



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CAMPUS PROFESSOR ANTÔNIO GARCIA FILHO  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO

KANANDA FRANCIELE SOUZA SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FRAÇÕES DO GEL DE *Aloe vera* (L.) BURM. F. FRENTE À *Candida albicans***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto  
Fevereiro, 2019

KANANDA FRANCIELE SOUZA SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FRAÇÕES DO GEL DE *Aloe vera* (L.) BURM. F.  
FRENTE À *Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia Filho, como exigência para a obtenção do Diploma de Graduação em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

Lagarto  
Fevereiro, 2019

KANANDA FRANCIELE SOUZA SANTOS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FRAÇÕES DO GEL DE *Aloe vera* (L.) BURM. F.  
FRENTE À *Candida albicans***

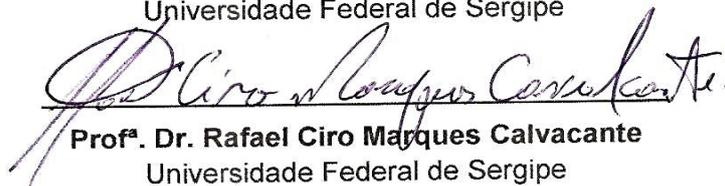
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia Filho, como exigência para a obtenção do Diploma de Graduação em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

Aprovado em: 18 / 02 / 19



**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Pereira Lobato**  
Universidade Federal de Sergipe



**Prof<sup>ª</sup>. Dr. Rafael Ciro Marques Calvacante**  
Universidade Federal de Sergipe

Dedico este trabalho a minha família que é a minha base. Em especial a minha irmã Karen que através dela pude finalizar os meus estudos e realizar este grande sonho.

*“Pense grande e os teus feitos  
crescerão...”*

Manuel Bastos Tigre

# POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FRAÇÕES DO GEL DE *Aloe vera* (L.) BURM. F. FRENTE À *Candida albicans*

Kananda Franciele Souza Santos, Lagarto, 2019

A espécie *Aloe vera* (L.) Burm.F. (Xanthorrhoeaceae), conhecida popularmente como babosa, é utilizada desde a antiguidade para diversos fins. Da sua parte mais utilizada, o gel das folhas, foi descoberta uma proteína de massa molecular 14 kDa que possui uma potente ação antifúngica frente à *Candida albicans*. Tendo em vista que as opções terapêuticas disponíveis para tratar infecções fúngicas apresentam limitações busca-se por substâncias que, além de inibir o crescimento microbiano, combatam seus fatores de virulência, auxiliando no tratamento das infecções. Assim, o objetivo do presente trabalho foi obter frações proteicas de *A. vera*, caracterizá-las e avaliar a ação antifúngica frente à *Candida albicans*, bem como avaliar o efeito de inibição de da formação de biofilme. O processo de obtenção das proteínas do gel de *A. vera* foi realizado utilizando técnicas de partição líquido-líquido trifásica e diálise. Na primeira etapa do processo, foi realizada uma partição líquido-líquido trifásica, utilizando *t*-butanol, tampão tris-hidroximetilaminometano (TRIS, 50 mM, pH 8,0) e solução de sulfato de amônio (1,6 M). A fração obtida, após esta etapa, foi dissolvida em tampão TRIS e dialisada, por um período de 24 h a 4°C, sob agitação constante. As duas frações obtidas após a diálise foram liofilizadas e quantificadas pelo método de Bradford. Os ensaios de atividade antifúngica foram conduzidos pelo método da microdiluição em placa de 96 poços e, posteriormente, com a mesma placa realizou-se a avaliação da formação de biofilme. Não foi possível detectar/quantificar as proteínas presentes nas frações, entretanto por meio de uma análise por RMN verificou-se a presença de açúcares. Estas frações nas concentrações de 250; 125; 31,2 e 7,8 µg/ mL, apresentaram atividade antifúngica no que concerne à inibição da formação de biofilme de *C. albicans*, inibindo cerca de 70% do mesmo. Assim espera-se que estes resultados possam contribuir com a descoberta de novos protótipos a fármacos antifúngicos.

**Palavras-Chave:** Babosa; partição líquido-líquido trifásica; Bradford; biofilme.

## **ANTIFUNGAL POTENTIAL OF FRACTIONS FROM *Aloe Vera* (L.) BURM. F. GEL AGAINST *Candida albicans***

Kananda Franciele Souza Santos, Lagarto, 2019

The species *Aloe vera* (L.) Burm.F. (Xanthorrhoeaceae), popularly known as slug, has been used since antiquity for various purposes. From its most used part, leaf gel, was discovered a protein of molecular mass 14 kDa that has a potent antifungal action against *Candida albicans*. Considering that the therapeutic options available to treat fungal infections present limitations, it is sought for substances that, in addition to inhibiting microbial growth, combat their virulence factors, aiding in the treatment of infections. Thus, the objective of the present work was to obtain protein fractions of *A. vera*, to characterize them and to evaluate the antifungal action against *Candida albicans*, as well as to evaluate the effect of inhibition of biofilm formation. The process of obtaining *A. vera* gel proteins was performed using three-phase liquid-liquid partitioning and dialysis techniques. In the first step of the process, a three-phase liquid-liquid partition was performed using t-butanol, tris-hydroxymethylaminomethane buffer (TRIS, 50 mM, pH 8.0) and ammonium sulfate solution (1.6 M). The fraction obtained after this step was dissolved in TRIS buffer and dialyzed for a period of 24 h at 4 ° C under constant stirring. The two fractions obtained after dialysis were lyophilized and quantified by the Bradford method. The antifungal activity assays were conducted by the 96-well plate microdilution method, and then the biofilm formation evaluation was performed with the same plate. It was not possible to detect / quantify the proteins present in the fractions, however by an NMR analysis the presence of sugars was verified. These fractions at the following concentrations of 250; 125; 31.2 and 7.8 µg / mL, presented antifungal activity with respect to the inhibition of *C. albicans* biofilm formation, inhibiting about 70% of it. Thus it is expected that these results may contribute to the discovery of new prototypes to antifungal drugs.

**Keywords:** Babosa; three-phase liquid-liquid partition; Bradford; biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Folhas e flores da Babosa ( <i>Aloe vera</i> ). .....	10
<b>Figura 2.</b> Gel da Babosa ( <i>Aloe vera</i> ). .....	10
<b>Figura 3.</b> Esquema geral de obtenção, caracterização e avaliação da atividade biológica. ....	19
<b>Figura 4.</b> <i>Aloe vera</i> no local da coleta. ....	20
<b>Figura 5.</b> . Liofilizador Liotop® L101 com as amostras .....	21
<b>Figura 6.</b> Representação ilustrativa do procedimento de partição líquido-líquido trifásica (TPP). ....	22
<b>Figura 7.</b> . Ilustração do sistema de diálise. Início (A) e final do processo de difusão das proteínas (B). ....	23
<b>Figura 8.</b> Sistema de diálise montado no refrigerador. ....	23
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática das diluições seriadas no preparo das soluções de BSA e placa de 96 poços com orifícios destacados onde foram colocadas as soluções. ....	24
<b>Figura 10.</b> Representação ilustrativa do procedimento de diluição seriada em placa de 96 poços. ....	26
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do procedimento de inibição do biofilme. ...	27
<b>Figura 12.</b> Curva de calibração construída utilizando BSA nas concentrações de 0; 0,062; 0,125; 0,250; 0,500 e 1 mg/mL. A absorbância foi determinada a 595 nm. ...	30
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O, 400 MHz) da fração externa do gel de <i>Aloe vera</i> (AV-FE) e ampliação da região 3,4-4,0 ppm .....	32
<b>Figura 14.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O, 400 MHz) da fração interna do gel de <i>Aloe vera</i> (AV-FI) e ampliação da região 3,4-4,0 ppm. ....	33
<b>Figura 15.</b> Efeito das diferentes concentrações da FE de <i>Aloe vera</i> sobre o crescimento da <i>Candida albicans</i> . Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey (p < 0,05). ....	34
<b>Figura 16.</b> . Efeito das diferentes concentrações da FI de <i>Aloe vera</i> sobre o crescimento da <i>Candida albicans</i> . Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey (p < 0,05). ....	34

**Figura 17.** Efeito das diferentes concentrações da FE de *Aloe vera* na formação de biofilme de *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam que há diferença estatística ....35

**Figura 18.** Efeito das diferentes concentrações da FI de *Aloe vera* na formação de biofilme de *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. ...36

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentrações de BSA e suas respectivas absorvâncias (595 nm) .....29
- Tabela 2.** Valores das absorvâncias (595 nm) das soluções de *A. vera* (1 g/mL) ....30

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Metabólitos primários encontrados no gel de <i>A. vera</i> .....	11
<b>Quadro 2.</b> Metabólitos secundários encontrados no gel de <i>A. vera</i> . ....	11
<b>Quadro 3.</b> Classificação dos antifúngicos com base em seus alvos terapêuticos ....	14

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1 Coleta e obtenção do gel das folhas de <i>Aloe vera</i> .....	20
3.2 Liofilização do gel.....	21
3.3 Partição Líquido-Líquido trifásica (“Three-Phase Partitioning for Protein Purification”, TPP) .....	21
3.4 Diálise.....	22
3.5 Quantificação de proteína por Bradford .....	24
3.7 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima .....	26
3.7 Avaliação da inibição do fator de virulência - Biofilme.....	27
3.8 Análise estatística .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Quantificação de proteínas por Bradford.....	29
4.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética (RMN) .....	32
4.3 Atividade antifúngica e inibição da formação de biofilme .....	34
5 CONCLUSÃO.....	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

# 1 INTRODUÇÃO

*Aloe vera* é uma planta conhecida, popularmente, por aloe, aloe-de-curaçao e babosa. Esta planta pertence à família *Xanthorrhaceae* e ao gênero *Aloe* (FREITAS, 2014). Este gênero possui cerca de 400 espécies diferentes, porém, nem todas são seguras para o uso em humanos. Isso não ocorre com a *A. vera*, pois, é uma das espécies mais estudadas e utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas (MARTINS, 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

Porém, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através do Informe Técnico nº. 47, de 16 de novembro de 2011, não permite o uso de *A. vera* como alimento.

Suas folhas são verdes, grossas, suculentas, com presença de dentes espinhosos nas margens (LORENZI e MATOS, 2008). Contém em seu interior, uma polpa, um líquido claro e viscoso, denominado gel, o qual ocupa a maior parte do volume de sua folha (ARO, 2012; SILVA et al., 2013). O gel é parte mais usada e estudada, devido a sua complexa composição química. Apresenta alto teor de água (99,0 a 99,5%) e uma diversidade de metabólitos primários e secundários (LÓPEZ et al., 2016).

