula de água, o outro agiria como ácido doando um próton para o oxigênio da carbonila da ligação peptídica, formando então o intermediário tetraédrico (GONZÁLEZ, 2011).

A maioria das proteases aspárticas mostra atividade máxima em pH ácido. Suas massas moleculares estão na faixa de 30 a 45 kDa e a maioria destas proteases possui a díade catalítica constituída por dois resíduos de Asp e são inibidas especificamente pela pepstatina A (COMELLAS-BIGLER, 2002; GURUMALLESH *et al.* 2019).

Proteases aspárticas são bastante empregadas nas indústrias alimentícias. Na batata, *Solanum tuberosum*, são encontradas proteases aspárticas em tubérculos (*StAP1*) e folhas (*StAP3*) que foram caracterizadas como enzimas coagulantes do leite (TITO *et al.* 2020). As flores de *Cynara cardunculus* também contêm proteases aspárticas (APs) com atividade de coagulação do leite (ALAVI & MOMEN, 2020).

2.1.4 Metaloproteases

Essa classe é reconhecida por diferir muito em suas sequências de aminoácidos e estruturas, tendo como característica em comum a necessidade de íons metálicos para exercerem sua atividade catalítica, os quais normalmente são zinco, cobalto, manganês, níquel ou cobre. Assim como nas aspártico-proteases, o ataque nucleofílico à ligação peptídica é mediado por uma molécula de água. Na maioria das metalo proteases os ligantes do metal são os resíduos de His, Glu, Asp ou Lis (ADEKOYA; SYLTE, 2009).

Como exemplos de metaloproteases incluem-se enzimas de várias origens, como collagenases, toxinas hemorrágicas de venenos de serpentes, termolisina, carboxipeptidase A, diversas aminopeptidases, enzima conversora de angiotensina, entre outras. Os inibidores mais comuns são os quelantes de metais como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 1,10-fenantrolina (POLAINA & MACCABE, 2007; RANI *et al.* 2012).

Em comparação com os outros tipos de proteases, sabe-se relativamente pouco sobre metaloproteases de plantas. As metaloproteases em plantas incluem exoproteases e endoproteases em muitos locais subcelulares diferentes, com função de processamento degradativa ou altamente específica (GONZÁLEZ-RÁBADE, 2011).

2.1.5 Treonino-proteases

As treonino-proteases possuem um resíduo de treonina em seu sítio ativo, sendo encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais. Os membros dessa classe de enzimas constituem as subunidades catalíticas do proteossomo, o qual está envolvido no *turnover* intracelular de proteínas (RAWLINGS *et al.* 2010); (BARRETT *et al.* 2012).

Para realizar a catálise, as proteases de treonina usam um nucleófilo que é principalmente um álcool secundário da treonina. A catálise enzimática envolve dois estágios. Inicialmente, o substrato é direcionado pelo nucleófilo para formar um intermediário de acil-enzima, seguido por hidrólise dependente de água para liberar os produtos e as enzimas livres (GURUMALLESH *et al.* 2019).

2.2 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS PROTEASES

Somente em 2016 o mercado global de enzimas industriais de natureza proteica atingiu mais de US\$ 5 bilhões e é previsto que esse setor continue em crescimento nos próximos anos, atingindo um valor global de US\$ 6,3 bilhões até 2021. Estima-se que 70% desse mercado seja dominado somente por carboidrases e proteases (DEWAN, 2017). O setor de enzimas da indústria de alimentos é o principal segmento e deve crescer de quase US\$ 1,5 bilhão em 2016 para US\$ 1,9 bilhão em 2021 (FERNÁNDEZ; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017).

As proteases são utilizadas em uma grande variedade de aplicações, principalmente nas indústrias de detergentes, processamento de couro, farmacêutica, seguidas pela indústria de alimentos. Por exemplo, em Biotecnologia Alimentar, para alterar as matrizes de proteínas que constituem a maioria dos alimentos e assim as qualidades sensoriais, como sabor ou textura; no melhoramento da digestibilidade; na redução da alergenicidade; na produção de peptídeos bioativos etc. (PAVAN, *et al.* 2012).

Devido à importância das proteases para diversos setores da indústria, há uma demanda crescente nas pesquisas voltadas à descoberta de novas fontes, bem como nos processos de purificação e caracterização destas enzimas (ALICI & ARABACI, 2018). As proteases vegetais chegaram à atenção dos pesquisadores por destacarem-

se diante do potencial para superar as deficiências em termos de estabilidade, eficiência catalítica e especificidade nas diversas áreas indústrias (MORELLON-STERLING *et al.* 2020).

Dentre as proteases vegetais, a papaína, bromelina e ficina são usadas há algum tempo na medicina convencional e na indústria de alimentos, em processos como fermentação, precipitação de leite, produção de hidrolisados proteicos altamente solúveis, produção de aminoácidos essenciais e tratamento de águas residuais, entre outros (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010); (PAVAN *et al.* 2012). Há diversos exemplos de aplicações industriais de proteases vegetais, de diferentes fontes e potencias, sendo apresentado pela Tabela 2.

Tabela 2 - Representações das proteases vegetais e suas aplicações nas indústrias.

Espécie	Protease	Aplicação	Referência
<i>Carica papaya</i>	Papaína	O uso da papaína para a remoção de biofilmes formados por bactérias	SONG <i>et al.</i> 2020
<i>Carica papaya</i>	Papaína	Papaína imobilizada na membrana de alginato para aplicação de curativo	FILHO <i>et al.</i> 2020
<i>Carica papaya</i> , <i>Ananas cosmosus</i>	Papaína Bromelina	O efeito mecânico da bromelina e papaína na amaciação do músculo da lula jumbo	JUN-HUI <i>et al.</i> 2020
<i>Ananas cosmosus</i>	Bromelina	O tratamento com bromelina diminui a migração de neutrófilos para locais de inflamação	FITZHUGH <i>et al.</i> 2008
<i>Ananas cosmosus</i>	Bromelina	Aplicações de bromelina de resíduos de abacaxi em acne	ABBAS; SHANBHAG; KOTHARE, 2020
<i>Actinidia deliciosa</i>	Actinidina	Aplicação da enzima actinidina do kiwi para melhorar a hidrólise das proteínas do glúten durante a digestão gastrointestinal simulada	JAYAWARDANA <i>et al.</i> 2021

<i>Actinidia deliciosa</i> <i>Carica papaya</i>	Actinidina Papaína	Proteases, actinidina e papaína reduzem o biofilme oral na língua em idosos	MUGITA <i>et al.</i> 2017
<i>Ficus carica</i>	Ficina	Atividade anti-biofilme e de cicatrização de feridas de ficina imobilizada com quitosana	BAIDAMSHINA <i>et al.</i> 2020

Detergentes utilizados mundialmente contêm enzimas como proteases, amilases e lipases, sendo as proteases capazes de hidrolisar manchas de materiais contendo proteínas. As proteases alcalinas utilizadas em detergentes são produzidas por vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (ANWAR, 1998; CHERRY, 2003; PAUL, 2016). Para a aplicabilidade das enzimas nesse meio, necessita-se que elas se enquadrem em alguns critérios de desempenho, como: atividade em amplo pH alcalino, temperaturas maiores de 40 °C, estabilidade em alta faixa alcalina e vida útil em presença de surfactantes aniônicos e não aniônicos, agentes oxidantes e branqueadores presentes no detergente (PAUL, 2016).

Proteases alcalinas com características elastolíticas e queratinolíticas podem ser usadas para o tratamento de couro, principalmente nos processos de depilação e lavagem de peles de animais (PAUL, 2016; CHINA, 2020). Nesse contexto, tem sido estudada uma nova geração de enzimas proteolíticas com a capacidade de realizar a hidrólise das proteínas dos folículos capilares com a retirada dos pelos, além do processo de degradação da elastina, queratina e colágeno presentes nos materiais. O grupo dominante dos produtores de queratinase é o *Bacillus* spp.; muitos pesquisadores descobriram que *Bacillus* spp. e actinobactérias produzem proteases queratinolíticas ativas mesmo em um ambiente extremo (PAUL, 2016; KALAIKUMARI, 2019; TAMILSELVI, 2019).

Na indústria farmacêutica, são utilizadas as colagenases, proteases que catalisam processos químicos e quebram as ligações peptídicas do colágeno, estando inseridas na classe das metaloproteinases de matriz extracelular. Podem ser usadas para tratar condições como cicatrização de feridas, queimaduras, glaucoma, hérnia de disco intervertebral, reparo da cartilagem, quelóide, celulite, oclusões totais crônicas, entre outras (ALIPOUR *et al.* 2016). As proteases também estão sendo inseridas nas formulações tópicas, tais como as proteases alcalinas de *Bacillus subtilis*, que atuam como um sistema de liberação transdérmica eficiente de drogas

para aplicações dermatológicas (NOUNOU *et al.* 2017). Além dos cuidados com a pele, as proteases estão sendo transformadas em formulações para melhorar a capacidade digestiva dos humanos (HUA & NAIR, 2015). Um estudo de 2017 mostrou que a cisteíno-protease de *Sesbania grandiflora* apresentou atividades hemostática e fibrinogenolítica (SHIVAMADHU; BALAJI; JAYARAMA, 2017).

No setor de enzimas úteis na indústria de alimentos, as proteases são usadas em uma grande variedade de aplicações, como no amaciamento de carne, indústria de laticínios, produção de hidrolisados de proteínas, panificação, alimentação animal, entre outros (SAVITHA, *et al.* 2011). Nesse setor, a liderança no mercado de proteases é da papaína, extraída de *Carica papaya* (mamão), também chamada de papaya proteinase I (PPI). A papaína é uma cisteíno-endopeptidase de 23,4 kDa e 212 resíduos de aminoácidos pertencente à subfamília C1A. A papaína possui elevada atividade proteolítica contra diversos substratos de proteínas, estando à frente de outras proteases de plantas, como a bromelina (*Ananas comosus*), ficina (*Ficus carica*), além de proteases de fungos (FERNÁNDEZ; CASTAÑEDA & HORMIGO, 2017). Uma protease fúngica comercialmente disponível é a *Aspergillus oryzae* que é utilizado há mais de 2.000 anos na produção de alimentos orientais, como o molho de soja, sendo a *A. oryzae*, considerado um microrganismo seguro e uma fonte de proteases (RYDER *et al.* 2015; HA *et al.* 2012). Um dos grandes interesses na indústria de alimentos é o amaciamento de carnes, sendo destaque a eficácia de papaína de mamão, bromelaína de abacaxi e actinidina de kiwi (RYDER *et al.* 2015).

A utilização das proteases vegetais como coagulante de leite tem despertado grande interesse, uma vez que são enzimas naturais que podem substituir o coalho de origem bovina e a quimosina recombinante (GOMEZ *et al.* 2001). A coagulação do leite é um processo básico da produção de queijo. A ação de proteases desestabiliza as micelas de caseína, que são partículas presentes no leite dispersas em uma fase contínua composta por água, sal, lactose e proteínas do soro. A coagulação acontece com o rompimento das micelas de caseína, quando as caseínas-k são clivadas pelo agente coagulante, liberando do interior da micela as caseínas α e β , além de partículas de para-k-caseinato, que precipitam formando o coágulo (ABREU, 2005; PONTUAL *et al.* 2012).

Proteases extraídas de plantas como kiwi, mamão, rizoma de gengibre e cardo (*Cynara cardunculus*) foram usadas com sucesso como coagulantes de leite para a fabricação de queijo (LUO *et al.* 2018). Um estudo realizado por Pontual *et al.* (2012) relatou a detecção de proteases com atividades caseinolítica e de coagulação do leite em flores de *Moringa oleifera*.