No que concerne à atividade antifúngica, os metabólitos primários que apresentam essa ação terapêutica são mananas acetiladas (YATES, 2012); ácido málico (FLORES-LÓPEZ et al., 2016) e uma nova proteína de massa molecular 14 kDa (DAS et al., 2011). Já os metabólitos secundários com essa mesma ação são representados pelas antraquinonas: aloína e aloe-emodina.

Diante da diversidade de metabólitos presentes no gel de *A. vera*, da crescente incidência de infecções fúngicas e do uso limitado das opções terapêuticas atuais que há o interesse em descobrir novas substâncias com ação antifúngica. O uso desses fármacos apresenta limitações devido a sua elevada toxicidade, principalmente com os polienos e, devido ao surgimento da resistência de fungos tanto aos azóis quanto as equinocandinas (MACÊDO et al., 2009; ÂNGELO, 2017; ROMO et al., 2017).

As restrições desses medicamentos estabelecem a necessidade de desenvolver novos agentes antifúngicos, particularmente, com mecanismos de ação inovadores. Um dos artifícios que está se destacando com o propósito de contornar

essas limitações é o uso de inibidores de fatores de virulência do patógeno, uma vez que estes fatores causam vários danos ao hospedeiro, aumentando o poder de infecção destes microrganismos (PIERCE e LOPEZ-RIBOT, 2013; ROMO et al., 2017).

Outro foco de estudo é a utilização de proteínas, visto que alguns peptídeos são considerados novas alternativas para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos (AMP –“antimicrobial peptides or proteins”) (RUAS, 2010).

Em vista disso, o presente trabalho tem como objetivo realizar a extração e isolamento de proteínas do gel de *A. vera* e realizar a avaliação da ação antifúngica bem como da inibição do fator de virulência de *Candida albicans*, o biofilme. Posto que os fungos são seres vivos eucariontes, há um número limitado de alvos específicos refletindo em um arsenal terapêutico reduzido. Além disso os antifúngicos existentes têm sua efetividade comprometida pela toxicidade e desenvolvimento da resistência. Com o intuito de contornar todos esses problemas busca-se descobrir novos fármacos que possuam novos mecanismos de ação mais eficazes e com menos chances de causar problemas relacionados a medicamentos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Aloe vera*

O nome *Aloe* é derivado de uma palavra arábica Alóe que significa substância amarga e brilhante e o nome *vera* significa verdadeira (PARENTE et al, 2013). O uso da *Aloe vera* é encontrado em literaturas de variadas culturas populares, como a dos povos mesopotâmicos em 2100 a.C, quando foi realizado o primeiro registro da planta em uma tabuleta de argila (FREITAS, 2014).

Foi utilizada também pelos povos do Antigo Egito, principalmente pela rainha Cléopatra que a utilizava para fins estéticos, tais como massagear a pele e na forma de máscara de beleza (AZEVEDO, 2005). Apesar de ter um nome de origem arábica, a *Aloe vera* originou-se na África do Sul e por intermédio dos indígenas a planta foi disseminada para outras localidades, como os Estados Unidos e o Brasil (PARENTE et al, 2013).

Na literatura é encontrada, principalmente, com a sinonímia *Aloe barbadensis Mill.* É conhecida, popularmente, por babosa, aloe, aloe-de-barbados e aloe-de-curaçao (FREITAS, 2014). A *Aloe vera* pertence à família *Xanthorrhaceae* que inclui plantas terrestres, perenes ou anuais e herbáceas, possui cerca de 280 gêneros e 4.000 espécies (LACERDA, 2016).

O gênero *Aloe* que apresenta mais de 400 espécies diferentes e catalogadas, no entanto, poucas espécies são consideradas seguras para o uso em seres humanos. Não é o caso da *A. vera*, uma espécie muito estudada e utilizada pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (MARTINS, 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

A *A. vera* é uma planta que necessita de luz solar direta e de um solo bem drenado, porém, como é originária de regiões desérticas, ela consegue sobreviver bem em habitats hostis, onde poucas espécies vegetais conseguem (GUPTA, 2013).

Suas folhas são verdes, grossas, suculentas, com presença de dentes espinhosos nas margens e medem de 30 a 60 centímetros de comprimento, podendo

pesar até 2,3 kg. Suas flores são vistosas, apresentam tonalidade branco-amarelada, em formato tubular (LORENZI e MATOS, 2008). Além disso, as flores produzem frutos, estes que apresentam formato ovoide com cápsula triangular contendo sementes aladas (Figura 1).



**Figura 1.** Folhas e flores da Babosa (*Aloe vera*). Fonte: LACERDA, 2016

Contém em seu interior, uma polpa, um líquido claro e viscoso, denominado gel, o qual ocupa a maior parte do volume de sua folha (ARO, 2012; SILVA et al., 2013). O gel é parte mais usada e estudada, devido a sua complexa composição química (LÓPEZ et al., 2016) (Figura 2). Apresenta alto teor de água (99,0 a 99,5%) e uma diversidade de metabólitos primários e secundários, como apresentado no quadro 1 e 2, logo abaixo (RADHA e LAXMIPRIYA, 2015; SANIASIAYA et al., 2017).



**Figura 2.** Gel da Babosa (*Aloe vera*). Fonte: LUZ, 2016

**Quadro 1.** Metabólitos primários encontrados no gel de *A. vera*.

<b>Metabólitos Primários</b>	<b>Ações terapêuticas</b>	<b>Referências</b>
Carboidratos:		
Manose - Monossacarídeo	Anti-inflamatória e cicatrizante	(FREITAS, RODRIGUES e GASPI, 2014)
Mananas acetiladas ("Acemannan") - Polissacarídeo	Anti-inflamatória, cicatrizante, antineoplásica, anti-hiperglicêmico, anti-hipercolesterolêmico e antimicrobiana	(COCK, 2008; HUSEINI <i>et al.</i> , 2011; RODRIGUES e GASPI, 2014)
GAPS-1 - Polissacarídeo	Antioxidante	(CHUN-HUI <i>et al.</i> , 2007)
Vitaminas: A e E	Antioxidante	(RODRÍGUEZ, MARTÍN E ROMERO, 2010)
Ácido orgânico:		
Ácido málico	Antimicrobiana	(FLORES-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2016)
Componentes Nitrogenados:		
Lectina – Proteína	Hemaglutinante	(WINTERS, 1993)
Nova proteína de 14 kDa	Antifúngica, anti-inflamatória	(DAS <i>et al.</i> , 2011; RADHA e LAXMIPRIYA, 2015)
Pg21-2b – Glicoproteína	Estimula a proliferação de células renais humanas	(YAGI <i>et al.</i> , 1997)
G1G1M1D12 - Glicoproteína	Estimula a proliferação de queratinócitos no processo de cicatrização	(CHOI <i>et al.</i> , 2001)

**Quadro 2.** Metabólitos secundários encontrados no gel de *A. vera*.

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Ações terapêuticas</b>	<b>Referências</b>
Fitoesteróis:		
Lofenol 24-metil-lofenol 24-etil-lofenol cicloartanol 24-metileno-clartanol	Anti-hiperglicêmico e Anti-hipercolesterolêmico	(FREITAS, RODRIGUES e GASPI, 2014; RADHA e LAXMIPRIYA, 2015)
Antraquinonas:		
Aloína	Antifúngica Quimiopreventiva (Anticâncer)	(HAMIZA <i>et al.</i> , 2014; FLORES-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2016)

**Continuação do quadro 2.** Metabólitos secundários encontrados no gel de *A. vera*.

Metabólitos Primários	Ações terapêuticas	Referências
Antraquinonas: Aloe-emodina	Inibe a proliferação de células do cólon do útero e angiogênese, Purgativa, Antiviral	( SUBOJ et al., 2012; LI et al., 2014;)

## 2.2 Infecções fúngicas: *Candida albicans*

As infecções fúngicas apresentam uma incidência e prevalência em situação crescente desde a década de 1980, mais precisamente, na população de pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados com doenças subjacentes graves (SARDI et al., 2009). Além das situações citadas, outro fator de risco que está relacionado com a obtenção dessas infecções é a alteração das barreiras anatômicas facilitando a entrada de microrganismos no hospedeiro (CARDOSO, 2013) .

Vale ressaltar que isso ocorre, pois certos fungos são constituintes presentes da microbiota da pele e mucosa do ser humano, desde o nascimento. No entanto quaisquer alterações na homeostase do organismo, como mudanças orgânicas, físico-químicas, fisiológicas ou patológicas tanto da pele como nas mucosas, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo (HARTMANN et al., 2016).

Estas infecções causadas por espécies do gênero *Candida* representam a principal causa de infecções fúngicas oportunistas em todo o mundo, levando a morbidade e mortalidade (PFALLER e DIEKEMA, 2007) . Atualmente, o gênero *Candida* é composto por, aproximadamente, 200 espécies diferentes que colonizam diversos locais do corpo humano, tais como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (HARTMANN et al., 2016). Desse gênero destacam-se as espécies *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, (MACÊDO et al., 2009)

No que diz respeito a *C. albicans*, trata-se de um fungo considerado trimófico, pois pode apresentar-se como leveduras ovais, como hifas septadas contínuas, ou como pseudo-hifas, e todas essas três formas morfológicas são geralmente observadas em tecidos infectados (SARDI et al., 2009).

A colonização e o processo infeccioso por *C. albicans* inicia-se com a aderência da levedura nas células epiteliais, da pele ou mucosas, seguida da multiplicação da levedura, com formação posterior de tubo germinativo e filamentação (MAGDALENA, 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Para que o processo infeccioso tenha êxito, a *C. albicans*, assim como outros patógenos, expressam uma série de estratégias específicas para se estabelecer, colonizar, causar a doença e superar as defesas de hospedeiros susceptíveis, chamados de fatores de virulência (NAGLIK et al., 2003). Esses são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições, tais como diferente teor nutricional, níveis de oxigênio e temperatura (TAMURA et al., 2007).

No que concerne à sua forma filamentosa, hifas, a sua formação está relacionada com o aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial (conjunto de hifas) que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune (RIBEIRO, 2008; GERALDINO et al., 2012; SANTANA et al., 2013).

Devido à estabilidade na aderência do fungo aos tecidos são formados biofilmes (KHAN et al., 2010). O biofilme é uma comunidade estruturada de células de microrganismos, embebida em uma matriz extracelular polimérica e aderente a uma superfície inerte ou viva formando uma estrutura tridimensional (DONLAN; COSTERTON, 2002; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). As maiores vantagens dos microrganismos de se organizarem nestas comunidades consistem na maior capacidade de captação de nutrientes, no favorecimento de um crescimento mais ordenado e na maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e a antifúngicos (SUZUKI, 2009).

Outros fatores de virulência inerentes a esse fungo são as enzimas hidrolíticas, tais como lipases que catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de triacilgliceróis com o objetivo de digerir os lipídios para aquisição de nutrientes, além de auxiliar também na adesão às células e tecidos hospedeiros (GÁCSEK et al., 2007).

Uma classe específica de lipases, como as fosfolipases atuam pela hidrólise dos fosfolipídeos, dando origem aos lisofosfolipídeos que causam danos à célula epitelial do hospedeiro, facilitando a aderência e a penetração nos tecidos (OLIVEIRA et al., 1998; ABRÃO et al., 2011).

As proteases, também enzimas hidrolíticas, excretadas por diversos microrganismos, são capazes de degradar vários substratos, tais como: queratina colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular e, por isso, assim como os outros fatores de virulência, causam muitos danos aos tecidos do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 1998).

## 2.3 MEDICAMENTOS ANTIFÚNGICOS E NOVAS ALTERNATIVAS

Hoje em dia têm-se disponíveis no comércio cinco classes de antifúngicos, sendo eles, os polienos, análogos da pirimidina, azóis, equinocandinas e alilaminas, cada classe possui um mecanismo de ação diferente (OLIVEIRA, 2008).

Com base em seus alvos para terapia antifúngica, os agentes antifúngicos podem ser classificados nos seguintes grupos: inibidores da biossíntese de ergosterol; disruptores da membrana fúngica; síntese de parede celular fúngica; biossíntese de esfingolipídios; inibidores da síntese de ácidos nucleicos; inibidores da biossíntese de proteínas e inibidores da biossíntese de microtúbulos, como descritos, resumidamente, no quadro 3 (CAMPOY e ADRIO, 2017).

**Quadro 3.** Classificação dos antifúngicos com base em seus alvos terapêuticos

Grupo	Exemplos	Mecanismo de ação	Referência
Inibidores da biossíntese do ergosterol  Azóis	Imidazóis: - Clotrimazol - Cetoconazol - Miconazol  Triazóis: - Itraconazol - Fluconazol	Inibem a enzima dependente do citocromo P450, 14 $\alpha$ -lanosterol demetilase (CYP51) que converte o lanosterol em ergosterol na membrana celular inibindo o crescimento fúngico e replicação	(SHEEHAN et al., 1999)
Disruptores da membrana fúngica  Polienos	- Nistatina - Anfotericina B - Natamicina	Ligam-se à bicamada lipídica e formam um complexo com poros que promovem a ruptura da membrana celular e o vazamento do conteúdo citoplasmático.	(ANDRUSHAÏTE et al., 1979)

**Continuação do quadro 3.** Classificação dos antifúngicos com base em seus alvos terapêuticos.

<b>Grupos</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Referências</b>
Inibidores da síntese de ácidos nucleicos:	- Flucitosina	Age inibindo a síntese de proteínas, através de várias transformações metabólicas, acaba sendo incorporados ao RNA dos fungos. Inibe a timidilato sintase, que inibe a síntese de DNA fúngico e divisão nuclear	(DOWELL et al., 2004)
Inibidores da biossíntese de proteínas:	- Tavaborole	Inibe a aminoacil-tRNA sintetase de modo que este não pode completar a transferência de aminoácidos para o ribossomo para montagem e a síntese de proteínas é efetivamente bloqueada	(ROCK et al., 2007)
Inibidores da biossíntese de microtúbulos:	- Griseofulvina	Este composto liga-se à tubulina, interferindo na montagem dos microtúbulos fúngicos e inibição de mitose	(GAUWERKY et al., 2009)
Síntese de parede celular fúngica  Inibidores síntese de $\beta$ -glucana	- Caspofungina - Micafungina - Anidulafungina	Inibidores não competitivos da $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase, complexo enzimático, que leva ao rompimento da estrutura das paredes celulares em crescimento, instabilidade osmótica e morte de células fúngicas	(ESCHENAUER et al., 2007)
Síntese de parede celular fúngica  Inibidores da síntese de quitina	- Nikkomicina	Inibem a síntese da quitina através da inibição enzimática das sintases, fator importante para manter a integridade da célula	(AKINS, 2005)
Biossíntese de esfingolípídios	- Aureobasidina A	Inibem enzimas envolvidas na biossíntese de esfingolípídios	(TAKESAKO et al., 1991)

Os agentes antifúngicos apresentam o uso clínico limitado devido a sua toxicidade (principalmente, no caso de polienos e anfotericina B) e o surgimento de resistência (aos azóis e recentemente também observada para as equinocandinas) que contribuem para as altas taxas de morbidade e mortalidade (KIRKPATRICK et al., 2009).

As limitações desses medicamentos estabelecem a necessidade de desenvolver novos agentes antifúngicos, particularmente, com mecanismos de ação inovadores. Um dos artifícios que está se destacando com o propósito de contornar essas limitações é o uso de inibidores de fatores de virulência do patógeno, uma vez que estes fatores causam vários danos ao hospedeiro, aumentando o poder de infecção destes microrganismos (PIERCE e LOPEZ-RIBOT, 2013; ROMO et al., 2017).

Esta abordagem pode ser, particularmente, interessante para infecções fúngicas. Já que os fungos são eucarióticos e, desse modo, têm um número reduzido de alvos específicos para patógenos que podem ser explorados para a descoberta de drogas antifúngicas (ROMO et al., 2017).

Um exemplo de linha de pesquisa é o estudo de proteínas, visto que alguns peptídeos são considerados novas alternativas para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos (AMP –“antimicrobial peptides or proteins”) (RUAS, 2010). Isso pôde ser observado pelo estudo de Das e colaboradores (2011), no qual descobriu-se uma proteína (14 kDa) que possui uma potente ação antifúngica.

Essa proteína foi considerada um novo achado, visto que após a realização de comparações com proteínas antifúngicas existentes usando a base de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) não foi encontrada nenhuma outra similar. A lectina é a proteína que apresenta maior semelhança, no entanto ainda é pequena, apenas na sua sequência de aminoácidos N-terminal (DAS et al., 2011).

## **2.4 Técnicas de purificação de proteínas**

O processo de purificação de proteínas é considerado uma etapa bastante complexa tendo em vista que envolve tanto a separação do produto de interesse como também dos resíduos gerados (SANTOS, 2018).

Um ponto importante para que o processo de purificação de proteínas seja realizado com êxito é a escolha correta do método a ser utilizado para tal purificação, visando não aumentar os custos do processo. Além disso, a escolha correta do método conferirá a diminuição de perdas e até mesmo o aumento do rendimento (CAETANO, 2018).

Dentre as técnicas existe partição líquido-líquido trifásica sendo uma técnica simples e eficiente para a separação e enriquecimento de compostos proteicos, como enzimas de misturas complexas. Envolve a adição de sal (geralmente sulfato de amônio) ao extrato bruto, seguido pela adição de um solvente orgânico (geralmente t-butanol). A mistura de água / butanol se separa em dois líquidos imiscíveis na presença de uma certa quantidade de sulfato de amônio (OZER et al., 2010).

O t-butanol é normalmente miscível em água, mas com a adição de sal, como sulfato de amônio, a solução separa-se em duas fases, uma fase aquosa inferior e uma t-butanol superior. Se a proteína estiver presente na fase aquosa original, para que seja separada e formada uma terceira fase dependerá da concentração de sulfato de amônio que será adicionado. Isso pode ser explicado pelo fenômeno conhecido como "salting-out", onde a haverá menos água para solubilizar a proteína e esta acaba precipitando (RACHANA e LYJU, 2014).

A partição líquido-líquido trifásica apresenta inúmeras vantagens, dentre elas a rapidez e simplicidade do processo, além disso é um processo considerado de baixo custo em comparação com os processos de purificação convencional (Ozer et al., 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

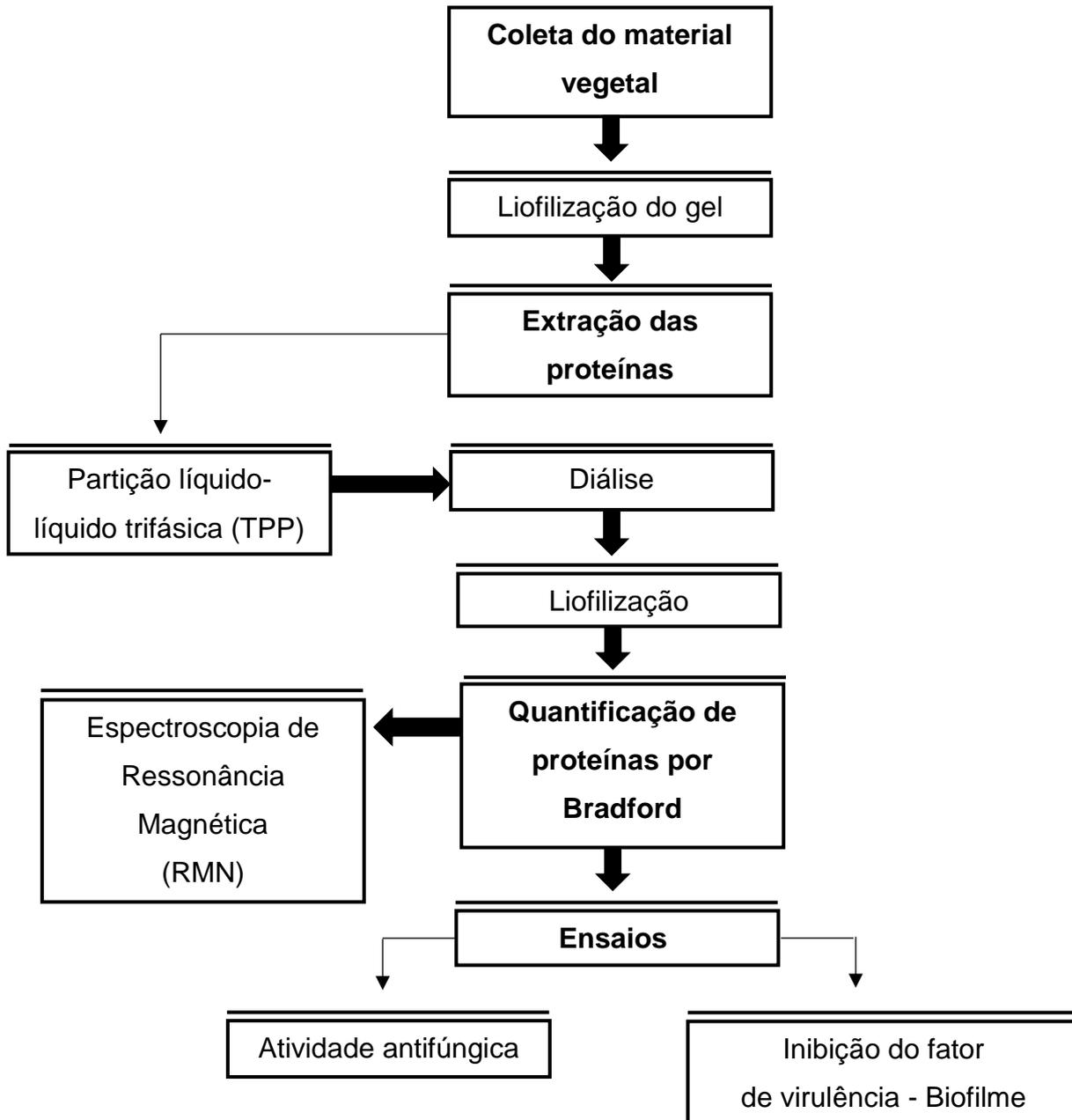
Realizar a extração de proteínas do gel das folhas de *Aloe vera* e avaliar sua ação antifúngica bem como a inibição da formação biofilme de *Candida albicans*.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Liofilizar o gel das folhas de *Aloe vera*;
- ✓ Realizar a extração das proteínas do gel das folhas de *A. vera* utilizando partição líquido-líquido trifásica;
- ✓ Realizar o fracionamento do extrato proteico por diálise;
- ✓ Realizar a quantificação das proteínas presentes nas frações;
- ✓ Submeter as frações à espectroscopia de ressonância magnética (RMN);
- ✓ Avaliar atividade antifúngica e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das frações proteicas;
- ✓ Realizar o ensaio de inibição de formação de biofilme de *Candida albicans*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O processo resumido de obtenção das frações proteicas, caracterização das proteínas e realização dos ensaios de atividade antifúngica e de inibição dos fatores de virulência está esquematizado na Figura 1.