2.3 LECTINAS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O termo lectina é aplicado para denotar as proteínas que possuem, pelo menos, um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a carboidratos específicos, sem alterar a estrutura do ligante. Podem ser encontradas amplamente em animais, plantas e microrganismos. Nas plantas estão distribuídas em raízes, folhas, flores, frutos, sementes, rizomas, tubérculos, bulbos, vagens e entrecascas. (LAM; NG, 2011).

As lectinas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, como na sinalização celular, interações patógeno-hospedeiro, interações célula-célula no sistema imunológico, diferenciação e direcionamento de proteínas para compartimentos celulares (GALLEGOS *et al.* 2014). As lectinas de plantas exibem uma variedade de propriedades com relevância biotecnológica, tais como efeitos inseticida (PAIVA *et al.* 2013), antimicrobiano (YAU *et al.* 2015), antitumoral (ZHANG, *et al.* 2015) e imunomodulador (PROCÓPIO *et al.* 2017).

A atividade antifúngica, que está associada com a habilidade dessas proteínas em interagir com resíduos de N-acetilglicosamina na quitina da parede celular dos fungos, resultando na ação inibidora do crescimento e do desenvolvimento desses microrganismos, na redução da absorção de nutrientes, ou no intermédio do processo de germinação de esporos (SÁ *et al.* 2009; COELHO *et al.* 2018). A lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* apresentou atividade fungistática contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (FERREIRA, *et al.* 2018). A lectina de *Punica granatum* L., popularmente conhecida como romã foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, causando colapso do metabolismo energético, estresse oxidativo e rompimento da parede celular (SILVA *et al.* 2018). A lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, induzindo apoptose e necrose nas células fúngicas e hiperpolarização da membrana mitocondrial (SANTOS *et al.* 2021).

Biofilmes são comunidades complexas e estruturadas de microrganismos inseridos em uma matriz polimérica auto-produzida e composta por exopolissacarídeos, proteínas, ácidos teicoicos, enzimas e DNA extracelular (KLEIN et al. 2015). Um dos grandes desafios atualmente, no combate a doenças infecciosas é controlar os biofilmes, pois nessa forma de vida os microrganismos podem ser até mil vezes mais resistentes a agentes de desinfecção e antibióticos do que na forma planctônica. Os biofilmes fúngicos têm emergido como uma preocupação crescente de infecções que causam doenças crônicas como: fibrose cística, endocardite de valva nativa, otite média, periodontite e prostatite (ZACCHINO et al. 2017).

Tem sido sugerido que a atividade antibiofilme de lectinas está relacionada aos mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana em geral, também se dá pela capacidade dessas proteínas de interagir com os sinais *quorum sensing*, surfactantes, enzimas e polissacarídeos envolvidos na formação de biofilmes (CAVALCANTE et al. 2011; 2013). Adicionalmente, tem sido reportada a capacidade de lectinas, em sinergismo ou não com antibióticos, de erradicar biofilmes pré-existentes de bactérias patogênicas (KLEIN et al. 2015).

2.4 CANDIDA

O gênero *Candida* está entre os agentes etiológicos mais comuns de infecções fúngicas, apresentando altas taxas de mortalidade associadas a essas micoses. *Candida albicans* é o agente causador mais comum de candidíase vulvovaginal (CVV) que afeta milhões de mulheres em todo o mundo (BROWN et al. 2012). *C. albicans* também tem sido associada a infecções nosocomiais em todo o mundo, juntamente com outras espécies do gênero (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Além disso, a formação de biofilme é considerada um fator importante para a virulência e resistência dessas espécies (TAN et al. 2010).

Candida krusei afeta principalmente pacientes hospitalizados apresentando taxas de mortalidade superiores a 60% (BROWN et al. 2012). O tratamento das infecções causadas por esse fungo tem sido desafiador, pois essa espécie é inerentemente resistente ao fluconazol, um medicamento de comum uso em tratamentos antifúngicos (GOW et al. 2012) O controle da candidíase vulvovaginal quando causada por espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol pode ser feito com equinocandinas (NAVARRO-ARIAS et al. 2019).

Candida glabrata é um fungo comensal comum que vive em superfícies mucosas, também conhecido por sua alta tolerância a drogas antifúngicas como a azóis e equinocandinas. Exibe tropismo que causa candidemia, considerada a segunda principal causa de infecção da corrente sanguínea, que afeta principalmente aos idosos. (POSTERARO *et al.* 2020; ARASTEHFAR *et al.* 2020a). Uma característica importante que contribui para a colonização da *C. glabrata* é a adesão ao tecido do hospedeiro, levando a instauração de infecções (PFALLER *et al.* 2019; ARASTEHFAR *et al.* 2020b).

Candida tropicalis é comumente encontrada em países tropicais e causa 33-48% da candidíase sistêmica, sendo caracterizada como um agente causador regular de candidíase em pacientes neutropênicos e, nos últimos anos, tem apresentado aumento da resistência aos antifúngicos, principalmente ao fluconazol. (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ *et al.* 2019).

Uma grande problemática que atende os hospitais pelo mundo é a capacidade que *Candida parapsilosis* tem em formar biofilmes tenazes em cateteres venosos centrais e outros dispositivos implantados clinicamente, ameaçando assim os pacientes submetidos a intervenções médicas invasivas, principalmente os pacientes encontrados em unidade de terapia intensiva. (TABAH *et al.* 2012-PARAMYTHIOTOU *et al.* 2014; TÓTH *et al.* 2019). Geralmente as infecções por *C. parapsilosis* resultam em taxas menores de morbidade do que infecções por *C. albicans*. Porém, vários isolados clínicos de *C. parapsilosis* foram relatados como menos suscetíveis ao tratamento com as drogas antifúngicas equinocandinas e resistência com azol também foi observada, o que dificulta a escolha da terapia (PFALLER *et al.* 2005; GOVENDER *et al.* 2016; TÓTH *et al.* 2019).

Devido a isso, torna-se essencial desenvolver novos compostos com atividade anti-*Candida*, pois existe uma resistência considerável aos antifúngicos fluconazol, equinocandinas, itraconazol e anfotericina B (FARIA *et al.* 2020).

2.5 FAMÍLIA POLYPODIACEAE

A família Polypodiaceae compreende a maior família de samambaias, sendo composta por cerca de 170 gêneros e 7000 espécies. Tem maior abundância em florestas e áreas úmidas, mas estão presentes em quase todas as áreas florísticas, de zonas do deserto a florestas chuvosas e dos trópicos ao ártico ou antártico. (PERES *et al.* 2009). Pertence a Ordem Polypodiales (Polypodiopsida), no clado dos Eupolipoides I. É relacionada filogeneticamente às famílias Davalliaceae, Oleandraceae, Tectariaceae, Lomariopsidaceae e Dryopteridaceae. É caracterizada como uma família grande e que não pode ser definida por apenas uma característica morfológica (VASQUES, 2011).

Destaca-se por ser considerada uma das maiores famílias de pteridófitas, constituindo-se principalmente de espécies epífitas, ocasionalmente terrícolas ou rupícolas. A maioria das espécies são epífitas e representa a quarta maior família de plantas vasculares epifíticas (SUNDUE, 2004); (PERES *et al.* 2009). A diversidade dessa família é maior em áreas úmidas. É um dos grupos mais ricos de espécies em ambientes mais secos, como nas regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. Muitas espécies são cosmopolitas, e vivem preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais úmidos e sombreados das matas (PERES *et al.* 2009; VASQUES, 2011).

A riqueza de samambaias nas regiões tropicais é devida a características do microambientes como altitudes, intensidade luminosa, solos, tipos de rochas e microclimas (MORAN *et al.* 1995). Os fatores edáficos, bióticos e climáticos determinam quais estratégias fisiológicas, anatômicas e respostas adaptativas que possibilitam a sobrevivência das plantas em diferentes condições ambientais (DICKISON, 2000).

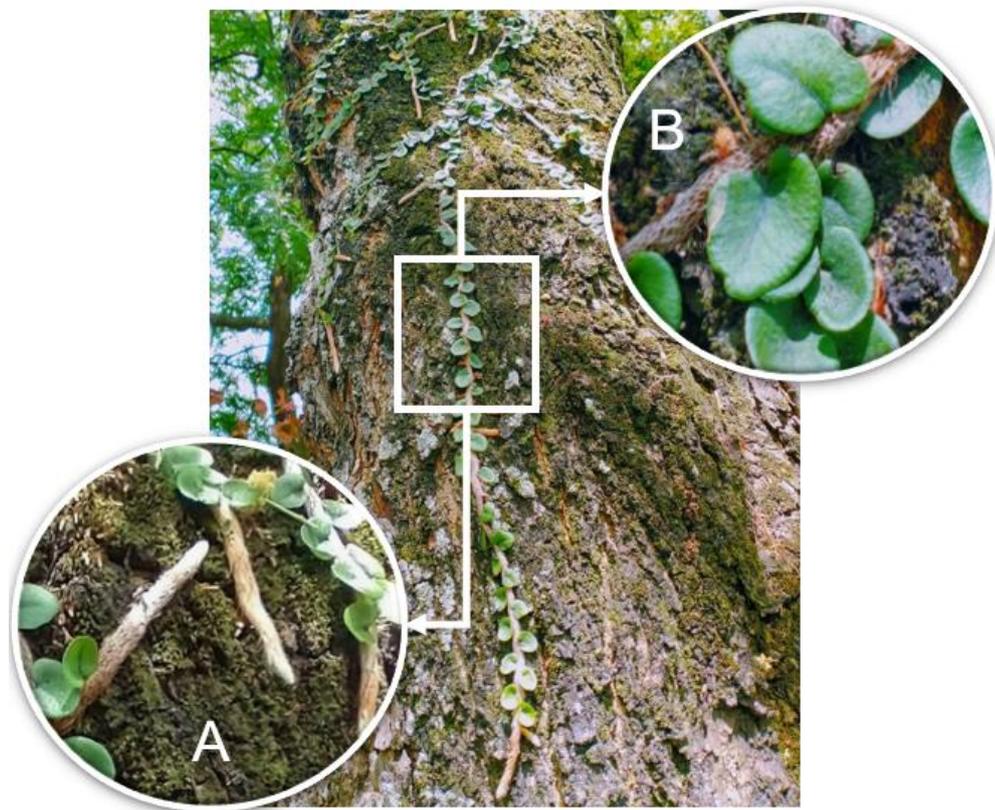
As samambaias têm sido usadas para o tratamento de inúmeras patologias, como feridas, estômago, pulmão e distúrbios do trato urinário, são descritas atividades com diversas espécies da família Polypodiaceae, como o potencial da espécie *Polypodium vulgare*, sendo o rizoma polipódico aplicado como expectorante e diurético e usado para o tratamento de nefrite crônica e pielonefrite (GLÉNSK, 2019).

2.5.1 *Microgramma vacciniifolia*

O gênero *Microgramma* pertence à família Polypodiaceae, compreendendo cerca de 30 espécies nos trópicos. Esse gênero dispõe de raízes superficiais que se espalham pelo ritidoma das árvores e arbustos, absorvendo a matéria orgânica disponível (TERCEIRO et. al. 2011). Denominadas generalistas ou pioneiras, as espécies desse gênero podem ser observadas em florestas com os mais variados graus de perturbação. Por isso, são denominadas de “ervas daninhas epífitas”, pelo sucesso ao colonizar novos substratos (TERCEIRO et. al. 2011)

Microgramma vacciniifolia (Langsd. & Fisch.) Copel. é descrita como uma epífita reptante e/ou hemicriptófita reptante de distribuição neotropical. Pode ser encontrada como corticícola e/ou rupícola e é facilmente reconhecida por seu caule longo intensamente revestido por escamas e folhas dimorfas, sendo as estéreis ovadas e as férteis lanceoladas (PERES et. al. 2009). O hábito dessa espécie crescendo sobre o tronco de uma árvore pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - *Microgramma vacciniifolia*, crescendo disposta sobre o tronco de uma árvore. (A) Detalhe do rizoma. (B) Detalhe das frondes.



A sua distribuição geográfica, ocorre em praticamente toda a América tropical, sendo sua incidência observada nas Antilhas, Venezuela, Colômbia, Paraguai, Argentina, Brasil e, eventualmente, na América do Norte. Foram realizados estudos florísticos no Brasil, indicando a presença em várias formações vegetacionais (Cerrado, Floresta Atlântica Nordeste e Floresta Atlântica do Sul-Sudeste) e nos estados brasileiros de Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PERES et. al. 2009).

Essa espécie é conhecida popularmente como erva-silvina, erva-silveira, erva-tereza, erva-de-lagarto, cipó-cabeludo, cipó-peludo. Relatos apontam esta espécie como um poderoso adstringente, sendo também recomendada para hemorragias, expectorações, diarreias, disenterias, cólicas intestinais e hidropsia (PERES et. al. 2009).

Microgramma vacciniifolia tem sido investigada quanto à presença de proteínas com potencial biotecnológico e farmacológico. Lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos) foram isoladas a partir do rizoma (MvRL) e fronde (MvFL) dessa planta (ALBUQUERQUE et al. 2012; PATRIOTA et al. 2017). MvRL apresentou atividade inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger* (ALBUQUERQUE et al. 2012), atividade antifúngica contra raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ALBUQUERQUE et al. 2013), moluscicida contra o vetor da esquistossomose, *Biomphalaria glabrata* (ALBUQUERQUE et al. 2014) e antineoplásica contra células de carcinoma mucoepidermoide de pulmão, NCI-H292 (ALBUQUERQUE et al. 2014). Já MvFL foi descrita como um agente imunomodulatório sobre células mononucleares de sangue periférico humano (PATRIOTA et al. 2017). Estudo prévio realizado no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco indicou a presença de proteases no rizoma de *M. vacciniifolia* (dados não publicados).

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material vegetal

O rizoma e as frondes de *M. vacciniifolia* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco em Recife, Brasil, com autorização (número 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A identificação taxonômica foi confirmada no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife), onde foi depositado um exemplar de voucher (número 63.291).

O material vegetal foi lavado com água da torneira e água destilada até retirar totalmente os resíduos (2L por 500g de massa de vegetal, por aproximadamente 10 minutos). Posteriormente, o rizoma foi separado da fronde para o processo de secagem, foi seco a 26 ± 3 °C por 20 dias. As frondes foram secas a 26 ± 3 °C por 7 dias e depois pulverizadas em liquidificador.

3.1.1 Proteases de rizoma da *M. vacciniifolia*

3.1.1.1 Extração de proteínas

O pó do rizoma de *M. vacciniifolia* (10 g) foi homogeneizado com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (100 mL) por 24 h a 26 ± 3 °C, sob agitação magnética. Em seguida a mistura foi centrifugada (9.000 x g, 15 min) e o sobrenadante correspondeu ao extrato bruto.

3.1.1.2 Atividade proteolítica total

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato, de acordo com Azeez *et al.* (2007). Alíquota (100 µL) da amostra foi incubada com 300 µL de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo azocaseína a 0,6% (p/v). Após adição de 100 µL de Triton X-100 0,1% (v/v), a mistura foi incubada a 37 °C por 3 h. A reação foi interrompida com a adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) e a mistura foi incubada a 4 °C por 30 min; em seguida, foi efetuada a centrifugação (9.000 g, 10 min) e a absorbância a 366 nm do sobrenadante determinada. Os

ensaios-controle diferiram dos ensaios-teste apenas no momento da adição do ácido tricloroacético, a qual foi realizada antes da incubação a 37 °C por 3 h. Uma unidade (U) de atividade proteolítica correspondeu à quantidade de enzima que aumenta em 0,01 a absorvância em relação ao teste controle. Atividade proteolítica específica foi calculada através da razão entre a atividade enzimática (U) e a quantidade de proteínas (mg) utilizada no teste. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressos como média \pm desvio padrão (D.P.).

3.1.1.3 Purificação de proteases

Para purificação de proteases, o extrato de rizoma (10 mL) foi aplicado separadamente em colunas cromatográficas de CM-Sephadex DEAE-Sephadex (7,5 \times 1,5 cm; Sigma-Aldrich, EUA) equilibradas com tampão citrato-fosfato pH 5,5 a 0,1 M (CM-Sephadex) ou tampão Tris-HCl pH 8,0 a 0,1 M (DEAE-Sephadex). As proteínas não adsorvidas à matriz (P1) foram coletadas na etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas (P2) foram eluídas com NaCl 1,0 M preparado no respectivo tampão. As cromatografias foram realizadas a um fluxo de 2,5 mL/6 min e a presença de proteínas nas frações coletadas (2 mL cada) foi monitorada pela leitura da absorvância a 280 nm. Os picos obtidos foram avaliados quanto à concentração de proteínas (Lowry *et al.* 1951) e quanto à presença de atividade proteolítica total como descrito acima. O pico de proteínas adsorvidas à matriz DEAE-Sephadex (denominado P2) foi utilizado nas próximas etapas, sendo dialisado (100 mL; membrana de corte de 10 kDa) contra água destilada (4 h), usando um volume de 2 L para fluido de diálise. Em seguida, o pico de proteína foi seco por liofilização e ressuspenso em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,0.

3.1.1.4 Eletroforeses em gel de poli(acrilamida) (PAGE)

A carga líquida das proteínas presentes em P2 foi avaliada por PAGE para proteínas nativas ácidas (DAVIS, 1964) ou básicas (REISFELD *et al.* 1962), utilizando gel de corrida a 10% (p/v) de acrilamida. Para detecção das bandas polipeptídicas foi realizada coloração com solução de Negro de Amido (proteínas básicas) ou azul de Coomassie (proteínas ácidas). A massa molecular das proteínas presentes em P2 foi estimada por PAGE em condições desnaturantes, na presença de sulfato sódico de

dodecila (SDS), utilizando gel a 10% de acrilamida (LAEMMLI, 1970). A coloração foi realizada com a solução de Azul de Coomassie. Marcadores de massa molecular (12–225 kDa; GE Healthcare Life Sciences, Suécia) foram utilizados.

3.1.1.5 Determinação de temperatura ótima e pH ótimo

Para determinar os valores de temperatura ótima e pH ótimo da atividade proteolítica de P2, o ensaio descrito no item 3.1.1.2 foi realizado variando-se a temperatura (30 a 70 °C), e tempo de incubação (15, 30 e 60 min); b) variando o pH da reação de 3 a 10, utilizando diferentes soluções (tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 3,0 a 6,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 a 7,0; tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 a 9,5; água ajustada com NaOH 0,1M, pH 10, 11) em lugar do tampão fosfato de sódio pH 7,5.

3.1.1.6 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

P2 (100 µL; 2,44 mg/mL) foi incubado (37 °C, 30 min), separadamente, com os seguintes inibidores (8 mM, 100 µL): fluoreto de metilfenilmetilsulfonil (PMSF, inibidor de serinoproteases), transepoxi-succinil-leucil-amido-(4-guanidino) -butano (E-64, inibidor de cisteíno-proteases) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, inibidor de metaloproteases). Em seguida, foi efetuado o ensaio de atividade proteolítica. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a fórmula a seguir: % inibição = $100 - [100 \times (\text{atividade na presença do inibidor} / \text{atividade na ausência do inibidor})]$. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressos como média \pm D.P.

3.1.1.7 Cinética enzimática

Em placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 30 µL; 2,44 mg/mL de P2, 5 µL do substrato sintético N- α -benzoil-arginina-p-nitronilida (BApNA) em diferentes concentrações (1 mM; 2 mM; 4 mM, 8 mM; 16 mM; 32 mM e 64 mM) e tampão Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0, para completar um volume final de 200 µL. Após a incubação a 37 °C por 60 min, foi determinada a absorbância em 405 nm. O teste foi realizado em triplicata. Brancos da amostra e do substrato foram realizados. Uma

unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de substrato por minuto.

3.1.1.8 Atividade coagulante de leite

O substrato (leite desnatado 10%, Molico®, Nestlé, Brasil) foi preparado em água destilada e o pH ajustado para 6,5. A suspensão foi então incubada com P2 (300 μL) a 37 °C, e a formação de coágulo foi observada. O ponto final foi registrado quando a separação total entre o soro e coágulo for observada ou até um máximo de 180 min. Água destilada foi adicionada no controle negativo. Uma unidade de coagulação do leite foi definida de acordo com *PONTUAL et al. (2012)* como a quantidade de enzima que coagula 2 ml do substrato em 180 min.

3.1.2 Lectina de frondes da *M. vacciniifolia*

3.1.2.1 Isolamento da lectina da fronde *M. vacciniifolia* (MVFL)

As proteínas das frondes foram extraídas por homogeneização do pó em NaCl 0,15 M (na proporção de 10%, p/v) durante 16 h a 26 ± 3 °C, utilizando um agitador magnético. O extrato de frondes correspondeu ao sobrenadante que resultou após a filtração e centrifugação (9000 $\times g$, 15 min, 4 °C). A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry *et al. (1951)*, utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A atividade de lectinas foi avaliada de acordo com o ensaio de atividade hemaglutinante (PAIVA e COELHO, 1992) utilizando eritrócitos de coelho.

MvFL foi isolada de acordo com Patriota *et al. (2017)*. O extrato de frondes (2,0 mL; 2,7 mg de proteína) foi aplicado em uma coluna de Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) (30,0 \times 1,5 cm) previamente equilibrada com água destilada. Um fluxo de 0,5 mL/min de água destilada foi mantido e frações de 3,0 mL foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e presença de lectina. O pico de proteína que mostrou atividade hemaglutinante (P1) foi seco por liofilização, ressuspenso em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e aplicado (1,0 mL; 2,2 mg de proteína) em uma coluna de DEAE-Sephadex A25 (3,0 \times 2,0 cm) previamente equilibrada com este

tampão. A lavagem foi feita usando tampão Tris e MvFL foi eluída com NaCl 1,0 M em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Frações de 3,0 mL foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e avaliadas quanto à absorvância a 280 nm e atividade hemaglutinante.

3.1.2.2 Ensaio de atividade antifúngica

Foram utilizadas cepas das leveduras de *Candida albicans* (URM-5901), *Candida krusei* (URM-6391), *Candida glabrata* (URM-4246), *Candida tropicalis* (URM-6551) e *Candida parapsilosis* (URM-6951), fornecidas pela Micoteca University Recife Mycologia (URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As leveduras foram cultivadas em Saboraud Dextrose Ágar por 24 h a 30 °C. Em seguida, as colônias foram suspensas em solução salina estéril (0,9% NaCl) para obter uma suspensão equivalente a 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo ensaio de microtitulação de acordo com Procópio *et al.* (2017) e correspondeu à menor concentração da amostra capaz de promover redução $\geq 50\%$ do crescimento, em comparação ao controle. Para a determinação da concentração mínima fungicida (CMF), alíquotas (10 μ L) dos poços contendo concentrações das amostras \geq CMI foram inoculadas em placas de petri contendo meio Saboraud Dextrose Ágar, que foram posteriormente incubados a 30 °C. A CMF correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

3.1.2.3 Avaliação de proliferação celular

Candida glabrata foi cultivada por 48 h em meio RPMI. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e marcadas com éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE; Sigma-Aldrich, EUA) a 25 μ g/mL por 30 min a 30 °C. As células foram então lavadas em PBS contendo 2% de albumina de soro bovino (BSA) para remover o excesso de CFSE e incubadas com meio RPMI contendo ou não MvFL a $0,5 \times$ CMI por 24 h a 30 °C. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizando o software CellQuest. Um total de 10.000

eventos foram analisados para cada amostra. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência.