**Figura 3.** Esquema geral de obtenção, caracterização e avaliação da atividade biológica.

### 3.1 Coleta e obtenção do gel das folhas de *Aloe vera*

A coleta das folhas da *Aloe vera* foi feita na Fazenda da Esperança, localizada no município de Lagarto/SE. A coleta do material botânico foi realizada de acordo com as técnicas usuais de Mori e colaboradores (1985) e posteriormente identificado no Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe, com auxílio de bibliografia especializada.

As folhas utilizadas para a retirada do gel foram colhidas de espécimes com 4 a 5 anos de idade, visto que é o tempo necessário para alcançarem a maturidade (Figura 2) (FREITAS, 2014). Além disso, a coleta foi realizada no verão, pois é a estação do ano mais adequada para coleta da planta, por apresentar as maiores concentrações dos metabólitos, dentre eles as proteínas (ZAPATA et al., 2013).

Ao serem colhidas, as folhas foram lavadas e mantidas sob refrigeração até a retirada do gel. Para evitar a decomposição e o dano da atividade natural do gel, o processo de filetagem/retirada do gel foi concluído dentro de 36 h da colheita das folhas (JAVED e ATTA-UR, 2014).

Em seguida o gel interno na *A. vera* foi triturado no liquidificador e posteriormente filtrado com pano estéril.



**Figura 4.** *Aloe vera* no local da coleta. (Fonte: Próprio autor).

### 3.2 Liofilização do gel

O processo de liofilização foi realizado em três etapas. A primeira etapa consistiu no congelamento da amostra por um período mínimo de 24 horas, em frascos de vidro. Na segunda etapa, os frascos de vidro foram levados para o liofilizador (Liotop® L101) (Figura 3) para que a água congelada presente no material vegetal fosse retirada através do processo de sublimação. Na terceira etapa a água residual presente na amostra, denominada água adsorvida, foi convertida a vapor e assim eliminada da amostra. O período de liofilização do material durou 7 dias (Adaptado de SILVA et al., 2012).



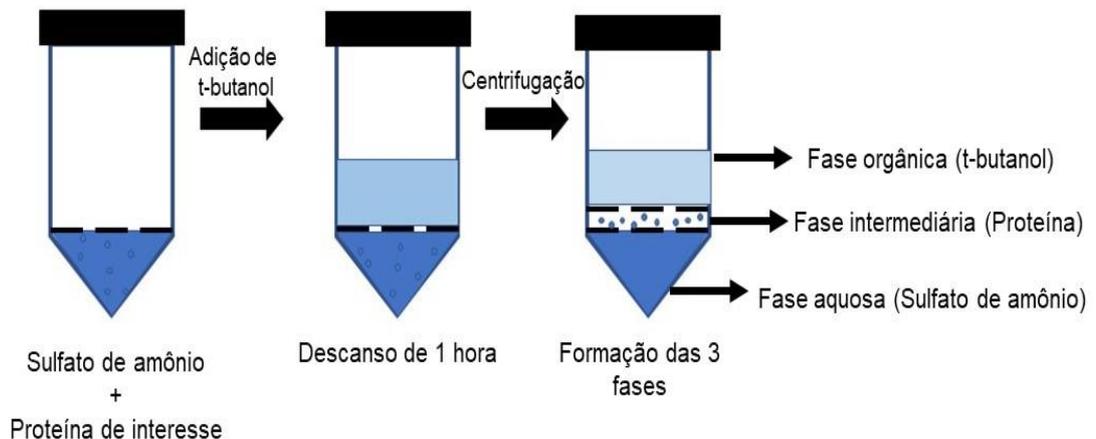
Figura 5. . Liofilizador Liotop® L101 com as amostras (Fonte: Próprio autor).

### 3.3 Partição líquido-líquido trifásica (“Three-Phase Partitioning for Protein Purification”, TPP)

A partição líquido-líquido trifásica (TPP) é um método relativamente novo, rápido e eficaz para a purificação de proteínas (WARD, 2009). Neste tipo de partição líquido-líquido utiliza-se *t*-butanol e sulfato de amônio para favorecer a precipitação das proteínas de soluções aquosas e sua separação. A TPP foi realizada em 5 etapas.

1. Solubilização da amostra liofilizada (100 mg) em 5 mL de tampão tris-hidroximetilaminometano (TRIS, 50 mM, pH 8,0) utilizando ultra-agitação em Sistema de Dispersão Ultra-Turrax® Tube Drive, por 5 minutos;
2. Adição de 2,5 mL de sulfato de amônio (1,6 M) e homogeneização por 60 segundos;
3. Adição de 5 mL de *t*-butanol, seguida de agitação por 3 minutos;
4. Transferência da mistura para tubos de propileno de 25 mL, agitação em vortex durante 1 minuto;
5. Manutenção da mistura em repouso por 1 hora e finalmente centrifugação à 4000 xG por 5 minutos para forçar a separação de fases;

Na fase superior estava presente o *t*-butanol; na fase inferior, a solução de sulfato de amônio e na fase intermediária, as proteínas precipitadas (Figura 4) (Adaptado de WARD, 2009).

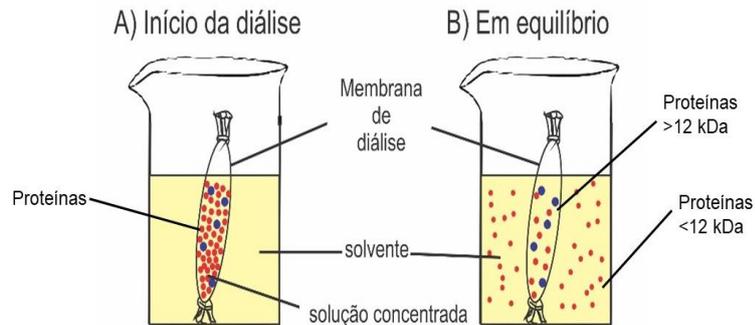


**Figura 6.** Representação ilustrativa do procedimento de partição líquido-líquido trifásica (TPP). (Fonte: Adaptado de RACHANA, 2014.)

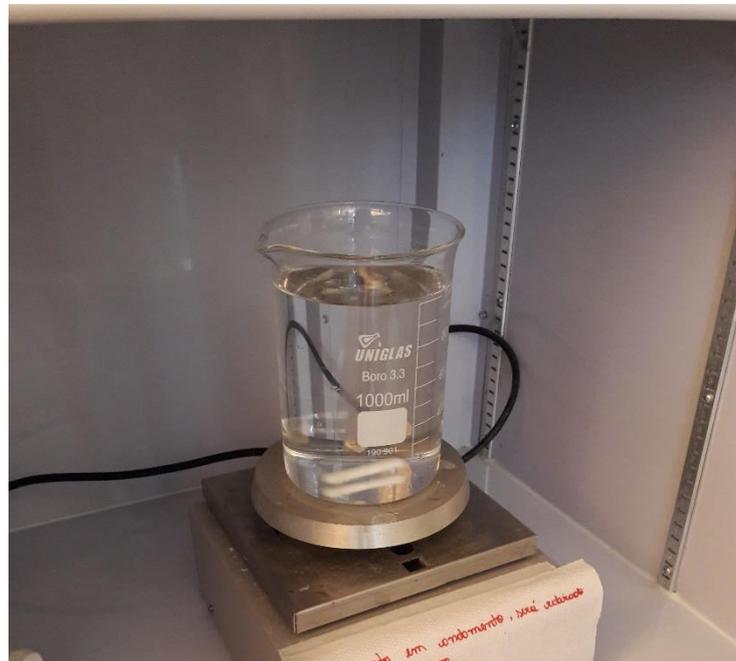
### 3.4 Diálise

A fração proteica obtida do gel de *A. vera* após a TPP foi dissolvida em tampão TRIS (50 mM, pH 8,0) e em seguida transferida para um tubo de diálise de celulose (Sigma Aldrich®) com retenção de proteínas de massa molecular acima de 12 kDa. Vale ressaltar que de acordo com as especificações do fabricante a membrana utilizada tem a capacidade para suportar 110 mL/ ft, (ft= 30.48 cm), assim foi usada uma membrana de dimensão de 16 cm, preenchidas com 50 mL de fração proteica e

tampão nas proporções de 1:10. A membrana preenchida com a solução proteica foi imersa em solução no mesmo tampão e mantida por um período de 24 h, sob agitação magnética a 4 ° C (Figura 5 e 6) (Adaptado de DAS et al., 2011; SAGU et al., 2015).



**Figura 7.** Ilustração do sistema de diálise. Início (A) e final do processo de difusão das proteínas (B). (Fonte: Adaptado de [http://www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/2012\\_Aula\\_3\\_Sayuri.pdf](http://www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/2012_Aula_3_Sayuri.pdf)).