3.1.2.4 Avaliação da estabilidade lisossomal e do potencial de membrana mitocondrial

A estabilidade da membrana lisossomal e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foram avaliados por citometria de fluxo usando as sondas fluorescentes de laranja de acridina (LA) e rodamina 123 (Ro 123), respectivamente. Os ensaios foram realizados com *Candida glabrata*.

As células foram ressuspensas em 500 μL de RPMI 1640 tamponado com MOPS a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL. MvFL foi adicionada às suspensões celulares nas concentrações correspondentes a CMI e $2 \times$ CMI e incubadas por 24 h a 37 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a $3800 \times g$, por 10 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf), lavadas três vezes com PBS (pH 7,2), ressuspensas em 500 μL de PBS e marcadas com LA (1 $\mu\text{g/mL}$ no escuro, 20 min) ou Ro 123 (10 $\mu\text{g/mL}$ no escuro, 10 min). Após a incubação com os marcadores, as células foram lavadas três vezes com PBS, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo.

3.1.2.5 Atividade antibiofilme

A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de 96 poços de poliestireno estéril pelo método de cristal violeta e a capacidade de MvFL em prevenir ou reduzir a formação de biofilme foi determinada. No ensaio, 80 μL de suspensão microbiana (10^8 UFC/mL em NaCl 0,15 M), 80 μL de MvFL (em diferentes concentrações com base na CMI) em água Milli-Q e 40 μL de Caldo Sabouraud Dextrose foram adicionados a cada poço. Água Milli-Q foi usada no lugar de MvFL no controle de formação de biofilme 100% (células não tratadas). O crescimento fúngico foi avaliado seguindo o aumento na densidade óptica a 600 nm após 24 h de incubação a 37 °C. A seguir, as células não aderidas foram removidas dos poços lavando três vezes com NaCl 0,15 M. Os biofilmes foram fixados com solução absoluta de metanol por 30 min, fixados por calor em estufa a 50 °C por 60 min, e então corados com 0,4% (p/v) de cristal violeta por 25 min a 25 °C. O cristal violeta não fixado foi removido com água destilada e o corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto

(25 min). A absorbância a 570 nm foi então medida. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.1.2.6 Avaliação de potencial de sinergismo

Para avaliar o sinergismo entre a lectina e o antifúngico fluconazol, foi utilizada a metodologia de Pillai et al. (2005). Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de Caldo Sabouraud Dextrose. No primeiro poço de uma fileira, foi adicionada a lectina (100 µL) em concentração correspondente a 4xCMI, sendo realizada diluição seriada até o penúltimo poço da fileira. Em seguida, foi adicionada solução do antifúngico (100 µL; 4xCMI) no último poço da mesma fileira e foi efetuada diluição seriada no sentido inverso ao realizado para a lectina, até o segundo poço da fileira. Dessa forma, o primeiro poço continha apenas a lectina, o último poço apenas o antibiótico e os poços intermediários continham misturas com diferentes proporções dos dois agentes. Em um poço de outra fileira foi realizado o controle negativo (100% de crescimento).

Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foram calculados os valores de concentração inibitória fracionada (CIF) e índice de CIF, de acordo com Equações de 1 a 3:

$$CIF_{Antibiótico} = \frac{(CMI_{Antibiótico \text{ na combinação}})}{CMI_{Antibiótico}} \quad (1)$$

$$CIF_{Lectina} = \frac{(CMI_{Lectina \text{ na combinação}})}{CMI_{Lectina}} \quad (2)$$

$$ICIF = CIF_{Lectina} + CIF_{Antibiótico} \quad (3)$$

A partir do ICIF obtido, foi utilizada a seguinte classificação (Kumar *et al.* 2012): ICIF ≤ 0,5 indica sinergismo; 0,5 < ICIF ≤ 1 indica efeito aditivo; 1 < ICIF ≤ 2 indica nenhum efeito; ICIF > 2 indica efeito antagônico.

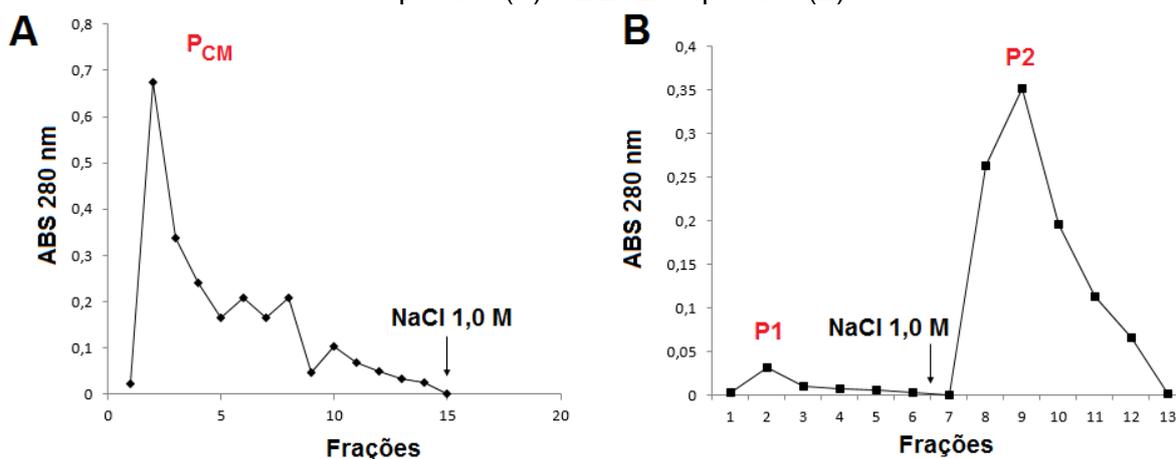
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÃO PROTEOLÍTICA DO RIZOMA DE *M. vacciniifolia*

O extrato de rizoma de *M. vacciniifolia* apresentou uma concentração de 2,44 mg/mL de proteínas e foi capaz de promover a hidrólise da azocaseína, apresentando atividade proteolítica específica de 61,18 U/mg.

Foram utilizadas então técnicas cromatográficas para tentar purificar as proteases presentes no extrato. As matrizes utilizadas, CM-Sephadex e DEAE-Sephadex, atuam como trocadores catiônico e aniônico, respectivamente. Como mostrado na Figura 6A, as proteínas do extrato não se ligaram à matriz CM-Sephadex, sendo obtido um pico de proteínas não-adsorvidas (P_{CM}), recuperadas na etapa de lavagem. Esse pico apresentou atividade proteolítica específica de 34,28 U/mg, porém também se mostrou bastante pigmentado. Diferentemente, na cromatografia em DEAE-Sephadex, foi obtido um pequeno pico de proteínas não-adsorvidas (P1) e um pico principal (P2) de proteínas do extrato que adsorveram à matriz (Figura 6B), sendo eluídas com aumento da força iônica (NaCl 1,0 M).

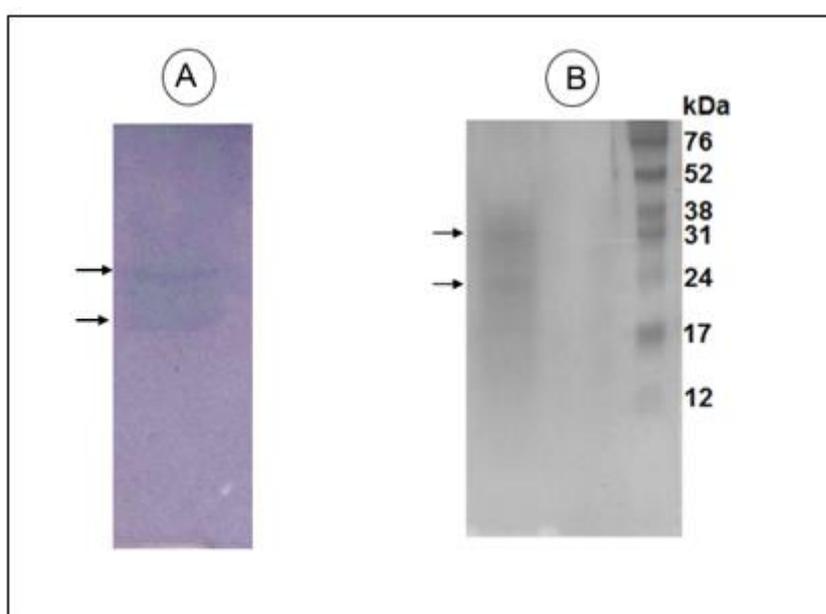
Figura 6 – Cromatografias do extrato de rizoma de *M. vacciniifolia* em matrizes CM-Sephadex (A) e DEAE-Sephadex (B).



P2 apresentou atividade proteolítica específica de 50,04 U/mg e não se mostrou pigmentado, indicando a eliminação de contaminantes na etapa de lavagem. O menor valor de atividade específica em relação ao extrato sugere que outras proteases do extrato não adsorveram à matriz.

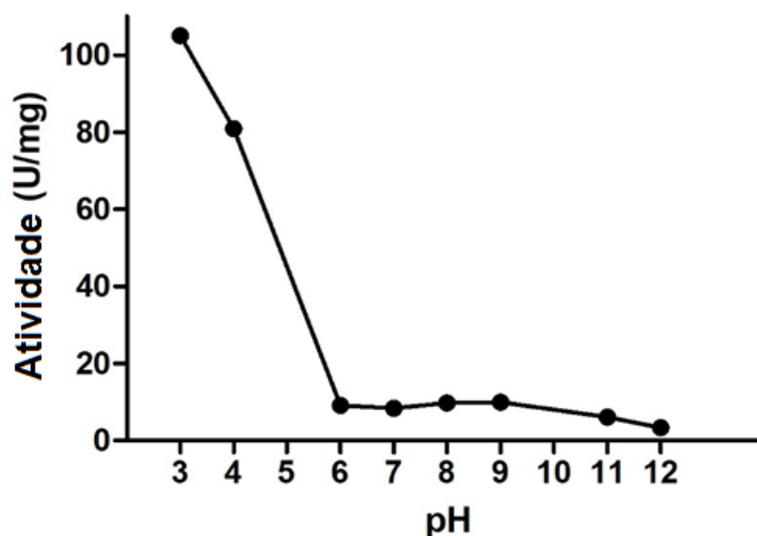
P2 foi então avaliado por PAGE para proteínas nativas básicas ou ácidas. Nenhuma banda polipeptídica foi detectada em PAGE para proteínas básicas, enquanto duas bandas polipeptídicas foram detectadas em PAGE para proteínas ácidas (Figura 7A), indicando a presença de duas proteínas. Em SDS-PAGE, P2 apresentou uma banda de massa molecular de 32,6 kDa e outra 24,2 kDa (Figura 7B), concordando com a presença de duas proteínas na preparação.

Figura 7 - Eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) de P2 em condições nativas para proteínas ácidas (A) e em condições desnaturantes (B)



É essencial conhecer as condições ótimas de pH e temperatura para manutenção da estrutura tridimensional das enzimas, principalmente do seu sítio catalítico (LIMA *et al.* 2014). Foram então avaliados o pH ótimo e a temperatura ótima para a atividade proteolítica de P2. Como mostrado na Figura 8, atividade proteolítica foi mais alta em pH 3 e 4, sendo de 104,97 U/mg e 80,91 U/mg, respectivamente. A atividade proteolítica foi bastante reduzida na faixa do pH 6 ao pH 12.

Figura 8 - Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de pH.



Uma das condições que inibem a atividade proteolítica é a desnaturação proteica provocada por altas temperaturas (ARAUJO *et al.* 2020). Foi avaliado o efeito da temperatura na atividade proteolítica de P2, como observado na Figura 9.

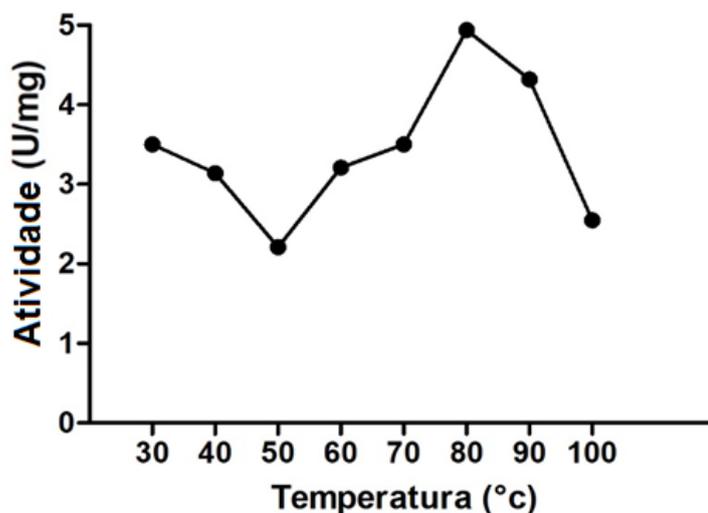
P2 apresentou atividade proteolítica constante nas temperaturas de 30, 40, 60 e 70 °C, com uma leve queda a 50 °C, porém as atividades mais altas foram obtidas nas temperaturas de 80° e 90 °C. Isso indica que as proteases presentes em P2 atuam mesmo em condições extremas de temperaturas. Um aumento da atividade enzimática em função da temperatura pode ser devido a uma maior agitação das moléculas, que pode tornar mais rápido o encontro entre o substrato e a enzima (AZIE *et al.* 2012). Uma protease do fruto tamarillo (*Cyphomandra betacea*) chamada de tamarilina apresentou atividade ótima em temperatura de 60 °C (LI *et al.* 2018).

Para investigar a que classe(s) de proteases pertencem as proteínas presentes em P2, foram determinados os efeitos dos inibidores na atividade proteolítica da protease purificada. O ensaio demonstrou que houve forte inibição por E-64 (98,92%), PMSF (99,25%) e EDTA (99,17%), sugerindo a presença de cisteíno-proteases, serinoproteases e metaloproteases, respectivamente.

A indicação da presença de serinoproteases estimulou a avaliação da atividade tripsina-símile, utilizando o substrato BApNA. P2 foi capaz de hidrolisar esse substrato, indicando a presença de proteases que atuam na clivagem de ligações peptídicas envolvendo o aminoácido arginina. A atividade sobre BApNA foi então utilizada para investigar a cinética enzimática. Observou-se que a curva da atividade tripsina-símile de P2 em função do aumento da concentração de substrato se mostrou

hiperbólica seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten, como apresentado na Figura 10, sendo calculados o valores de $K_m = 2,359 \text{ mM}$ e $V_{\text{máx}} = 0,02413 \text{ mmol BApNa/min}$.

Figura 9 - Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de temperatura.



Por fim, foi avaliado se as proteases de P2 eram capazes de promover a coagulação do leite. A Figura 11 mostra que P2 não promoveu a coagulação do leite, uma vez que não houve formação do coágulo, assim como observado no controle negativo.

Figura 10 - Cinética enzimática da atividade tripsina-símile de P2.

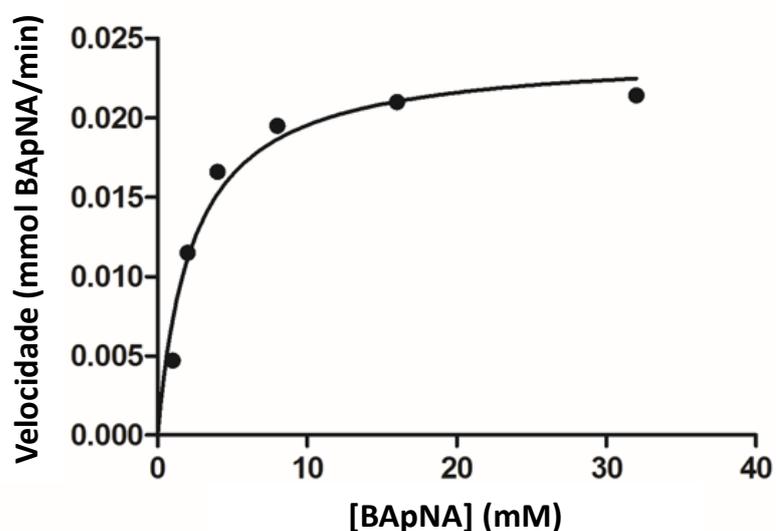
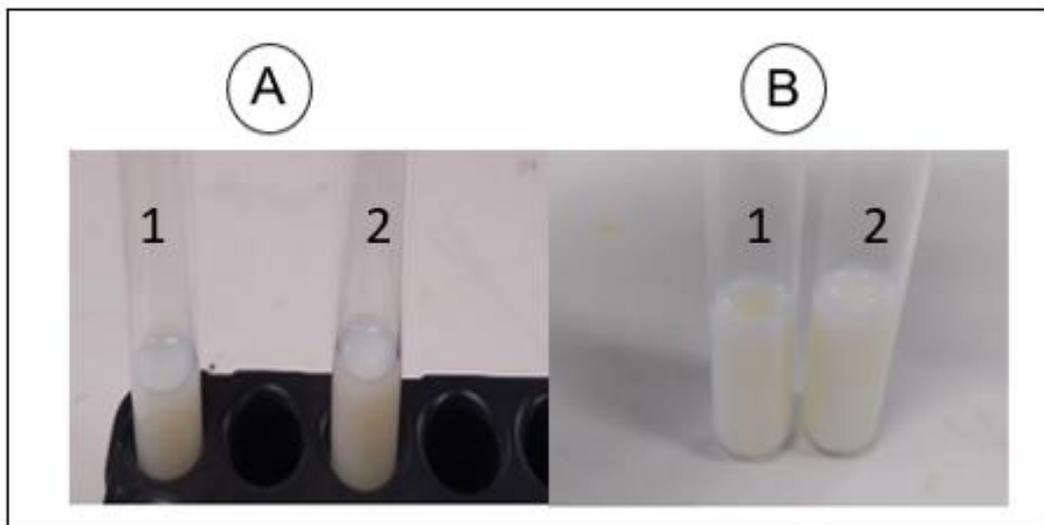


Figura 11 – Avaliação de atividade coagulante de leite. (A) Tempo zero. (B) Após 180 minutos. 1: controle. 2: P2.



4.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA LECTINA DE FRONDE DE *M. vacciniifolia*

MvFL apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de todas as espécies de *Candida* avaliadas. Os valores de CMI e CMF estão apresentados na Tabela 4. Segundo Ríos e Recio (2005), concentrações abaixo de 10 µg/mL para compostos isolados podem ser consideradas promissoras, abrindo novas possibilidades para a descoberta de moléculas ativas para o tratamento de infecções fúngicas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Não foi detectada atividade fungicida para os isolados.

Os valores de CMI encontrados para MvFL são menores ou maiores do que os valores relatados para outras lectinas de plantas contra espécies de *Candida*. Estudos realizados com lectina isolada de *Punica granatum* revelaram, frente aos ensaios antifúngicos que foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* com CMI de 25,0 e 12,5 µg/mL, respectivamente (DA SILVA *et al.* 2018).

Klafke *et al.* (2013) extraíram lectinas antifúngicas das folhas de *Abelmoschus esculentus* e das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna pruriens*, *Clitoria fairchildiana*, *Dioclea virgate* e *Bauhinia variegata*. O CMI de todas as lectinas para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* foi > 500 µg/mL. E os resultados para *C. parapsilosis* não foram constantes, mostrando um CMI variável (de 0,97 a 125 µg/mL para as seis lectinas testadas).

Tabela 3 - Atividade fungistática de MvFL sobre isolados de *Candida*.

Leveduras	MvFL
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	20,00
<i>Candida krusei</i>	1,25
<i>Candida glabrata</i>	0,625
<i>Candida tropicalis</i>	40,00
<i>Candida parapsilosis</i>	40,00

CMI: concentração mínima inibitória.

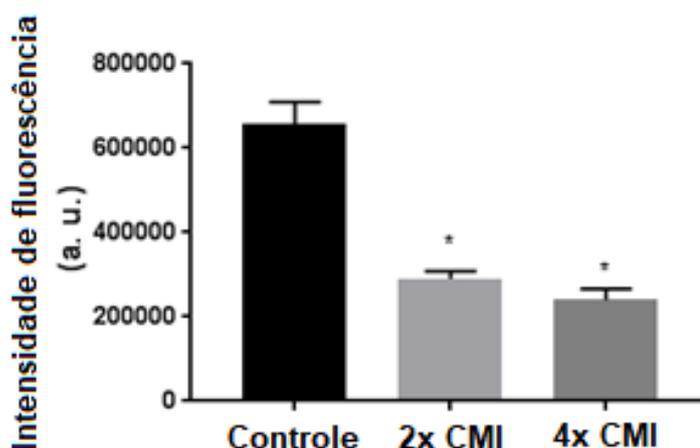
O melhor resultado foi obtido para *C. glabrata*, sendo então avaliados nos experimentos de investigação do mecanismo de ação. Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células de *C. glabrata*, o controle apresentou uma alta intensidade de emissão de fluorescência devido à marcação pela Ro 123, que cora as mitocôndrias em células vivas de uma forma dependente do potencial de membrana. O tratamento com MvFL a 2 x e 4 x CMI demonstrou uma intensidade de fluorescência significativamente reduzida, indicando que houve a despolarização da membrana mitocondrial de *C. glabrata* (Figura 12). A perturbação da membrana mitocondrial causa a despolarização da membrana, levando as alterações nas funções respiratórias e impedindo que a Ro 123 se acumule na mesma (LUDOVICO; SANSONETTY; CÔRTE-REAL, 2001). A alteração do potencial transmembrana pode causar um colapso da membrana, ocasionando uma abertura transitória de poros, liberando fatores pró-apoptóticos no citosol (DA SILVA *et al.* 2014; NETO *et al.* 2014).

Os efeitos de MvFL na integridade da membrana lisossomal de células de *Candida glabrata* também foram analisados. Como indicado na Figura 13, o controle apresentou forte emissão de fluorescência, confirmando que os lisossomos estavam intactos. O tratamento com MvFL comprometeu a membrana lisossomal, como indicado pela redução observada na intensidade de fluorescência quando comparada ao grupo controle.

Análises realizadas dos efeitos da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL), mostraram que a fluorescência da rodamina 123 foi maior quando incubada com as células tratadas com WSMoL, em comparação com o

controle, indicando que os efeitos inibitórios do tratamento levaram inicialmente a uma hiperpolarização da membrana mitocondrial e uma redução do potencial de membrana, atingindo valores semelhantes aos das células controle para *C. albicans* e *C. glabrata*. Nesse estudo, também foi avaliado o efeito da lectina na estrutura e função dos lisossomos das células de *Candida*. No entanto, as células do controle e tratadas apresentaram emissão de fluorescência semelhante no caso de *C. glabrata* e *C. krusei*, sugerindo lisossomos intactos. Nas células de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, ocorreram alterações nos picos de coloração em relação aos controles, mas os valores médios de fluorescência não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$), indicando nenhum dano lisossomal, diferentemente das células tratadas com MvFL para *C. glabrata* (SANTOS et al. 2021).