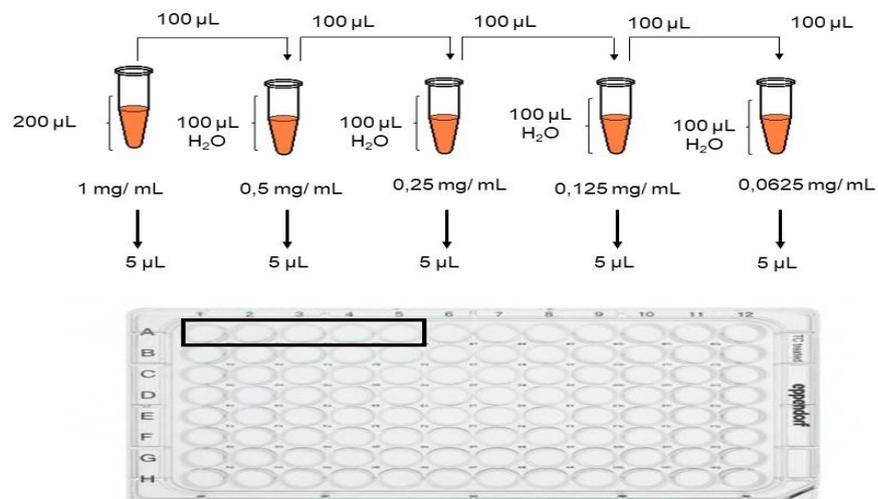
**Figura 8.** Sistema de diálise montado no refrigerador. (Fonte: próprio autor).

No final do processo, as frações internas (FI) e as frações externas (FE) foram coletadas, congeladas, liofilizadas e armazenadas para as caracterizações das proteínas extraídas e realização da atividade antifúngica e de inibição do fator de virulência - Biofilme.

### 3.5 Quantificação de proteína por Bradford

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de ligação de corantes usando albumina de soro bovino como proteína padrão. Esse método foi descrito por Bradford (1976), porém é muito utilizado visto que é um ensaio muito reprodutível e rápido. As proteínas ligam-se ao Coomassie azul brilhante G-250, esta ligação do corante à proteína provoca uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 a 595 nm, e é o aumento da absorção a 595 nm que é monitorado.

Para a quantificação das proteínas foi construída uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Foram preparados 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de BSA a 1 mg/mL e, a partir dessa solução foram realizadas as diluições seriadas em  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q) para a obtenção das demais concentrações (0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,0625 mg/mL) (Figura 7).



**Figura9.** Representação esquemática das diluições seriadas no preparo das soluções de BSA e placa de 96 poços com orifícios destacados onde foram colocadas as soluções.

Foram adicionados 5  $\mu$ L das soluções preparadas em orifícios diferentes na placa de 96 poços como demonstrado na Figura 5. Em cada orifício foram adicionados também 250  $\mu$ L do reagente Bradford. Para o branco foi utilizado 5  $\mu$ L da solução salina e 250  $\mu$ L do reagente Bradford. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm.

Para a dosagem das proteínas presentes nas frações, 1 g de amostra foi dissolvido em 1 mL de tampão fosfato salina (PBS), pH = 7,4. Já no próprio gel de *A. vera* foram utilizados 5  $\mu$ L, diretamente, sem adição de PBS. Em seguida, 5  $\mu$ L desta solução foram adicionados em triplicata aos poços da placa de 96 poços. Em seguida adicionou-se 250  $\mu$ L do reagente de Bradford, e manteve-se a mistura por 5 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz, considerando uma concentração final da amostra de *A. vera* de 20 mg/mL. A leitura das absorbâncias foi realizada a 595 nm utilizando o leitor de placas (Asys Expert plus).

A concentração das proteínas (mg/mL) foi determinada a partir da equação da reta obtida através da curva de calibração com BSA (1 mg/mL) (Adaptado de VALENTINI, 2016).

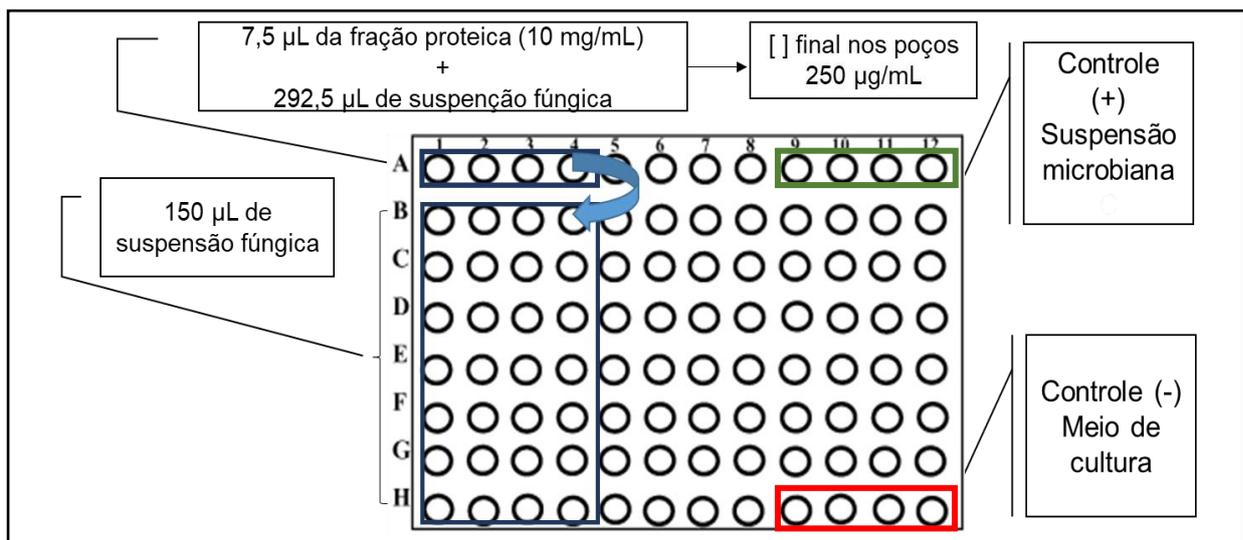
### **3.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN)**

As amostras foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo solubilizada em água deuterada ( $D_2O$ ). Os espectros de RMN  $^1H$  (400 MHz) foram obtidos com um espectrômetro Bruker Ascend 400. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados para RMN de  $^1H$  pelos picos característicos dos hidrogênios em relação ao tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades das bandas de RMN  $^1H$  foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete). As análises de RMN foram realizadas pela Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da UNIVASF (campus centro em Petrolina-PE).

### 3.7 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

De acordo com National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002) a cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) foi inoculada em tubos de ensaios contendo caldo Sabouraud, sem agitação, a 37 °C até atingirem crescimento correspondente à absorbância a 600 nm de 0,1 ( $\pm$  0,05). Em seguida foi realizada a diluição da cultura em caldo Sabouraud na proporção 1:100.

Foram utilizadas placas estéreis, contendo 96 poços dispostos em oito filas denominadas A-H, e 12 colunas numeradas de 1-12. Os poços A1 a A4 foram preenchidos com 7,5  $\mu$ L da fração proteica (10 mg/mL) previamente dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e 292,5  $\mu$ L de suspensão fúngica. A concentração da amostra no poço corresponderá a 250  $\mu$ g/mL. Nos demais poços das filas subsequentes (B-H) foram adicionados 150  $\mu$ L de suspensão fúngica. Logo em seguida foi realizada uma diluição seriada, iniciando da primeira fila, onde foi transferido 150  $\mu$ L da mistura para a fila seguinte, e sucessivamente repetindo o processo até a fila H. As concentrações do extrato variaram de 250  $\mu$ g/ mL até 0,97  $\mu$ g/ mL (Figura 8).



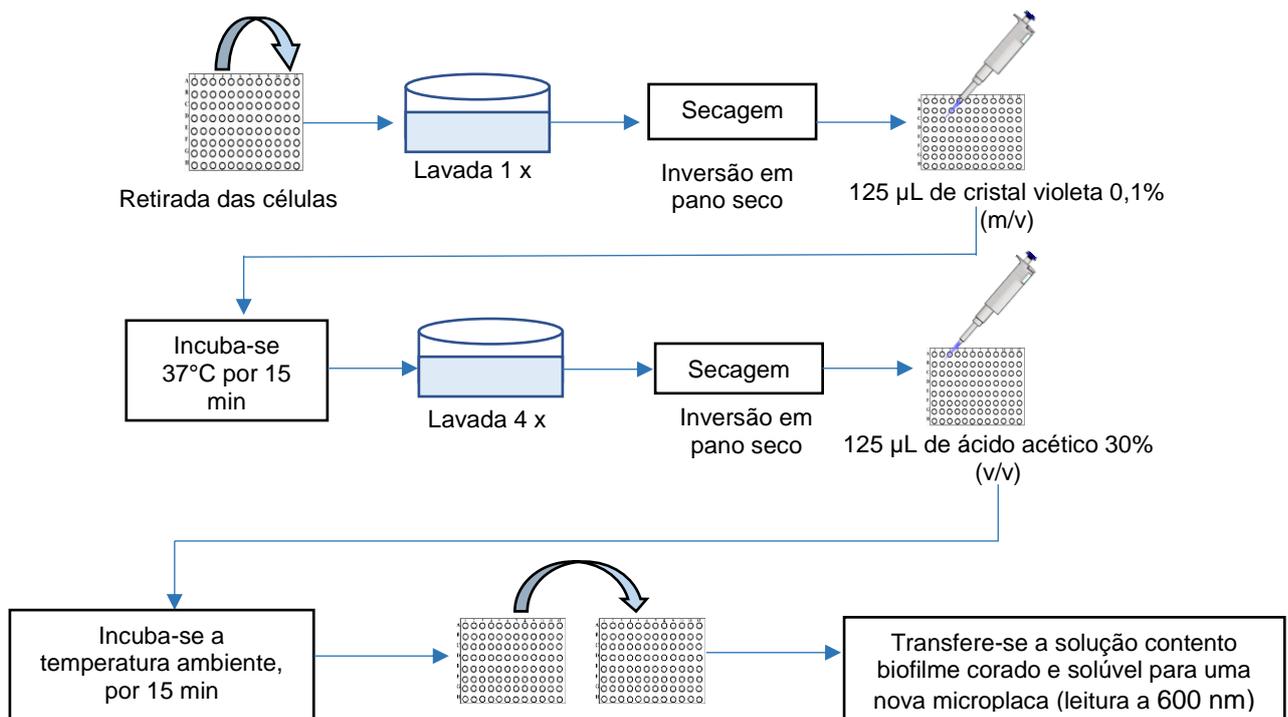
**Figura 10.** Representação ilustrativa do procedimento de diluição seriada em placa de 96 poços.

Foram inclusos no experimento controle positivo de crescimento (suspensão bacteriana) e o negativo (meio de cultura). A microplaca foi incubada a 37 °C por 24

horas. Em seguida realizou-se a leitura a 600 nm. A CIM foi considerada a menor concentração em que não houve crescimento microbiano.

### 3.7 Avaliação da inibição da formação de biofilme

Este procedimento foi realizado subsequentemente, ao ensaio de atividade antifúngica, utilizando a mesma placa, ou seja, após 24 h de incubação. As células não aderidas nos poços foram removidas por inversão da placa, seguida de lavagem através da submersão em água destilada e secagem por inversão em pano seco. Em seguida, adicionou-se 125  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,1% (m/v) de cristal violeta e incubou-se à 37°C por 15 min. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com água destilada e, em seguida, seca por inversão em pano seco. Posteriormente, procedeu-se a etapa de quantificação, na qual foram adicionados 125  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30% (v/v) em cada poço para solubilizar o biofilme corado com cristal violeta. Logo após, incubou-se a placa a temperatura ambiente, por 15 min. Na sequência, transferiu-se 125  $\mu\text{L}$  da solução contendo biofilme corado e solúvel para uma nova microplaca, e então realizada a leitura em espectrofotômetro ( $\lambda=600\text{ nm}$ ). A solução de ácido acético 30% (v/v) foi utilizada como branco (Figura 9) (Adaptado de STEPANOVIĆ et al., 2004).



**Figura 11.** Representação esquemática do procedimento de inibição do biofilme.

### **3.8 Análise estatística**

Os gráficos e os dados obtidos nos diversos experimentos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa Prisma versão 7.0 através de Análise de Variância (ANOVA). Como *post teste* foi aplicado o teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

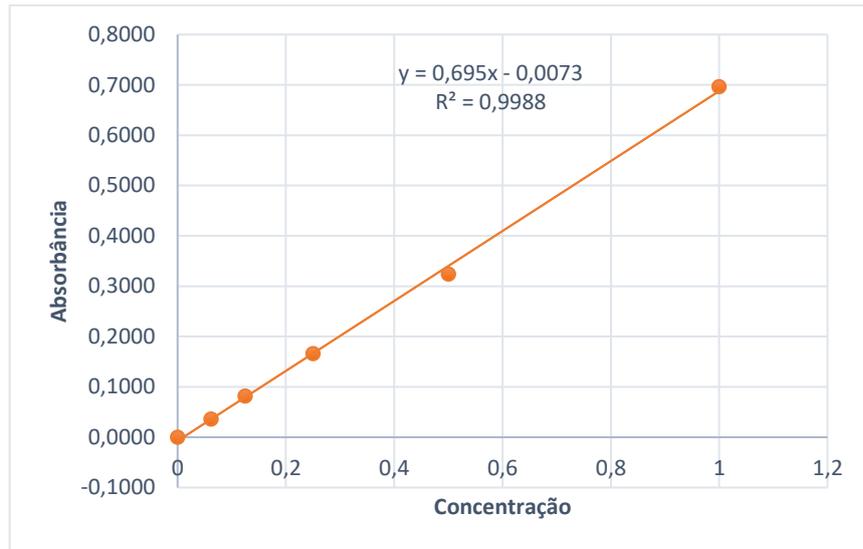
Os experimentos iniciaram a partir do gel de *A. vera* (250 g) que após a eliminação de água por liofilização obteve-se uma massa de 4,18 g, alcançando, então, um rendimento de 1,67%. Esta massa foi utilizada para o processo de obtenção das frações proteicas por TPP seguido de diálise.

### 4.1 Quantificação de proteínas por Bradford

Os dados obtidos após a realização da leitura das absorvâncias das soluções padrão de BSA (Tabela 1) em diversas concentrações foram utilizados para a construção da curva de calibração (Figura 10). A equação da reta obtida pela regressão linear foi utilizada para quantificar a proteína presente na FE, FI e no próprio gel de *Aloe vera* (Tabela 2).

**Tabela 1.** Concentrações de BSA e suas respectivas absorvâncias (595 nm)

Soluções de BSA (mg/mL)	Absorvância ( $\lambda$ )
0	0
0,062	0,0357
0,125	0,0817
0,25	0,1657
0,5	0,3237
1	0,6960



**Figura 12.** Curva de calibração construída utilizando BSA nas concentrações de 0; 0,062; 0,125; 0,250; 0,500 e 1 mg/mL. A absorbância foi determinada a 595 nm.

Pôde-se observar que as absorbâncias das amostras (FE, FI e do gel) analisadas (Tabela 2) estão abaixo do limite de quantificação da curva de calibração construída utilizando as absorbâncias de BSA (Tabela 1). Isso indica que a concentração de proteína é menor do que 0,062 mg/mL para as três amostras analisadas.

**Tabela 2.** Valores das absorbâncias (595 nm) das soluções de *A. vera* (1 g/mL)

Gel e Soluções de <i>A. vera</i> 1 g/mL (FI e FE)	
Amostras	Absorbâncias ( $\lambda$ )
Gel	- 0,011
FI	- 0,021
FE	- 0,019

Segundo Zaia e colaboradores (1998) existem vários métodos utilizados para a quantificação de proteínas são eles: biureto, Lowry, Bradford, Smith e leitura direta de proteínas utilizando ultravioleta.

O método Bradford baseia-se na interação entre o corante Coomassie brilliant blue (BG-250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON & JONES, 1985).

Apesar de possuir várias vantagens, sendo elas uma metodologia considerada rápida, barata e específica para proteínas, inclusive para as que estão presentes em plantas. Vários fatores podem ter contribuído para a impossibilidade desta medida, como por exemplo a baixa sensibilidade desse método para com proteínas de baixa massa molecular (ZAIA et al., 1998). Como é o caso da FE que, teoricamente, era para encontrar proteínas abaixo de 12 kDa.

Isso ocorre por que estas proteínas sofrem variações em suas absorvidades e isso interfere na quantificação da mesma. Apesar de existir na literatura meios para tentar contornar essa limitação, aumentando a solubilização das proteínas que vão reagir com o corante, através do uso de detergentes, hidróxido de sódio ou aquecendo-a com ureia e 2-mercaptoetanol, estas são estratégias viáveis, apenas, para proteínas de alta massa molecular (GOGSTAD e KRUTNES, 1982).

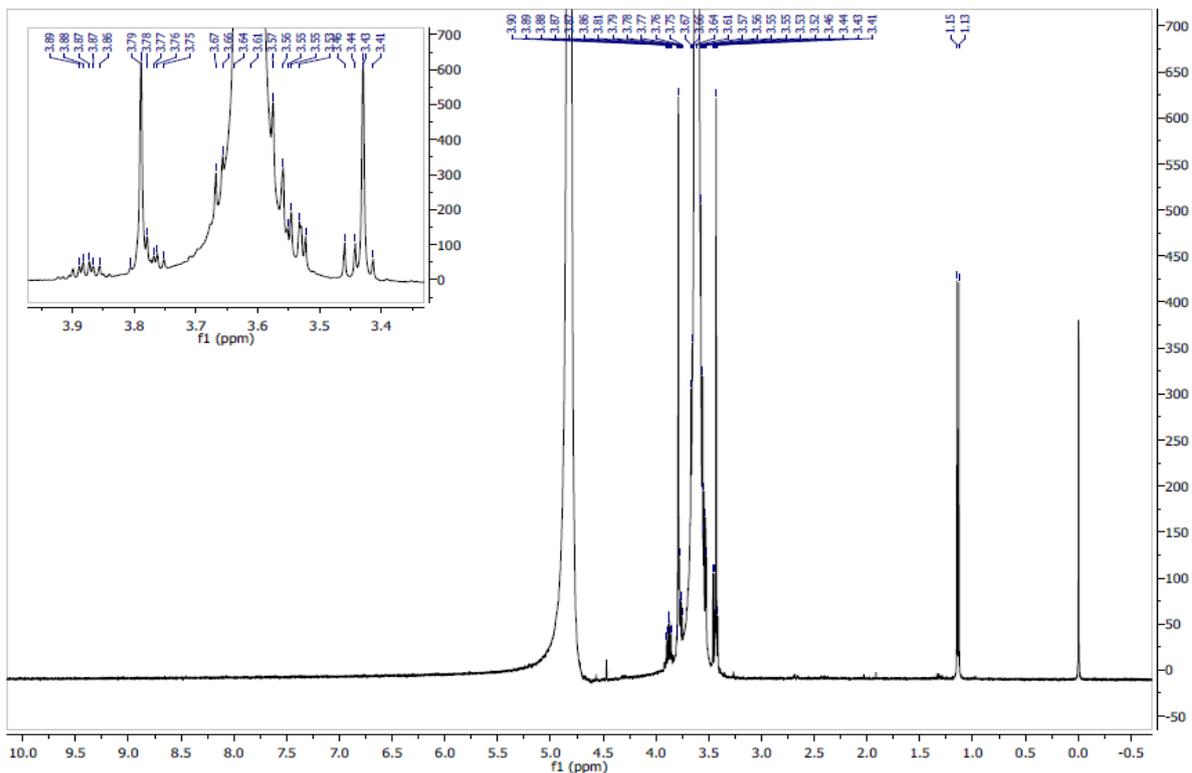
Outro fator que deve ter acontecido que gerou a incapacidade de medida de ambas frações, possivelmente, foram supostas interferências por meio de reações com metabólitos secundários que poderiam estar presentes nas amostras. Outras metodologias sofrem interferências ainda maiores. Um exemplo disso é o que ocorre com compostos fenólicos que causam grandes interferências na quantificação de proteínas pelo método de Lowry quando comparado com o de Bradford (RANDALL e LEWIS, 1951).

Além dos já citados, a presença de cloreto de sódio no tampão PBS utilizado também pôde ter influenciado no resultado, pois este composto tem característica de gerar um resultado falso negativo (PANDE e MURTHY, 1994).