Figura 12 - Fluorescência da rodamina 123 quando incubada com células de *C. glabrata* tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.



Os lisossomos são organelas ácidas que contêm enzimas hidrolíticas, que estão envolvidas em vários processos celulares, como a maturação de proteínas pós-tradução, degradação do receptor e a liberação extracelular de enzimas ativas. A ruptura da membrana lisossomal provoca liberação no citosol de catepsina D e cisteína, que são classes de proteases lisossomais diretamente responsáveis pela indução da apoptose (HWANG et al. 2011).

Para a avaliação dos efeitos da MvFL sobre a proliferação celular de células de *C. glabrata*, foi usado o marcador CFSE e os resultados estão apresentados na Figura 14.

Figura 13 - Fluorescência da sonda laranja de acridina quando incubada com células de *C. glabrata* tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

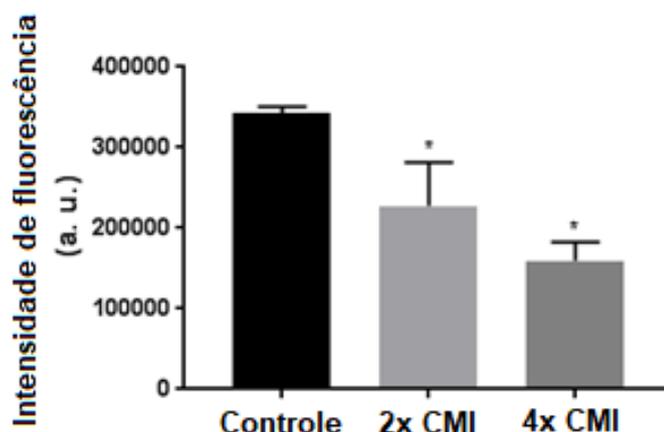
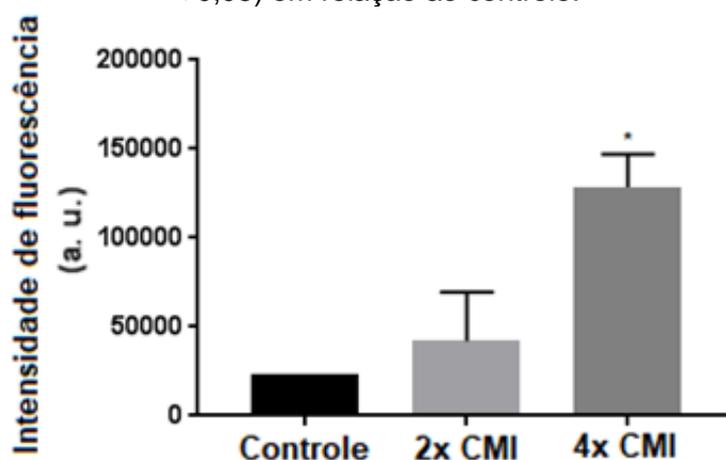


Figura 14 - Fluorescência da sonda CFSE quando incubada com células de *C. glabrata* tratadas ou não com MvFL. CMI: concentração mínima inibitória. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.



O CFSE liga-se de forma covalente às proteínas da célula onde permanece conjugado de forma estável por longo período. Após a divisão celular, cada uma das duas novas células formadas possuirá metade da quantidade de CFSE que estava presente na célula original; logo, quanto maior a taxa de proliferação, haverá um decaimento maior da fluorescência (LAŠT'OVÍČKA *et al.* 2009). Observou-se que a intensidade da fluorescência nos tratamentos com MvFL 2 x CMI e 4 x CMI foi maior que o controle, indicando uma menor proliferação celular, o que confirma uma ação fungistática da lectina por interferir na multiplicação celular.

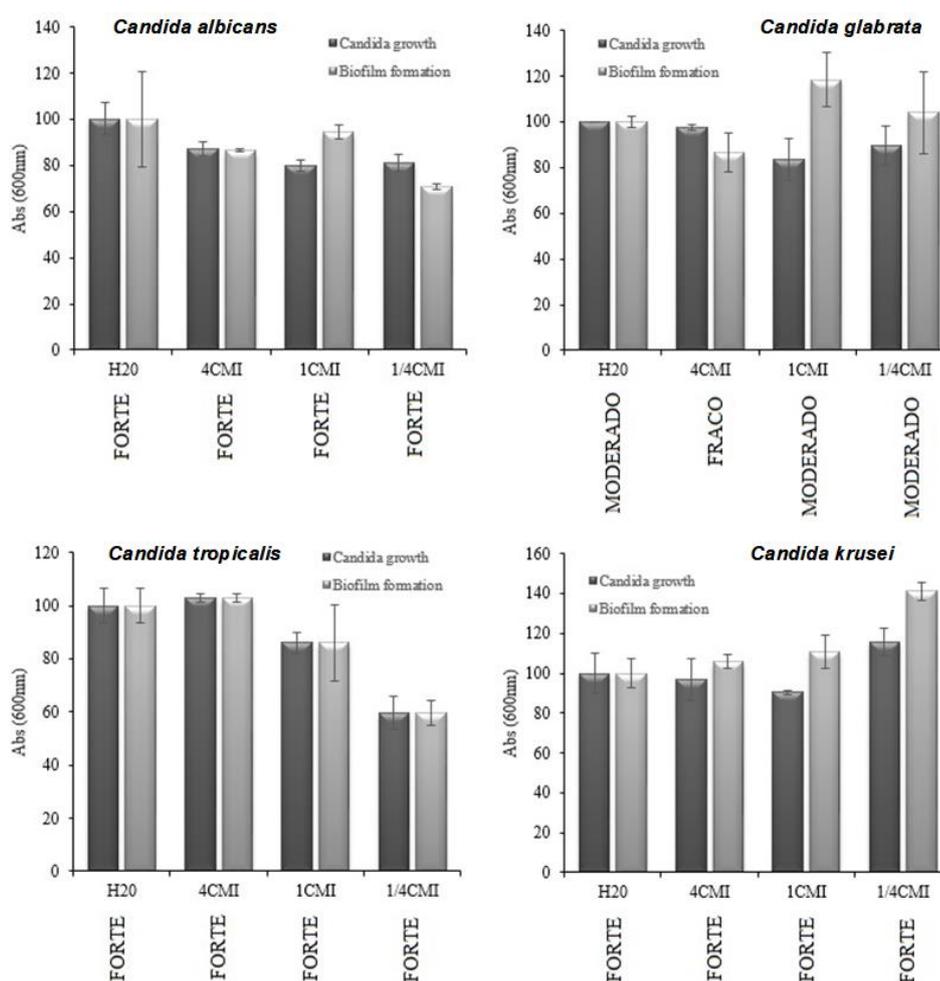
É bem conhecido que as lectinas exibem diversas atividades, uma dessas é a atividade anticâncer. Vários estudos estão sendo desenvolvidos nessa temática. Como por exemplo, Magee *et al.* (2012) isolaram a lectina C-25 de *Cicer arietinum* e investigaram em linhagens de células de câncer de mama e próstata. Além disso, um

outro trabalho utilizando a lectina isolada de *Glycine max* mostrou inibição de proliferação de células cancerígenas como células de leucemia L1210 (NG; NGAI; XIA, 2006), de câncer de mama MCF7 e células de hepatoma HepG2 (LIN; YE; NG, 2008; KUMAR et al. 2014).

Antes de avaliar a atividade antibiofilme de MvFL, foi verificado se os isolados utilizados eram capazes de formar biofilme. Analisando a Figura 15, observa-se que os isolados de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* foram caracterizados como fortes formadores de biofilme, enquanto o isolado de *C. glabrata* foi um formador moderado. O isolado de *C. parapsilosis* não formou biofilme. MvFL teve um efeito redutor sobre a formação de biofilme apenas *C. tropicalis* e na concentração de $\frac{1}{4}$ x CMI. Porém, o nível de formação de biofilme ainda permaneceu forte (Figura 15).

Por fim, foram investigados os efeitos combinatórios de MvFL com fluconazol, um antifúngico comumente utilizado no tratamento da candidíase. Os resultados são apresentados na Tabela 4. Foi detectado efeito aditivo contra *C. krusei* e *C. tropicalis* e efeito sinérgico contra *C. parapsilosis*. Efeito antagônico foi observado para *C. albicans* e *C. glabrata*, uma vez que tanto MvFL quanto fluconazol perderam a atividade.

O aumento do uso de antifúngicos, acarretou o aumento dos números e na variedade de cepas fúngicas resistentes a esses medicamentos, promovendo a busca por terapia alternativa para suprimir o surgimento de resistência antifúngica, uma vez que a presente terapêutica antifúngica comumente usada é frequentemente tóxica (PFALLER, 2012; MANORAJ et al. 2019). Agentes existentes ou novos, mais seguros e eficazes, principalmente de fontes vegetais, podem apresentar sinergia com drogas e pode advir como uma alternativa para minimizar essa problemática (AYAZ et al. 2019).

Figura 15 - Avaliação da atividade de antibiofilme de MvFL sobre isolados de *Candida*.**Tabela 4** - Avaliação do efeito combinatório de MvFL com fluconazol frente às leveduras do gênero *Candida*.

Isolados	CMI (sozinho/ combinação)		ICIF	Efeito da combinação
	MvFL	Fluconazol		
<i>C. albicans</i>	20/ND	0,25/ND	NC	Antagônico
<i>C. krusei</i>	1,25/0,002	32/32	1	Aditivo
<i>C. glabrata</i>	0,625/ND	64/ND	NC	Antagônico
<i>C. tropicalis</i>	40/0,078	4/4	1	Aditivo
<i>C. parapsilosis</i>	40,0/0,625	64/8	0,14	Sinergismo

Concentrações expressas em $\mu\text{g/mL}$. Índice de concentração inibitória fracionada: ICIF. ND: não detectado.

O potencial de lectinas para inibição de formação de biofilmes por espécies de *Candida* tem sido investigado. Ferreira et al. (2018) descreveu a inibição do desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* pela lectina da inflorescência de *Alpinia*

purpurata (ApuL). Inibição significativa do desenvolvimento de biofilme foi observada para *C. albicans* em todas as concentrações avaliadas, sendo esta inibição foi de até 70%. Por outro lado, para *C. parapsilosis*, a atividade foi mínima, não excedendo 25% de inibição após o tratamento com ApuL. Adicionalmente, uma ação sinérgica na combinação ApuL-Fluconazol foi detectada, similarmente ao resultado apresentado nesse estudo para a combinação MvFL-Fluconazol.

Outras classes de produtos naturais também foram capazes de bloquear o desenvolvimento de biofilmes. O extrato hidroalcoólico de *Platonia insignis* (PiHE) e suas frações: diclorometano (DCMF); acetato de etila (FAE) reduziram significativamente ($p < 0,05$) a formação de biofilme em *C. albicans* e *C. glabrata* (SILVA et al. 2020). A combinação contendo uma fração enriquecida com benzofenona obtida da própolis vermelha brasileira (BZP - BRP) e fluconazol, bem como a combinação contendo berberina (BBR) e fluconazol exibiram um efeito sinérgico contra *C. albicans* resistente a fluconazol (LI et al. 2015; PIPPI et al. 2015).

5 CONCLUSÃO

Foi obtida uma preparação parcialmente purificada contendo proteases extraídas do rizoma de *M. vacciniifolia*. O conjunto de proteases presentes mostrou maior atividade em pH ácido e em temperaturas entre 80 e 90 °C, características importantes a serem consideradas em avaliações futuras de aplicações biotecnológicas. Atividade tripsina-símile também foi detectada na preparação que revelou conter cisteíno-proteases, serinoproteases e metaloproteases.