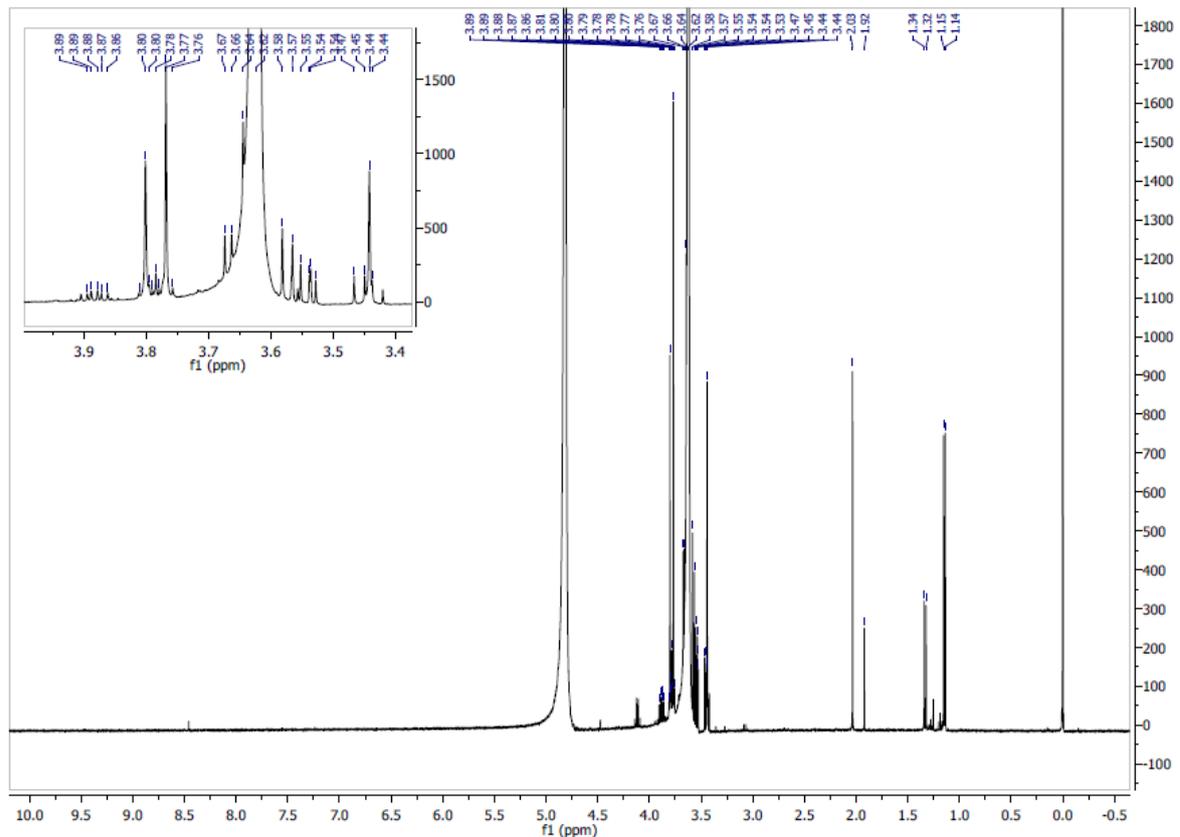
Ainda que exista disponível na literatura vários métodos de quantificação de proteínas, é necessário avaliar se é compatível com a amostra, seus interferentes, custo e reprodutibilidade.

## 4.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Pode-se observar nas Figuras 11 e 12 os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das frações obtidas após a diálise do extrato do gel de *A. vera*. O singlete largo em 4,8 ppm é referente a água residual presente no solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ), enquanto que o singlete largo em 3,61 ppm é referente aos hidrogênios da molécula de tris-hidroximetilaminometano (TRIS) presente no tampão utilizado no processo de extração das proteínas. O dubleto (1,14 ppm,  $J = 4$  Hz) presente em ambos os espectros é característico de hidrogênios metílicos de metil-pentoses (açúcar), como há na ramnose por exemplo; ao mesmo tempo em que os multipletos presentes nos espectros, na região de 3,4 a 3,9 ppm, são indicativos da presença de açúcar nas amostras (LI et al, 2018). Vale destacar também a ausência de sinal de hidrogênio anomérico, indicando que o açúcar presente nas amostras não possui hidrogênio anomérico (LEHNINGER, 2014). Portanto, estes sinais sugerem da presença de açúcar com estas características nas frações obtidas do gel de *A. vera*.



**Figura 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) da fração externa do gel de *Aloe vera* (AV-FE) e ampliação da região 3,4-4,0 ppm



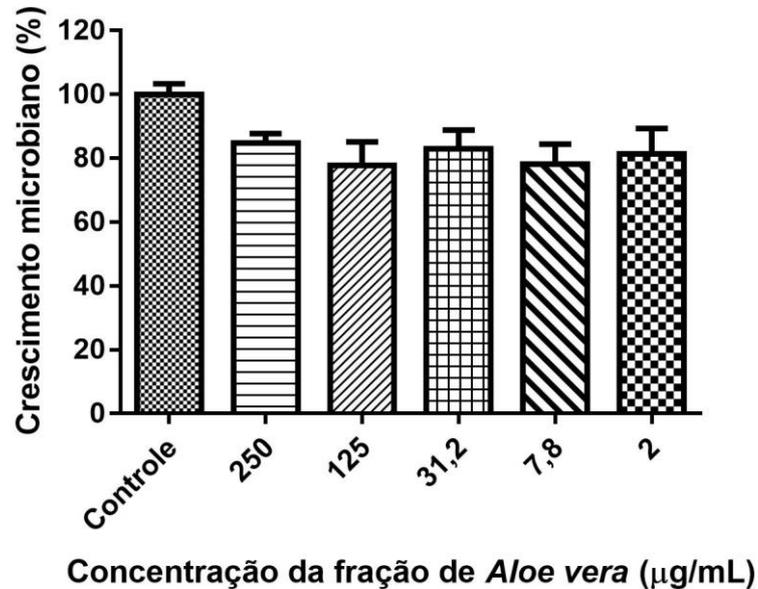
**Figura 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) da fração interna do gel de *Aloe vera* (AV-FI) e ampliação da região 3,4-4,0 ppm.

Diante do exposto, uma explicação plausível para isso é justamente a capacidade que diversos sais, dentre eles o sulfato de amônio, possuem de causar a precipitação de certos compostos, não somente de proteínas, mas como também de carboidratos (YOUNG, 1893). Ainda de acordo com o autor a precipitação depende do "poder de atração de água" ou "poder de captação de água" do sal usado, além do peso molecular do composto, tendo em vista que quanto maior o peso mais facilmente um composto é precipitado. Assim, os sais devem retirar os meios de solução do composto, que é então jogado para baixo, causando a precipitação.

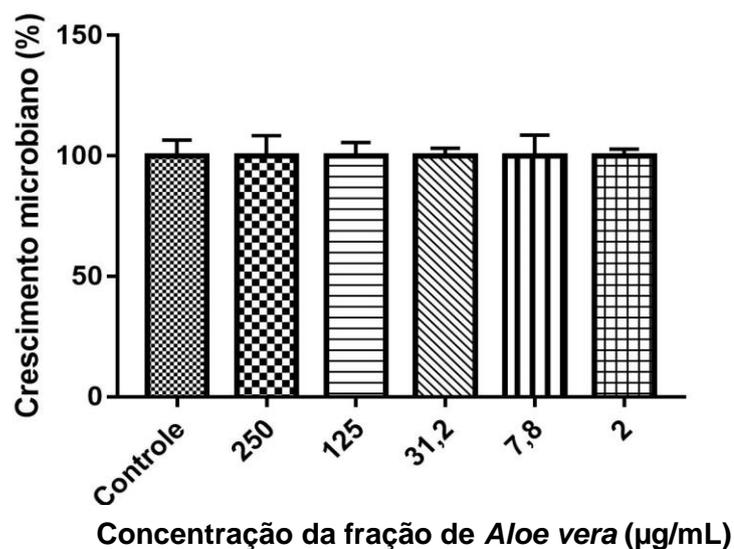
Uma vez que a estrutura química do(s) componente(s) presentes não foram completamente elucidados, análises mais detalhadas devem ser realizadas para que se identifique os componentes bioativos destas frações.

### 4.3 Atividade antifúngica e inibição da formação de biofilme

A avaliação da atividade antifúngica (Figuras 13 e 14) e da inibição da formação do biofilme (Figuras 15 e 16) foi realizada com ambas frações (FE e FI) obtidas do gel das folhas de *Aloe vera*.



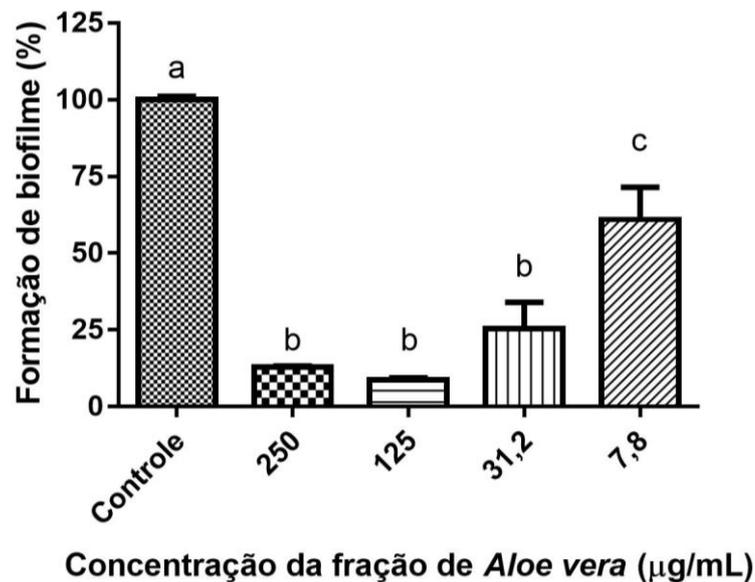
**Figura 15.** Efeito das diferentes concentrações da FE de *Aloe vera* sobre o crescimento da *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



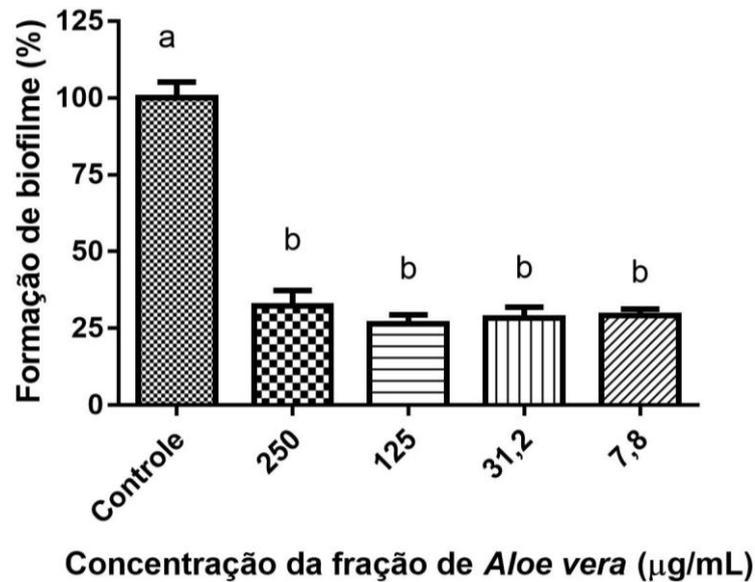
**Figura 16.** Efeito das diferentes concentrações da FI de *Aloe vera* sobre o crescimento da *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Após análise estatística dos dados (Análise de Variância – ANOVA) foi possível constatar que tanto a FE como a FI não apresentaram atividade antifúngica em nenhuma das concentrações. Se apenas a proteína 14 kDa presente no gel das folhas de *A. vera* for capaz de inibir o crescimento fúngico, como constatado por Das e colaboradores (2011) ( $IC_{50}=75,61 \mu M$ ), a ausência dessa atividade com a FE se explica pelo fato das proteínas com massa molecular acima de 12 kDa estarem presentes na fração interna à membrana de diálise (FI) e não da externa (FE).