A lectina de fronde de *M. vacciniifolia* (MvFL) apresentou ação fungistática sobre isolados de *Candida*, sendo mais citotóxica para *C. glabrata*. MvFL atua reduzindo a proliferação celular de *C. glabrata*, o que pode estar relacionado com despolarização da membrana mitocondrial e danos às membranas lisossomais. MvFL ainda apresentou efeito sinérgico junto ao fluconazol duas espécies de *Candida*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; SHANBHAG, T.; KOTHARE, A. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 11, 2020.

ABREU, L.R. **Processamento do Leite e Tecnologia de produtos lácteos**. UFLA/FAEPE, Lavras (2005).

ADEKOYA, O. A.; SYLTE, I. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 73, n. 1, p. 7-16, 2009.

ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases of thistle flowers: traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, p. 104709, 2020.

ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, L. R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MELO, A. M. M. A.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.

ALBUQUERQUE, L. P.; SANTANA, G. M. S.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. V.; PAIVA, P. M. G. Antifungal Activity of *Microgramma vacciniifolia* Rhizome Lectin on Genetically Distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, 2013.

ALBUQUERQUE, L.P., SANTANA, G.M.S., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.

ALICI, E. H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.

ALIPOUR, H.; RAZ, A.; ZAKERI, S.; DJADID, N. D. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 975-981, 2016.

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 637-650, 2005.

ARASTEHFAR, A.; LASS-FLORL, C.; GARCIA-RUBIO, R.; DANESHNIA, F.; ILKIT, M.; BOEKHOUT, T.; GABADÓN, T.; PERLIN, D. S. The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 138, 2020a.

ARASTEHFAR, A.; YAZDANPANAH, S.; BAKHTIARI, M.; FANG, W.; PAN, W.; MAHMOUDI, S.; PAKSHIR, K.; DANESHNIA, F.; BOEKHOUT, T.; ILKIT, M.;

PERLIN, D. S.; ZOMORODIN, K.; ZAND, F. Epidemiology of candidemia in Shiraz, southern Iran: A prospective multicenter study (2016–2018). **Medical Mycology**, 2020b.

AYAZ, M.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; ULLAH, F.; OVAIS, M.; AHMED, J.; DEVKOTA, H. P. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 294-303, 2019.

AZIE, N.; NEOFYTOS, D.; PFALLER, M.; MEIR-KRIESCHE, H-U.; QUAN, S-P.; HORN, D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 293-300, 2012.

BAIDAMSHINA, D. R.; KOROLEVA, V. A. S.; TRIZNA, E. Y.; PANKOVA, S. M.; AGAFONOVA, M. N.; CHIRKOVA, M. N.; VASILEVA, O. L.; AKHMETOV, N.; SHIBINA, V. V.; PORFIRYEV, A. G.; SEMENOVA, E. V.; SACHENKOV, O. A.; BOGACHEV, M. I.; ARTYUKHOV, V. G.; BALTIMA, T. V.; HOLYAVKA, M. G.; KAYAMOV, A. R. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4205-4217, 2020.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. 'Species' of peptidases. **Química Biológica**, v. 388, n. 11, pág. 1151-1157, 2007.

BARRETT, A. J.; WOESSNER, J. F.; RAWLINGS, N. D. (Ed.). **Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 1** Elsevier, 2012.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M.G.; WHITE, T. C. Hidden killers: fungal infections in humans. **Scientific Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165, 2012.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A. S.; CUOMO, C. A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.

CASTRO, R. J. S.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalyse Agriculture Biotechnology**, v. 4, p. 679-680, 2015.

CAVALCANTE, T.T.A., et al. Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, p. 3530-3543, 2011.

CAVALCANTE, T. T. A., et al. A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 1073-1078, 2013.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: current evidence and perspectives. **Cancer Letters**, v. 290, n. 2, p. 148-156, 2010.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S. S.; OLIVEIRA, W. F.; PONTUAL, M. C. M. E. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREI, M. T. S. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

COMELLA-BIGLER, FUENTES-PRIOR, P.; MASKOS, K.; HUBER, R.; OYAMA, H.; UCHIDA, K.; DUNN, B. M.; ODA, K.; BODE, W. The 1.4 Å crystal structure of kumamolysin: a thermostable serine-carboxyl-type proteinase. **Structure**, v. 10, n. 6, p. 865-876, 2002.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M. G.; OBREGON, W. D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, 2020.

DA SILVA, C. R.; NETO, J. B. A.; CAMPOS, R. S.; FIGUEIREDO, N. S.; SAMPAIO, L. S.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; GASPAR, D. M.; ANDRADE, G. M.; LIMA, I. S. P.; VIANA, G. S. B.; MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; JÚNIOR, H. V. N. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468-1478, 2014.

DA SILVA, P. M.; MOURA, M. C.; GOMES, F. S.; TRENTIN, D. S.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; MELLO, G. S. V.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; COELHO, L. C. B. B.; MACEDO, A. J.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.

DE ARAÚJO, F. S.; SOUZA, I. H. S.; DE FREITAS, A. C. Estudo das condições de PH e temperatura para a atividade máxima de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 / Estudo das condições de pH e temperatura para atividade máxima de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 3077-3091, 2020.

DE SIQUEIRA PATRIOTA, L. L.; PROCÓPIO, T. F.; BRITO, J. S.; SEBAG, V.; OLIVEIRA, A. P. S.; SOARES, A. K. A.; MOREIRA, L. R.; LIMA, T. A.; SOARES, T.; SILVA, T. D.; PAIVA, P. M. G.; LORENA, V. M. B.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36-46, 2017.

DEWAN, S. S. **Global markets for enzymes in industrial applications**. [S.l.]: BCC Research, 2014. Disponível em: . Acesso em: 12 ago. 2017.

DIAS, L. P.; LE SANTOS, A.; ARAUJO, N. M. S.; SILVA, R. R. S.; SANTOS, M. H. C.; ROMA, R. R.; ROCHA, B. A. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; TEXEIRA, C. S. Machaerium acutifolium lectin alters membrane structure and induces ROS production in Candida parapsilosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 19-25, 2020.

DICKINSON, W.C. Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press, San Diego, 2000.

EKICI, Ö. D.; PAETZEL, M.; DALBEY, R. E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. **Protein Science**, v. 17, n. 12, p. 2023-2037, 2008.

ELLEUCH, J.; KACEM, F. H.; AMOR, F. B.; HADRICH, B.; MICHAUD, P.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S. Extracellular neutral protease from Arthrospira platensis: Production, optimization and partial characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, 2020.

FARIA, D. R.; SAKITA, K. M.; CAPOCI, I. R. G.; ARITA, G. S.; JUNIOR, A. G. O.; FELIPE, M. S. S.; MENDONÇA, P. S. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, E. S. Promising antifungal activity of new oxadiazole against Candida krusei. **Plos one**, v. 15, n. 1, 2020.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

FERREIRA, G. R. S.; BRITO, J. S.; PROCÓPIO, T. F.; SANTOS, N. D. L.; DE LIMA, B. J. R. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, T.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H. Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 152-162, 2018.

FILHO, R. N. F. M.; VASCONCELOS, N. F.; ANDRADE, F. K.; ROSA, M. F.; VIEIRA, R. S. Papain immobilized on alginate membrane for wound dressing application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, 2020.

FITZHUGH, D. J.; SHAN, S.; DEWHIRST, M. W.; HALE, L. P. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clinical Immunology**, v. 128, p. 66-74, 2008.

FOLLY, M. L. C.; FERREIRA, G. F.; SALVADOR, M. R.; SATHLER, A. A.; DA SILVA, G. F.; DENADAI, A. M.; RODRIGUES, I. V.; MENDONÇA, L. M.; LANG, K. L. Evaluation of in vitro Antifungal Activity of Xylosma prockia (Turcz.) Turcz.(Salicaceae) Leaves Against Cryptococcus spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3114, 2020.

GALLEGOS, I. B.; MARTINEZ, R.; PREFEITA, L. P-C.; SOCORRO, P. Lectins in human pathogenic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 72-75, 2014.

GÓMEZ, R.; VIOQUE, M.; TEJADA, L.; MATA, C.; SÁNCHEZ, E.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 1, p. 16-19, 2001.

GONG, R.; LEE, D. Y.; LEE, J.; CHOI, D.; KIM, G-S.; LEE, S.; LEE, Y-S. Potentiating activity of rhein in targeting of resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 1, p. 14, 2019.

GOVENDER, N. P.; PATEL, J.; MOGOBO, R. E.; NAICKER, S.; WADULA, J.; HHITELAW, A.; COOVADIA, Y.; KULARATHE, R.; GOVIND, C.; LOCKHART, S. R.; ZIETSMAN, I. L. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994-2004, 2016.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112-122, 2012.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; KOZAK, M.; GRUBB, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

HA, M.; BEKHIT, A. E.; CARNE, A.; HOPKINS, D. L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 95-105, 2012.

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J.; CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; NOVÁK, A.; LOZOYA-PÉREZ, N. E.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; SALINAS-MARÍN, R.; HERNÁNDEZ, N. V.; MARTÍNEZ-DUNCKER, I.; GÁCSE, A.; MORA-MONTES, H. M. Role of Protein Mannosylation in the *Candida tropicalis*-Host Interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2743, 2019.

HEUTINCK, K. M.; BERGE, I. J. M.; HACK, C. E.; HAMANN, J.; ROWSHANI, A. T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1943-1955, 2010.

HUA, Y.; NAIR, S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 2, p. 195-208, 2015.

HWANG, B.; HWANG, J-S.; LEE, J.; KIM, J-K.; KIM, S. R.; KIM, Y.; LEE, D. G. Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 1, p. 89-93, 2011.

JAYAWARDANA, I. A.; BOLAND, M. J.; HIGGS, K.; ZOU, M.; LOO, T.; MCNABB, W. C.; MONTOYA, C. A. The kiwifruit enzyme actinidin enhances the hydrolysis of gluten proteins during simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 30, 2021.

JUNG, J.; BAE, Y.; CHO, Y. K.; REN, X.; SUN, Y. Structural insights into conformation of amphiphilic quaternary ammonium chitosans to control fungicidal and anti-biofilm functions. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 115391, 2020.

JUN-HUI, X.; HUI-JUAN, C.; BIN, Z.; HUI, Y. The mechanistic effect of bromelain and papain on tenderization in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle. **Food Research International**, v. 131, 2020.

KHATIB, R.; JOHNSON, L. B.; FAKIH, M. .; RIEDERER, K. BRISKI, L. Current trends in candidemia and species distribution among adults: *Candida glabrata* surpasses *C. albicans* in diabetic patients and abdominal sources. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 781-786, 2016.

KLAFKE, G. B.; MOREIRA, G. M. S. G.; MONTE, L. G.; PEREIRA, J. L.; BRANDOLT, T. M.; XAVIER, M. O.; SANTI-GADELHA, T.; DELLAGOSTIN, O. A.; PINTO, L. S. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1-2, p. 147-151, 2013.

KLEIN, R.C., et al. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts *Staphylococcal* biofilms. **PLoS ONE** 10, e0120514, 2015.

KUMAR, S. N.; SIJI, J. V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

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.

LAM, S. K. & NG T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89 p. 45–55, 2011.

LASTOVICKA, J.; BUDINSKY, V.; SPISEK, R.; BARTUNKOVA, J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. **Celular Immunology**, v. 256, p. 79-85, 2009.

LI, L. P.; LIU, W.; LIU, H.; ZHU, F.; ZHANG, D. Z.; SHEN, H.; XU, Z.; QI, Y. P.; ZHANG, S. Q.; CHEN, S. M.; HE, L. H.; CAO, X. J.; ZHANG, J. D.; YAN, L.; AN, M. M.; JIANG, Y. Y. Synergistic antifungal activity of berberine derivative B-7b and fluconazole. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126393, 2015.