Por outro lado, a FE e FI foram capazes de inibir a formação do biofilme de *C. albicans* (Figura 9). Todas as concentrações testadas apresentaram atividade de inibição da formação de biofilme, como pode ser observado nas Figuras 15 e 16. Sendo a inibição da formação de biofilme pouco mais de 70%.



**Figura 17.** Efeito das diferentes concentrações da FE de *Aloe vera* na formação de biofilme de *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam que há diferença estatística



**Figura 18.** Efeito das diferentes concentrações da FI de *Aloe vera* na formação de biofilme de *Candida albicans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam que há diferença estatística.

Vale ressaltar que para o processo infeccioso tenha êxito a *C. albicans* precisa de vários fatores de virulência, sendo o biofilme um dos principais deles. Visto que o mesmo viabiliza uma maior estabilidade na aderência do fungo aos tecidos (KHAN et al., 2010), e não apenas nos tecidos, mas também em dispositivos hospitalares. As células que aderem às superfícies bióticas e abióticas, desenvolvem uma camada de biofilme, seguida de formação de pseudo-hifas (KOJIC e DAROUICHE, 2004). Os biofilmes totalmente maduros têm uma mistura de formas morfológicas variando de levedura, hifas e pseudo-hifas na matriz extracelular. Tendo cada uma dessas formas seu papel importante no processo infeccioso (SARDI et al., 2009).

Essas comunidades de células conferem ameaça para os seres humanos, pois têm o potencial de iniciar ou prolongar infecções fornecendo um porto seguro a partir do qual as células podem invadir tecido local, semear novos locais de infecção e resistir à erradicação (KHAN et al., 2010).

Assim o resultado mostra-se muito relevante, pois a inibição da formação de biofilme da *C. albicans* pelo gel de *A. vera* é inédito, além da grande contribuição para a comunidade científica visto que os inibidores de fatores de virulência são uma nova

estratégia que está sendo muito discutida para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (PIERCE e RIBOT, 2013).

Tendo em vista que o direcionamento para essa linha de pesquisa apresenta muitas vantagens tais como: o aumento do número de alvos potenciais, que é de particular interesse para o desenvolvimento de novos antifúngicos; a preservação da microbiota do hospedeiro que é de importância crítica no caso de microrganismos comensais como *C. albicans* e a capacidade de exercer um efeito seletivo, sendo muito importante para a redução do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (CLATWORTHY, PIERSON e HUNG, 2007).

Dessa forma, é preciso mais estudos nessa área já que os inibidores dos fatores de virulência apresentam o potencial para serem usados tanto na monoterapia e terapia combinada (com antibióticos convencionais) quanto como agentes profiláticos (PIERCE e RIBOT, 2013).

## 5 CONCLUSÃO

Diante das técnicas utilizadas neste trabalho para o isolamento, purificação e detecção de proteínas, pode-se concluir que elas precisam ser otimizadas, uma vez que não foi possível detectar as proteínas nas frações obtidas, por não estarem presentes nas frações ou pelo fato da metodologia de quantificação não ter sido a mais apropriada para este caso. Com a análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi possível verificar a presença de açúcares com algumas características específicas, como a presença de um grupo metila e a ausência de hidrogênio anomérico na sua estrutura química. Como melhor dos resultados deste trabalho pode-se observar que as duas frações obtidas do gel de *A. vera* apresentaram ação anti-fúngica no que concerne a capacidade de inibir a formação de biofilme, um dos principais fatores de virulência de *C. albicans*. Este feito pode ser considerado inédito, tendo em vista que não há registros na literatura com relação a *A. vera*. Dessa maneira, estes resultados poderão contribuir, positivamente, no estudo da busca por novos medicamentos antifúngicos tanto na monoterapia quanto na terapia combinada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO et al. Estudo da presença de enzimas em *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* isoladas na saliva de profissionais da saúde. In: 63<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, Goiânia, 2011. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 285–318, 2005.

ANDRUSHAÏTE, R. E.; BAUMAN, V. K.; BERZIN', N. I. Biologicheskiĭ ekspress-metod otsenki D-vitaminnoĭ obespechennosti tyspliat. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 15, n. 4, p. 570–575, 1979.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico XLVII. 16 de novembro de 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2019.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CARDOSO, T. S. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA UNIVERSIDADE DE COIMBRA Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans*. 2013.

CHOI, S. W.; SON, B. W.; SON, Y. S.; PARK, Y. I.; LEE, S. K.; CHUNG, M. H. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 535–545, 2001.

CHUN-HUI, L.; CHANG-HAI, W.; ZHI-LIANG, X.; YI, W. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 961–970, 2007.

COCK, I. E. “Antimicrobial Activity of *Aloe barbadensis* Miller Leaf Gel Components”. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2008.

DAS, S.; MISHRA, B.; GILL, K.; ASHRAF, M. S.; SINGH, A. K.; SINHA, M.; SHARMA, S.; XESS, I.; DALAL, K.; SINGH, T. P.; DEY, S. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 38–43, 2011.

DOWELL, J. A.; KNEBEL, W.; LUDDEN, T.; STOGNIEW, M.; KRAUSE, D.; HENKEL, T. Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 590–598, 2004.

ESCHENAUER, G.; DEPESTEL, D. D.; CARVER, P. L. Comparison of echinocandin antifungals. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, p. 71–97, 2007.

FLORES-LÓPEZ, M. L.; ROMANÍ, A.; CERQUEIRA, M. A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, R.; JASSO DE RODRÍGUEZ, D.; VICENTE, A. A. Compositional features and bioactive properties of whole fraction from Aloe vera processing. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 179–185, 2016.

FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 299–307, 2014.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3–4, p. 214–222, 2009.

GOGSTAD, G. O.; KRUTNES, M.-B. Measurement of protein in cell suspensions using the Coomassie brilliant blue dye-binding assay. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 355–359, 1982.

GOWRISHANKAR, S.; DUNCUN MOSIOMA, N.; KARUTHA PANDIAN, S. Coral-associated bacteria as a promising antibiofilm agent against methicillin-resistant and -susceptible staphylococcus aureus biofilms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

HAMIZA, O. O.; REHMAN, M. U.; KHAN, R.; TAHIR, M.; KHAN, A. Q.; LATEEF, A.; SULTANA, S. Chemopreventive effects of aloin against 1,2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the colon of Wistar rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 148–163, 2014.

HARTMANN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M. P.; ALVES, I. A. INCIDÊNCIA DE Candida spp. NA MUCOSA ORAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) NO MUNICÍPIO DE SANTO ÂNGELO-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125–130, 2016.

HUSEINI, H.; KIANBAKHT, S.; HAJIAGHAEI, R.; DABAGHIAN, F. Anti-hyperglycemic and Anti-hypercholesterolemic Effects of Aloe vera Leaf Gel in Hyperlipidemic Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. **Planta Med**, v. 78, p. 311–316, 2011.

JAVED, S.; ATTA-UR, R. **Aloe vera gel in food, health products, and cosmetics industry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 41

LACERDA, G. Composição química, fitoquímica e dosagem de metais pesados das cascas das folhas secas e do gel liofilizado de *Aloe vera* cultivadas em hortas comunitárias da cidade de Palmas, Tocantins. **Revista de plantas mediciniais**, v. 3, p. 15- 20, 2016.

NELSON, David L; COX, Michael M; LEHNINGER, Albert L. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. xxx, 1298 p.

LI, S. W.; YANG, T. C.; LAI, C. C.; HUANG, S. H.; LIAO, J. M.; WAN, L.; LIN, Y. J.; LIN, C. W. Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3 up-regulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 738, p. 125–132, 2014.

LI, P.; WEN, S.; SUN, K.; ZHAO, Y.; CHEN, Y. Structure and Bioactivity Screening of a Low Molecular Weight Ulvan from the Green Alga *Ulothrix flacca*. **Marine drugs**, v. 16, p. 281, 2018.

MACÊDO, D. P. C.; FARIAS, A. M. D. A.; NETO, R. G. D. L.; SILVA, V. K. A. DA; LEAL, A. F. G.; NEVES, R. P. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 188–191, 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 1, p. 21–26, 2015.

RANDALL, R. J.; LEWIS, A. The folin by oliver. **Readings**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

ROCK, F. L. *et al.* An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1759–1761, 2007.

RODRÍGUEZ, E. R.; MARTÍN, J. D.; ROMERO, C. D. Aloe vera as a Functional Ingredient in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 305–326, 2010.

SAGU, S. T.; NSO, E. J.; HOMANN, T.; KAPSEU, C.; RAWEL, H. M. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning. **Food Chemistry**, v. 183, p. 144–153, 2015.

SANDRO R. VALENTINI. PROTOCOLO: Quantificação de proteína - método bradford 1. p. 3–4, [s.d.].

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. spp. and new therapeutic options The incidence of fungal infections has increased significantly, so contributing to morbidity and mortality. This is caused by an increase in antimicrobial resistance and the restricted number of antifungal drugs, which ret. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1–32, 2009.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40–79, 1999.

STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RANIN, L.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004.

SUBOJ, P.; BABYKUTTY, S.; VALIYAPARAMBIL GOPI, D. R.; NAIR, R. S.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- $\kappa$ B. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 581–591, 2012.

TAKESAKO, K.; IKAI, K.; HARUNA, F.; ENDO, M.; SHIMANAKA, K.; SONO, E.; NAKAMURA, T.; KATO, I.; YAMAGUCHI, H. Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties. **The Journal of antibiotics**, v. 44, n. 9, p. 919–24, 1991.

WARD, W. W. Three-phase partitioning for protein purification. **Innovations in Pharmaceutical Technology**, n. 28, p. 28–34, 2009.

WINTERS, W. D. Immunoreactive Lectins in Leaf Gel from *Aloe barbadensis* Miller. v. 7, n. September 1992, p. 23–25, 1993.

YAGI, A.; ARASE, M.; MIYO, T.; TSUJI, H. with a Proliferation-Promoting Activity on Human and Hamster Cells. v. 63, p. 18–21, 1997.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZAPATA, P. J.; NAVARRO, D.; GUILLÉN, F.; CASTILLO, S.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M. Characterisation of gels from different *Aloe* spp. as antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 223–230, 2013.