LI, Z.; SCOTT, K.; HEMAR, Y.; ZHANG, H.; OTTER, D. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food Chemistry**, v. 256, p. 228-234, 2018.

- LIMA, L. A.; FILHO, R. F. C.; SANTOS, J. G.; SILVA, W. C. Production of collagenolytic protease by *Bacillus stearothermophilus* from an Amazonian soil. **ACTA AMAZONICA**, v. 44, n. 4, p. 403-409, 2014.
- LIN, P.; YE, X.; NG, T. B. Purification of melibiose-binding lectins from two cultivars of Chinese black soybeans. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 40, n. 12, p. 1029-1038, 2008.
- LI-PING, G. A. N.; REN-HUA, L. I. U.; YAN-JIE, L. I. Serine proteinase (SP) and serine protease inhibitor (serpin) gene expression after hormone treatment in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1203-1210, 2016.
- LIU, J.; SHARMA, A.; NIEWIARA, M. J.; SINGH, R.; MING, R.; YU, Q. Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2018.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 800-808, 2007.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews molecular Cell Biology**, v. 3, n. 7, p. 509-519, 2002.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: enzimas multifuncionais na vida e na doença. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.
- LUDOVICO, P.; SANSONETTY, F.; CÔRTE-REAL, M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v. 147, n. 12, p. 3335-3343, 2001.
- LUO, J.; XIAO, C.; ZHANG, H.; REN, F.; LEI, X.; YANG, Z.; YU, Z. Characterization and milk coagulating properties of *Cynanchum otophyllum* Schneid. proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2842-2850, 2018.
- MAGEE, P. J.; OWUSU-APENTEN, R.; MCCANN, M. J.; GILL, C. I.; ROWLAND, I. R. Chickpea (*Cicer arietinum*) and other plant-derived protease inhibitor concentrates inhibit breast and prostate cancer cell proliferation in vitro. **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 5, p. 741-748, 2012.
- MAMBOYA, E. A. F. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 99-104, 2012.
- MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; VILLA-TANACA, L.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MERCADO-FLORES, Y. Secreted fungal aspartic proteases: a review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 76-82, 2016.
- MANORAJ, A.; THEVANESAM, V.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, A.; LIYANAPATHIRANA, V. Synergistic activity between *Triphala* and selected

antibiotics against drug resistant clinical isolates. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 199, 2019.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; YADA, R. Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2147-2163, 2018.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5-6, p. 405-419, 2002.

MONTAGNA, M. T.; LOVERO, G.; BORGHI, E.; AMATO, G.; ANDREONI, S.; CAMPION, L.; LOS CASCIO, G.; LOMBARDI, G.; LUZZARO, F.; MANSO, E.; MUSSAP, M.; PECILE, P.; PERIN, S.; TANGORRA, E.; TRONCI, M.; LATTA, R.; MORACE, G. Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 661-674, 2014.

MORAN, R.C.; CHURCHILL, B. H.; FORERO, F.; LUTEYN, J. **The importance of mountains to pteridophytes, with emphasis on neotropical montane forests.** Churchill (ed), S.P. Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forest. New York, The New York Botanical Garden, p. 359-363, 1995.

MORELLON-STERLING, R.; EL-HOCINE, S.; TAVANO, O .L.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

MORO, L. P. *et al.* A new thiol-dependent serine protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. **FEBS Journal**, p. 393-393, 2008a.

MORO, L. P.; MURAKAMI, M. T.; CABRAL, H.; VIDOTTO, A.; TAJARA, E. H.; AMI, R. K.; JULIANO, L.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification, biochemical and functional characterization of milliin, a new thiol-dependent serine protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. **Protein and Peptide Letters**, v. 15, n. 7, p. 724-730, 2008b.

MUGITA, N.; NAMBU, T.; TAKAHASHI, K.; WANG, P-L.; KOMASA, Y. Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 82, p. 233-240, 2017.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

NAVARRO-ARIAS, M. J.; HÉRNANDEZ-CHAVEZ, M. J.; GARCIA-CARNERO, L. C.; AMEZCUA-HERNÁNDEZ, D. G.; LOZOYA-PÉREZ, N. E.; ESTRADA-MATA, E.; MARTÍNEZ-DUNCKER, I.; FRANCO, B.; MORA-MONTES, H. M. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and

Candida auris by human innate immune cells. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 783, 2019.

NELSON, D. L., COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th ed. New York: Freeman, W. H. & Company, p. 1328, 2013.

NETO, J. B. A. *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 93698, 2014

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NG, T. B.; NGAI, P. H. K.; XIA, L. An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. **Mycologia**, v. 98, n. 2, p. 167-171, 2006.

NOUNOU, M. I.; ZAGHLOUL, T. I.; AHMED, N. A.; EID, A. A.; EL-KHORDAGUI, L. K. Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: Application to transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1-2, p. 423-432, 2017.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* DC). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, n. 2, p. 122-132, 2002.

PAGE, M. J.; CARREL, C. J.; CERA, E. D. Engineering Protein Allostery: 1.05 Å Resolution Structure and Enzymatic Properties of a Na⁺-activated Trypsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 2, p. 666-672, 2008.

PAIVA, L. C. F.; VIDIGAL, P.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 497-502, 2012.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113–118, 1992

PAIVA, P.M.G.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. **Lectins and trypsin inhibitors from plants, biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae** (1st ed.), Nova Science Publishers Inc., New York (2013).

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI, F.; FLEVARI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014.

PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Carnein, a serine protease from the weed *Ipomoea carnea* (ipomea). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5809-5818, 2007.

PAVAN, R.; JAIN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. **Biotechnology Research International**, v. 2012, 2012.

PERALTA, M. A.; DA SILVA, M. A.; ORTEGA, M. G.; CABRERA, J. L.; PARAJE, M. G. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11, p. 975-980, 2015.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M.G.; BARNES, R.; HU, B.; VASELOV, A. V.; TIABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L. Results of the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of the susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole using standardized disk diffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5848-5859, 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; TURNIGE, J. D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, p. 79-94, 2019.

PFALLER, M. A.; DO AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Antifungal resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 3-13, 2012.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

Pillai, S. K.; Moellering, R. C. Antimicrobial combinations. *Antibiotics in laboratory medicine*. **Lippincott Williams & Wilkins**, New York; 365-400, 2005.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GUEZ, C. M.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L. F. S.; POSER, G. L.; FUENTEFRIA, A. M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

POLAINA, J.; MACCABE, A. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. **Dordrecht: Springer**, p. 641, 2007.

POLGÁR, L. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier Ltd, p. 1773-1784, 2013.

PONTUAL, E. V.; CARVALHO, B. E. A.; BEZERRA, R. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848-1854, 2012.

POSTERARO, B.; TORELLI, R.; VELLA, A.; LEONE, P. M.; ANGELIS, G.; DE CARLOS, E.; VENTURA, G.; SANGUINETTI, M.; FANTONI, M. Pan-Echinocandin-Resistant *Candida glabrata* Bloodstream Infection Complicating COVID-19: A Fatal Case Report. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 163, 2020.

PROCÓPIO, T. F.; PATRIOTA, L. L. S.; MOURA, M. C.; DA SILVA, P. M.; OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; LIMA, T. A.; SOARE, T.; DA SILVA, T. D.; COELHO, L. C. B. B.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

PROCÓPIO, T.F.; MOURA, M.C.; ALBUQUERQUE, L. P.; GOMES, F.S. SANTOS, N. D. L.; COELHO, L. C. B. B.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential Antibacterials – Synthesis, Properties and Biological Activities, **Nova Science Publishers Inc**, New York, p. 69-89, 2017.

RAWLINGS, N. D. ; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, pág. 227-233, 2010.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

RYDER, K.; HA, M.; BEKHIT, A. E.; CARNE, A. Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. **Food Chemistry**, v. 172, p. 197-206, 2015.

SALEHI, M.; AGHAMAALI, M. R.; SAJEDI, R. H.; ASGHARI, S. M.; JORJANI, E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 847-854, 2017.

SANTOS, L. M. M.; SILVA, P. M.; MOURA, M. C.; AMORIN, P. K.; PROCÓPIO, T. F.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, L. C. N.; PAIVA, P. M.G.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H. Anti-*Candida* activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). **Journal de Mycologie Médicale**, artigo 101074, 2021.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SHIVAMADHU, M. C.; BALAJI, K. S.; JAYARAMA, S. Haemostatic property of new Cystein protease (s) from *Sesbania grandiflora*: It's action on fibrinogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 10-14, 2017.

SILVA, A. F.; ROCHA, C. Q.; SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, A. R. C.; MENDES, I. N. F. V.; ARARUNA, A. B.; MOTTA, E. P.; SILVA, R. S.; CAMPOS, C. D. L.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, A. S.; ILVA, D. H. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO, C. A. Antifungal and Antivirulence Activities of Hydroalcoholic Extract and Fractions of *Platonia insignis* Leaves against Vaginal Isolates of *Candida* Species. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 84, 2020.

SILVA, P. M. S.; DE OLIVEIRA, W. F.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. . Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 234-244, 2019.

SONG, Y. J.; YU, H. H.; KIM, Y. J.; LEE, N-K.; PAIK, H-D. The use of papain for the removal of biofilms formed by pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. **LWT**, v. 127, 2020.

TABAH, A.; KOULENTI, D.; LAUPLAND, K.; MISSET, B.; VALLES, J.; DE CARVALHO, F. B.; PAIVA, J. A.; CAKAR, N.; MA, X.; EGGIMAN, P.; ANTONELLI, M.; CSOMOS, A.; KRUEGER, W. A.; VESIN, A.; CARLET, J.; RELLO, J.; TIMSIT, J-F. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROACT International Cohort Study. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1930-1945, 2012.

TAN, T. Y.; TÁN, A. L.; TEE, N. W. S.; NG, L. S. Y.; CHEE, C. J. Increasing the role of non-albicans species in candidemia: results of a 3-year surveillance study. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 515-521, 2010.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TITO, F. R.; PEPE, A.; TONON, C. V.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs). **International Dairy Journal**, v. 104, 2020.

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A Stable Serine Protease, Wrightin, from the Latex of the Plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: Purification and Biochemical Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, pág. 1479-1487, 2008.

TÓTH, R.; NOSEK, J.; MORA-MONTES, H.M.; GABALDON, T.; BLISS, J. M.; NOSANCHUCK, J. D.; TURNER, S. A.; BUTLER, G.; VÁGVOLGYI, C.; GÁCSEK, A.

Candida parapsilosis: from genes to the bedside. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Protease signalling: the cutting edge. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 7, p. 1630-1643, 2012.

TURK, B.; STOKA, V. Sinalização de protease na morte celular: caspases versus cisteínicas. **Cartas FEBS**, v. 581, n. 15, pág. 2761-2767, 2007.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326-333, 2014.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C. C. W.; NG, T. B. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**, v. 20, pp. 3791-3810, 2015.

ZACCHINO, S. A.; BUTASSI, E.; CORDISCO, E.; SVETAZ, L. A. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. **Phytomedicine**, v. 37, p. 14-26, 2017.

ZHANG, Z.; HE, L.; HU, S.; WANG, Y.; LAI, Q.; YANG, P.; YU, Q.; ZHANG, S.; XIONG, F.; NING, Q.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; XIANG, X.; ZHOU, Z.; SUN, H.; WANG, C-Y. AAL exacerbates pro-inflammatory response in macrophages by regulating mincle/Syk/Card9 signaling along with the Nlrp3 inflammasome assembly. **American Journal of Translational Research**, 7, p. 1812-1825, 2015.